

ELISA HELENA PAZ ANDRADE

TESE DE DOUTORADO

**MONITORAMENTO DE *Dengue virus* CIRCULANTE EM HUMANOS, LARVAS E
MOSQUITOS ADULTOS DE *Aedes aegypti* NO MUNICÍPIO
DE CONTAGEM, MINAS GERAIS**

UFMG

2015

ELISA HELENA PAZ ANDRADE

**MONITORAMENTO DE *Dengue virus* CIRCULANTE EM HUMANOS, LARVAS
E MOSQUITOS ADULTOS DE *Aedes aegypti* NO MUNICÍPIO
DE CONTAGEM, MINAS GERAIS**

*Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Pessoa Vilela

Belo Horizonte

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre iluminar meus caminhos e me dar forças para persistir em meio aos desafios.

Aos meus pais Lúcia Helena e Geraldo, que são meu alicerce, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amado irmão Igor, por sempre me incentivar a prosseguir, torcer e vibrar com meu sucesso.

Ao Rafael, pelo apoio, compreensão, carinho, força, paciência. Por ser mais sábio do que eu, inúmeras vezes. Com certeza, ajudou a manter o brilho nos meus olhos no decorrer do doutorado!

Aos meus amigos, que de uma forma ou de outra sempre se fizeram presentes: Matilde, Isabela, Carol, Pollyanna, Fernando, Guilherme, Carlão, Noriene, Ana Paula Pacífico, Keylla, Júlio Alvarenga, Júlio César, Fátima, Roane!!! Obrigada por tornarem o caminho mais leve!!!

À minha orientadora, Profa. Dra. Erna Kroon, pela oportunidade concedida, por ter me aberto as portas do Laboratório de Vírus, pela confiança em mim depositada, compreensão e ensinamentos.

À Dra. Ana Paula Pessoa Vilela, pela co-orientação, por ter me ensinado a desenvolver uma visão mais crítica sobre meus experimentos, pelos sábios conselhos e apoio.

À Dra Leandra, pela valiosa ajuda com as análises filogenéticas, pelos ensinamentos sobre dengue, pela amizade e carinho, por sempre ter acreditado em mim.

Ao Hassan Zibaoui, pela preciosa ajuda com os mapas, pela presteza e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei, e pela enorme paciência;

À Profa Edel, por ter me apontado o caminho do doutorado, ter sempre palavras de sabedoria e de incentivo para me oferecer e pela confiança;

Ao Professor Jacque Nicoli, por ter me acolhido no ICB e pelo discernimento de me apontar outro caminho.

À Profa Sueli, que foi minha professora de Microbiologia na Graduação, pela oportunidade de fazer Treinamento Didático e por ser como uma mãe dentro do ICB para mim, pelo apoio e torcida de sempre, além do enorme carinho e preocupação.

Ao Professor Álvaro Eiras, pelo empréstimo das armadilhas BG Sentinela para o estudo.

À Kelly e à Tati Mingoti, pelos ensinamentos em entomologia, pela disponibilidade e presteza em me ajudar.

Aos gestores da Secretaria Municipal de Saúde de Contagem, por terem consentido com a realização do projeto e entendido a relevância do mesmo, principalmente Nerice Ventura e Tércio Moraes.

Ao Marco Túlio de Oliveira e Shirley Rodrigues, gestores da Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde, pelo apoio concedido, compreensão e credibilidade que depositaram no trabalho.

Ao Zé Renato, meu primeiro gerente na Zoonoses de Contagem, pelo grande apoio que sempre me deu, pelos ensinamentos de campo e de vida, grande apoiador desse projeto.

À equipe de coleta de sangue da UPA GPV e principalmente à Isabela, pela boa vontade em ajudar.

Aos agentes de combate a endemias dos distritos Vargem das Flores e Eldorado, pela ajuda com as coletas de larvas e mosquitos.

À Gerência de Vigilância Epidemiológica, nas pessoas do Flávio e da Val, pela valiosa ajuda com os dados epidemiológicos de dengue do município de Contagem, sempre que precisei.

Aos funcionários do LACEN de Contagem, especialmente ao Magno, pelas informações, esclarecimentos e direcionamentos.

Aos funcionários da Zoonoses de Contagem, nível Central, em especial Simone e Rose por sempre me ouvirem e oferecerem palavras de encorajamento.

Ao setor de Informática da FAMUC, nas pessoas do Leonardo Lopes e Juliano Almeida, pela disponibilidade, boa vontade e presteza em me ajudar com a formatação da tese.

Aos membros da banca da qualificação e da tese, Dra. Valdelaine, Dr. Maurício, Dr. Luciano e Dr. Flávio; ao saudoso Dr. Eduardo Pessanha, por suas contribuições para esse trabalho e empolgação com o trabalho.

Ao Prof. Jônatas, que foi o relator da tese.

Ao Grupo de dengue do LabVírus; em especial à Ana Paula e Leandra pela padronização das técnicas utilizadas nesse trabalho e a Dani, pelo enorme apoio, amizade, sabedoria e conselhos.

Aos colegas e amigos do LabVírus, especialmente Poliana, Lorena, Claudiney, Flávia, Galileu, Andréia, Ariádna, Paula; e Laboratório de Ecologia e Fisiologia de MOO, em especial Tássia, Bianca, Ariane, Silvia e Fabiana.

Ao Hudson, pela ajuda na manipulação do nitrogênio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Ao NAGE e à Jaque, pelo apoio com o sequenciamento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Dengue virus</i>	1
1.1.1. Taxonomia.....	1
1.1.2. Partícula viral e genoma.....	3
1.1.3. Proteínas virais.....	5
1.1.4. Ciclo de multiplicação.....	6
1.1.5. Variabilidade genética.....	9
1.1.6. Ciclo de transmissão.....	11
1.2. Biologia do vetor.....	13
1.3. Curso da infecção por DENV no vetor	15
1.4. Dengue	17
1.4.1. Manifestações clínicas.....	17
1.4.2. Métodos de diagnóstico.....	19
1.4.3. Epidemiologia.....	21
1.4.4. Cenário no Brasil	24
1.4.4.1. Cenário em Minas Gerais	27
1.4.4.1.1. Cenário em Contagem.....	29
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo geral	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. Obtenção das amostras.....	38
4.1.1. Amostras clínicas de humanos.....	38
4.1.2. Amostras de larvas e mosquitos do gênero <i>Aedes</i>	38

4.2.	Identificação de larvas e mosquitos do gênero <i>Aedes</i>	40
4.3.	Maceração de larvas e mosquitos.....	44
4.4.	Extração de RNA total das amostras de plasma e macerados de <i>pools</i> de larvas e mosquitos.....	44
4.5.	Extração de RNA total dos macerados de mosquitos processados individualmente.....	45
4.6.	Síntese de cDNA.....	45
4.7.	PCR.....	46
4.7.1.	PCR em tempo real (qPCR).....	46
4.7.2.	Semi-nested PCR.....	47
4.7.3.	PCR para identificação das espécies em que fêmeas de <i>A. aegypti</i> realizaram repasto sanguíneo.....	48
4.8.	Fracionamento dos produtos de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	49
4.9.	Purificação dos produtos de PCR.....	49
4.10.	Sequenciamento.....	50
4.11.	Análise das sequências.....	51
4.12.	Alinhamento das sequências.....	51
4.13.	Inferências filogenéticas.....	51
4.14.	Distribuição geográfica de casos humanos e pontos de coleta de <i>pools</i> de larvas e mosquitos.....	52
5.	RESULTADOS.....	53
5.1.	Deteção de DENV nas amostras clínicas de pacientes com suspeita de dengue.....	53
5.2.	Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes.....	56
5.3.	Distribuição espacial dos endereços residenciais dos pacientes positivos para DENV.....	58
5.4.	Deteção de DENV em larvas de <i>A. aegypti</i>	61
5.5.	Distribuição espacial de pontos de coletas dos <i>pools</i> de larvas de <i>A. aegypti</i>	64
5.6.	Análise dos mosquitos capturados.....	67
5.6.1.	Processamento e deteção de DENV em fêmeas de <i>A. aegypti</i>	69
5.6.2.	Distribuição espacial de pontos de coletas de fêmeas de <i>A. aegypti</i>	74

5.6.3.	Identificação das espécies em que fêmeas de <i>A. aegypti</i> ingurgitadas com sangue realizaram repasto sanguíneo.....	77
5.7.	Distribuição espacial de residências de pacientes, larvas e mosquitos positivos para DENV.....	78
5.8.	Análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas.....	81
5.9.	Análises filogenéticas de DENV oriundo de amostras de humanos, larvas e mosquitos.....	98
6.	DISCUSSÃO.....	104
7.	CONCLUSÕES.....	112
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
9.	ANEXOS.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Filogenia empregando sequências conservadas da RNA polimerase RNA dependente (NS5 ou NS5B) de membros da família <i>Flaviviridae</i>	2
Figura 2-	Desenho esquemático representando a partícula de DENV.....	4
Figura 3-	Microfotografia de DENV-3 em microscopia eletrônica.....	4
Figura 4-	Representação da estrutura do genoma do DENV.....	5
Figura 5-	Ciclo de multiplicação dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	9
Figura 6-	Ciclo de transmissão do DENV.....	12
Figura 7-	Estádios do ciclo biológico do <i>A. aegypti</i>	14
Figura 8-	Modelo de infecção do mosquito pelo DENV.....	16
Figura 9-	Trajeto da infecção do DENV no mosquito vetor.....	17
Figura 10-	Mapa dos países ou áreas do mundo sob risco de infecções pelo DENV em 2011.....	22
Figura 11-	Mudança na distribuição dos sorotipos de DENV.....	23
Figura 12-	Casos prováveis de dengue por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2013 e 2014.....	26
Figura 13-	Localização do município de Contagem.....	29
Figura 14-	Distritos sanitários do município de Contagem.....	30
Figura 15-	Diagrama de controle da dengue de 2013 e 2014.....	33
Figura 16-	Armadilha BG Sentinela®.....	39
Figura 17-	Diferenças morfológicas das escamas do VIII segmento do abdômen entre larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	41
Figura 18-	Diferenças morfológicas do tórax entre <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	42
Figura 19-	Morfologia externa de adultos do gênero <i>Aedes</i>	43
Figura 20-	Aspectos da morfologia externa do adulto.....	44
Figura 21-	Distribuição das amostras clínicas de humanos de Contagem quanto à positividade para DENV.....	53
Figura 22-	DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando iniciadores específicos para a região C-prM de cada sorotipo de DENV.....	54
Figura 23-	DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando o iniciador D1.1.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 24-	Distribuição das amostras clínicas de Contagem quanto à detecção de um ou mais sorotipo de DENV.....	55
Figura 25-	Distribuição de casos de dengue de acordo com as semanas epidemiológicas de 2013 de início dos sintomas dos pacientes do estudo.....	56
Figura 26-	Número de ocorrência das principais manifestações clínicas presentes nas fichas de notificação de oito pacientes em fase aguda de dengue sem sinais de alarme.....	58
Figura 27-	Distribuição espacial dos endereços residenciais dos pacientes positivos para DENV atendidos na UPA GPV nas semanas epidemiológicas 19, 20, 21 e 22 de 2013.....	60
Figura 28-	Análise de pools de larvas de <i>A. aegypti</i> por qPCR empregando iniciadores para o gene normalizador <i>rpl32</i>	61
Figura 29-	Temperatura de “melting” (T _m) para DNA amplificado referente à região 5’UTR de controles positivos para DENV-1, 3 e 4.....	61
Figura 30-	Temperatura de “melting” (T _m) para DNA amplificado referente à região 5’UTR de DENV-2.....	62
Figura 31-	DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando iniciadores específicos para a região C-prM de DENV-1 e DENV-2.....	62
Figura 32-	DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando iniciadores específicos para a região C-prM de DENV-3 e DENV-4.....	63
Figura 33-	Distribuição dos <i>pools</i> de larvas de <i>A. aegypti</i> quanto à positividade para DENV.....	63
Figura 34-	Distribuição dos <i>pools</i> de larvas de <i>A. aegypti</i> positivos para DENV quanto à detecção de um ou mais sorotipo de DENV.....	64
Figura 35-	Distribuição espacial de pontos de coleta de <i>pools</i> de larvas de <i>A. aegypti</i> em LIRAA's no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG.....	65
Figura 36-	Distribuição espacial de pontos de coleta de <i>pools</i> de larvas de <i>A. aegypti</i> positivos para DENV em LIRAA's no Distrito Sanitário Eldorado, Contagem, MG.....	66
Figura 37-	Distribuição das fêmeas de <i>A. aegypti</i> quanto ao local de coleta, Contagem, 2013.....	69
Figura 38-	Distribuição das fêmeas de <i>A. aegypti</i> coletadas na borracharia e nos demais pontos de coleta de acordo com o modo de processamento, em <i>pool</i> ou individual.....	70
Figura 39-	Temperatura de “melting” (T _m) para DNA amplificado referente à região do capsídeo de DENV-1, 2, 3 e 4.....	71
Figura 40-	DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando iniciadores específicos para a região C-prM de DENV e de DENV-4.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 41-	Distribuição das amostras de fêmeas de <i>A. aegypti</i> quanto à positividade para DENV.....	72
Figura 42-	Distribuição das amostras de fêmeas de <i>A. aegypti</i> positivas para DENV quanto ao sorotipo detectado.....	72
Figura 43-	Tipo de imóvel em que as amostras de fêmeas de <i>A. aegypti</i> positivas para DENV foram coletadas, Contagem, 2013.....	73
Figura 44-	Distribuição das coletas de fêmeas de <i>A. aegypti</i> positivas para DENV de acordo com o mês de 2013, Contagem.....	73
Figura 45-	Distribuição espacial de pontos de coleta de fêmeas de <i>A. aegypti</i> no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG, de acordo com o mês de coleta em 2013.....	75
Figura 46-	Distribuição espacial de pontos de coleta de fêmeas de <i>A. aegypti</i> positivas para DENV no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG.....	76
Figura 47-	Alteração de coloração do Reagente Trizol, de rosa claro para vermelho, quando fêmeas de <i>A. aegypti</i> ingurgitadas com sangue são maceradas.....	77
Figura 48-	Distribuição de fêmeas de <i>A. aegypti</i> processadas individualmente ingurgitadas com sangue e não ingurgitadas coletadas na borracharia e nos demais pontos.....	78
Figura 49-	Distribuição espacial dos endereços residenciais dos pacientes e pontos de coleta de <i>pools</i> de larvas e fêmeas de <i>A. aegypti</i> positivos para DENV no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG, de acordo com o mês e ano.....	79
Figura 50-	Distribuição espacial dos endereços residenciais dos pacientes e pontos de coleta de <i>pools</i> de larvas e fêmeas de <i>A. aegypti</i> positivos para DENV no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG, de acordo com o sorotipo detectado.....	80
Figura 51-	Alinhamento da sequência de nt da região C-prM das amostras de DENV-1-4 obtidas em Contagem.....	93
Figura 52-	Alinhamento da sequência de aa da região C-prM das amostras de DENV-1-4 obtidas em Contagem.....	96
Figura 53-	Árvore filogenética baseada na região C-prM de DENV-1 construída pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa PhyML.....	100
Figura 54-	Árvore filogenética baseada na região C-prM de DENV-2 construída pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa PhyML.....	101
Figura 55-	Árvore filogenética baseada na região C-prM de DENV-3 construída pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa PhyML.....	102
Figura 56-	Árvore filogenética baseada na região C-prM de DENV-4 construída pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa PhyML.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Notificações de dengue segundo ano de notificação e distrito de residência em Contagem, de 2007 a 2014.....	31
Tabela 2-	Número de casos notificados e confirmados de dengue de residentes em Contagem, de 2007 a 2014.....	32
Tabela 3-	Óbitos por dengue e letalidade segundo ano de início de sintomas em Contagem, de 2007 a 2014.....	32
Tabela 4-	Sorotipos de DENV isolados de residentes em Contagem, de 2007 a 2014.....	34
Tabela 5-	Índices de Infestação Predial (IIP) em % obtidos em LIRAA's realizados no município de Contagem de 2008 a 2014.....	34
Tabela 6-	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção das regiões 5'UTR e capsídeo dos sorotipos de DENV e para a proteína ribossomal L32 de <i>Aedes</i> sp. por RT-qPCR.....	47
Tabela 7-	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da região C-prM do genoma de DENV por RT-semi-nested PCR.....	48
Tabela 8-	Número e percentual de amostras clínicas sequenciadas identificadas com mais de um sorotipo de DENV (coinfecções).....	55
Tabela 9-	Dados clínicos e epidemiológicos de pacientes positivos para DENV, Contagem, 2013.....	57
Tabela 10-	Depósitos em que foram coletados <i>pools</i> de larvas de <i>A. aegypti</i> positivos para DENV em LIRAA's no distrito sanitário Eldorado, Contagem.....	67
Tabela 11-	Número de mosquitos coletados no distrito sanitário Eldorado, de acordo com gênero/espécie e sexo nas semanas epidemiológicas 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17 e 25 de 2013.....	68
Tabela 12-	Números de acesso no GenBank, sorotipo e genótipo de DENV-1-4 detectados por RT-PCR e sequenciados em amostras clínicas dos pacientes com suspeita de dengue, Contagem, 2013.....	83
Tabela 13-	Identificação, sorotipo e genótipo de DENV-1-4 detectados em larvas e mosquitos por RT-PCR e sequenciados, Contagem, 2013-2014.....	84
Tabela 14-	Identidade de nucleotídeos e similaridade de aminoácidos entre a região C-prM de amostras de DENV-1 oriundas do município de Contagem, Minas Gerais.....	85
Tabela 15-	Identidade de nucleotídeos e similaridade de aminoácidos entre a região C-prM de amostras de DENV-2 oriundas do município de Contagem, Minas Gerais.....	85
Tabela 16-	Identidade de nucleotídeos e similaridade de aminoácidos entre a região C-prM de amostras de DENV-3 oriundas do município de Contagem, Minas Gerais.....	86
Tabela 17-	Identidade de nucleotídeos e similaridade de aminoácidos entre a região C-prM de amostras de DENV-4 oriundas do município de Contagem, Minas Gerais.....	87

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa de aprovação do projeto..... 131

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AAS	Ácido acetil salicílico
ACE	Agente de combate a endemias
ADE	Intensificação dependente de anticorpo (do inglês: <i>antibody dependent enhancement</i>)
BGS	BG Sentinela
C	Proteína do nucleocapsídeo
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DC-SIGN	Molécula de adesão intracelular específica de células dendríticas ligante de ICAM-3
DCs	Células dendríticas
DENV	<i>Dengue virus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
E	Glicoproteína E do envelope
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
<i>g</i>	Gravidade
GRP78/BiP	Proteína reguladora de glicose 78
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HSP	Proteína do choque térmico (do inglês <i>Heat Shock Protein</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IFN	Interferon
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
LIRAA	Levantamento de Índice Rápido de <i>Aedes aegypti</i>
μL	Microlitro
M	Proteína da membrana

M	Molar
mg/L	Miligrama por litro
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
NS	Proteína não-estrutural
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ponto Estratégico
PEG	Polietileno glicol
PIE	Período de incubação extrínseco
prM	Precursor da proteína da membrana
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucléico
SE	Semana epidemiológica
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SLEV	<i>Saint Louis encephalitis virus</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE	Tris Borato Ácido etilenodiaminotetracético
TBEV	<i>Tick borne encephalitis virus</i>
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
UTR	<i>untranslated regions</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>

RESUMO

Dengue virus (DENV) é o agente etiológico da dengue, a mais importante infecção viral transmitida por mosquitos para o homem no mundo. O município de Contagem, localizado na Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, enfrentou uma epidemia de dengue de grande magnitude, com o maior número de notificações de casos já registrados (22.881) e três óbitos no ano de 2013. Tendo em vista esse contexto, o objetivo desse trabalho foi detectar e identificar DENV circulante em amostras clínicas de humanos, larvas e mosquitos adultos de *Aedes aegypti* coletados em 2013 e 2014 nesse município. Para tanto, foram analisadas 49 amostras de plasma de pacientes com suspeita clínica de dengue, com início de sintomas no mês de maio de 2013, 28 *pools* de larvas de *A. aegypti* coletados durante a realização de Levantamentos de Índice Rápido de *Aedes aegypti* (LIRAA's) nos meses de março e outubro de 2013 e janeiro de 2014 no distrito sanitário Eldorado em Contagem, bem como 547 mosquitos *A. aegypti* com o auxílio da armadilha BG Sentinela nesse mesmo distrito nos meses de janeiro, fevereiro, março, abril e junho de 2013. RNA de DENV-1-4 foi detectado por RT-semi-nested PCR para a região C-prM do genoma do vírus em 35 amostras de humanos, o que corresponde a 71%, das quais 27 foram sequenciadas. Considerando as amostras sequenciadas, 21 (77,8%) foram identificadas com um único sorotipo de DENV, de acordo com a seguinte distribuição: sete (26%) de DENV-3, seis (22,2%) de DENV-4, cinco (18,5%) de DENV-2 e três (11,1%) de DENV-1. Foram identificadas seis amostras com coinfeção. Nove *pools* de larvas foram detectados com DENV após realização do PCR (semi-nested), dos quais quatro (44,4%) estavam infectados por apenas um sorotipo (DENV-3) e cinco (55,6%) estavam infectados por mais de um sorotipo, de acordo com a seguinte distribuição: um (11,1%) com DENV-1 e DENV-2; um (11,1%) com DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e três (33,4%) com DENV-3 e DENV-4. 223 mosquitos fêmea de *A. aegypti* foram submetidos à pesquisa de DENV, 174 individualmente e 49 em seis *pools* de até 10 indivíduos, o que totalizou 180 amostras. Desse total, 16 amostras foram confirmadas como positivas para DENV após realização do PCR (semi-nested), de acordo com a seguinte distribuição: quatro (25%) com DENV-1, duas (13%) com DENV-2, cinco (31%) com DENV-3 e cinco (31%) com DENV-4. Foi possível identificar a espécie em que cinco fêmeas de *A. aegypti* ingurgitadas com sangue realizaram o repasto sanguíneo: quatro estavam ingurgitadas com sangue de *Homo sapiens*, enquanto uma estava ingurgitada com sangue de *Canis lupus familiaris*. Considerando as análises filogenéticas, as amostras de DENV-1 agruparam com vírus pertencentes ao genótipo V, em três linhagens distintas. As amostras de DENV-2 ficaram agrupadas com vírus pertencentes ao genótipo Americano-asiático. As amostras de DENV-3 ficaram agrupadas com vírus pertencentes aos genótipos I e III e as de DENV-4 com vírus pertencentes aos genótipos I e II. Esse é o primeiro relato que demonstra a presença dos quatro sorotipos de DENV, três diferentes linhagens dentro do genótipo V de DENV-1 e mais dois genótipos de DENV-3 e DENV-4, o que totaliza oito vírus diferentes, além da ocorrência de coinfeções, no período de fevereiro de 2013 a janeiro de 2014, em Contagem. No contexto do combate à dengue, esse cenário representa um desafio para o controle da doença e para a confecção de uma vacina tetravalente.

Palavras-chave: *Dengue virus*, *Aedes aegypti*, humanos, Contagem, coinfeções, *Canis lupus familiaris*

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is the etiological agent of dengue, the most important viral infection transmitted by mosquitoes to humans. Contagem is a city located within the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais state and in 2013 a dengue epidemics occurred in this city showing the highest number of cases notifications that has been ever recorded (22,881) and three deaths. In this context, the aim of this study was to detect and identify the circulating DENV in human clinical samples and also in adults and larvae of *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) collected in 2013 and 2014 in Contagem. We analyzed 49 plasma samples from patients clinically suspected with dengue, with symptoms onset on May 2013, 28 pools of larvae of *A. aegypti* collected while conducting the Survey of Quick Index of *A. aegypti* (LIRAA's) in March and October 2013 and January 2014 in the Eldorado Sanitary District. By using the BG sentinel trap, 547 *A. aegypti* mosquitoes were collected in the same district in January, February, March, April and June 2013. The DENV-1-4 RNA was detected by semi-nested RT-PCR targeting the C-prM region from viral genome on 35 human samples (71%). From the total of 27 sequenced samples, 21 samples (77.8%) were identified with a single DENV serotype according to the following distribution: 7 samples of DENV-3 (26%), 6 of DENV-4 (22.2%), 5 of DENV-2 (18.5%) and 3 of DENV-1 (11.1%). Co-infection was identified in 6 samples. Nine larvae pools were confirmed as DENV positive by semi nested PCR. Four pools (44.4%) were infected with single serotype (DENV-3) and five (55.6%) were infected with more than one serotype according to the following distribution: one with DENV-1 and DENV-2 (11.1%); one with DENV-1, DENV-2 and DENV-3 (11.1%) and three with DENV-3 and DENV-4 (33.4%). A number of 223 female *A. aegypti* mosquitoes were subjected to DENV investigation, wherein 174 were individually processed and 49 were divided into six pools totaling 180 samples. Sixteen samples were positive for any DENV serotype after performing the conventional semi-nested PCR according to the following distribution: 4 with DENV-1 (25%), 2 with DENV-2 (13%), 5 with DENV-3 (31%), 5 with DENV-4 (31%). It was possible to identify the host species in which five engorged female *A. aegypti* carried the blood meal: four female were engorged with *Homo sapiens* blood, while one was engorged with *Canis lupus familiaris* blood. Based on phylogenetic analyzes, DENV-1 samples were grouped with virus belonging to genotype V in three different lineages. The DENV-2 samples were grouped with viruses belonging to American-Asian genotype. DENV-3 samples were grouped with viruses belonging to genotype I and III and DENV-4 with viruses belonging to genotype I and II. This is the first report demonstrating the presence of four DENV serotypes, three different lineages from DENV-1 genotype V and two genotypes of DENV-3 and DENV-4, totaling eight different viruses, besides co-infection occurrence, from February 2013 to January 2014. Thus, this scenario represents a challenge for disease control and for developing a tetravalent DENV vaccine.

Keywords: *Dengue virus*, *Aedes aegypti*, humans, Contagem, co-infections, *Canis lupus familiaris*

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Dengue virus*

1.1.1- Taxonomia

Dengue virus (DENV) é o agente etiológico da dengue, a mais importante infecção viral transmitida por artrópodes para o homem (Guzman *et al.*, 2010). DENV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Até o momento, foram descritos quatro sorotipos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV, 2013), que são ainda subdivididos em diferentes genótipos (Rico-Hesse, 1990; Lanciotti *et al.*, 1994; Weaver e Vasilakis, 2009). O prefixo do nome da família *Flaviviridae* é derivado de *flavus*, do latim, amarelo, e refere-se ao protótipo da mesma, *Yellow fever virus* (YFV) (Westway *et al.*, 1985).

Flaviviridae é uma grande família de vírus patogênicos responsáveis por causar doenças graves e mortalidade em seres humanos e animais (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005). A família engloba, além dos *Flavivirus*, outros três gêneros: *Hepacivirus*, ao qual pertence o vírus da hepatite C; *Pestivirus*, que inclui o agente etiológico da diarreia bovina e *Pegivirus*, que infecta primatas e morcegos (ICTV, 2013) (Figura 1). Os membros da família compartilham semelhanças na morfologia, organização do genoma e nas estratégias de replicação, mas apresentam diversidade em suas propriedades biológicas, além de não exibirem reação sorológica cruzada (Lindenbach *et al.*, 2007).

O gênero *Flavivirus* contém 53 espécies de vírus, sendo, portanto, o maior dentro da família *Flaviviridae* (ICTV, 2013). Os vírus desse gênero apresentam reatividade cruzada entre si e homologies nas sequências genômicas (Weaver e Vasilakis, 2009). Os flavivírus são transmitidos por artrópodes hematófagos e são classificados em três grandes grupos: os vírus transmitidos por carrapatos que compreendem vírus como o *Tickborne encephalitis virus* (TBEV); os vírus transmitidos por mosquitos como o DENV, YFV, *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV), *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV); e ainda um grupo de espécies sem vetor artrópode conhecido (Gubler *et al.*, 2007). Além de patógenos humanos, o gênero *Flavivirus* possui membros que se multiplicam apenas em células de mosquitos, conhecidos como flavivirus “inseto-específicos” (revisado por Cook *et al.*, 2012) (Figura 1).

Esses vírus transmitidos por artrópodes são conhecidos como *arthropod borne viruses* (arbovírus). Esse termo refere-se a um vírus que é transmitido para um hospedeiro vertebrado por meio de um vetor artrópode sugador de sangue (Kuno e Chang, 2005). Essa denominação é utilizada para classificar vírus de diferentes famílias, como *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*, segundo critério epidemiológico (Figueiredo, 2010).

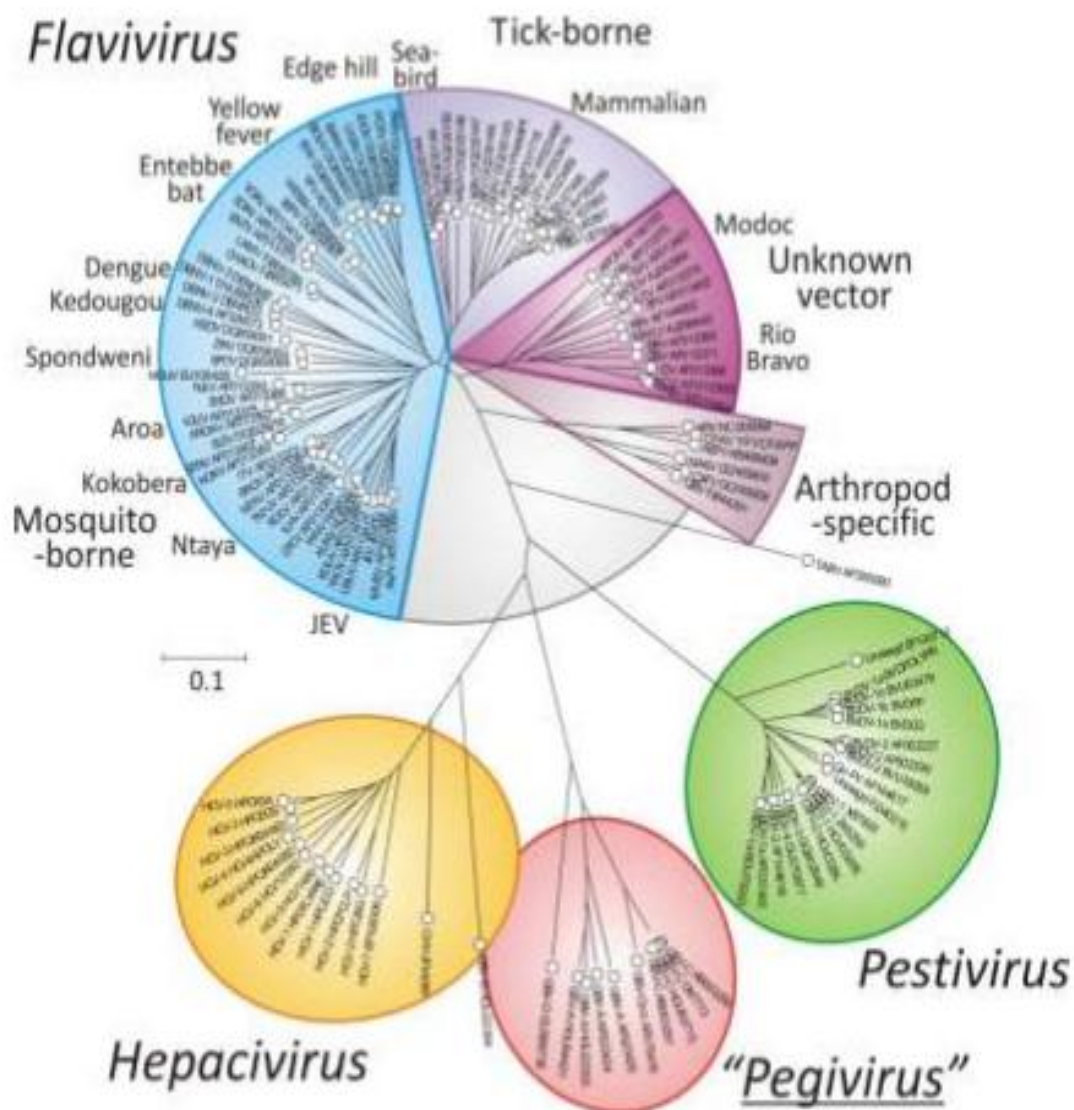


Figura 1- **Filogenia empregando seqüências conservadas da RNA polimerase RNA dependente (NS5 ou NS5B) de membros da família *Flaviviridae*.** Seqüências gênicas parciais de amostras representativas encontram-se destacadas em cada seção. CLUSTALW foi utilizado para criar um alinhamento múltiplo para as seqüências de aminoácidos em que foi verificado alinhamento de motivos conhecidos na região. Uma árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento de seqüências pelo método *Neighbor Joining*, por meio do pacote MEGA versão 4.1. O gênero *Pegivirus*, mais recentemente proposto, encontra-se sublinhado. Fonte: <http://www.ictvonline.org/proposals/2012.011a-dV.A.v2.Pegivirus.pdf>

1.1.2-Partícula viral e genoma

A partícula de DENV apresenta 50 nm de diâmetro e contém três proteínas estruturais: a proteína do nucleocapsídeo C, a proteína da membrana M e a glicoproteína E do envelope (Figura 2) (revisado por Melino e Paci, 2007, por Mukhopadhyay *et al.*, 2005 e por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). A proteína M e a glicoproteína E estão inseridas no envelope lipídico, derivado da membrana da célula hospedeira, sendo a glicoproteína E a principal proteína do envelope (revisado por Sanchez, 2005; Smit *et al.*, 2011). O envelope envolve um complexo ribonucleoproteico amorfo formado pela proteína C ligada ao genoma RNA fita simples de polaridade positiva (revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

Estudos recentes demonstram que partículas virais de DENV produzidas em células de mosquito cultivadas a 28-30°C, apresentam a glicoproteína E altamente compactada, o que confere ao capsídeo simetria icosaédrica; no entanto, partículas virais de DENV produzidas em células de mamífero em temperatura igual ou superior a 34°C adquirem uma forma mais expandida, com exposição de partes da membrana lipídica, não mais apresentando simetria icosaédrica (revisado por Rey, 2013 e por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

Diferentemente de outros vírus envelopados, como *Influenza virus* e *Human immunodeficiency virus* (HIV), as partículas maduras de flavivírus possuem uma superfície lisa, desprovida de projeções (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005). A microfotografia da estrutura do DENV pode ser visualizada na Figura 3. Os vírus são compostos de 6% de RNA, 66% de proteína, 9% de carboidratos e 17% de lipídeos (Leysen *et al.*, 2000).

O genoma RNA fita simples de polaridade positiva, de aproximadamente 11 kb, possui uma única janela aberta de leitura que codifica as proteínas estruturais C, M (que é expressa como prM, o precursor de M) e a glicoproteína E, bem como sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Lindenbach *et al.*, 2007; revisado por Guzman *et al.*, 2010) (Figura 4). O genoma é traduzido em uma única poliproteína, que é clivada por proteases virais e do hospedeiro, originando as proteínas estruturais e não estruturais (revisado por Melino e Paci, 2007).

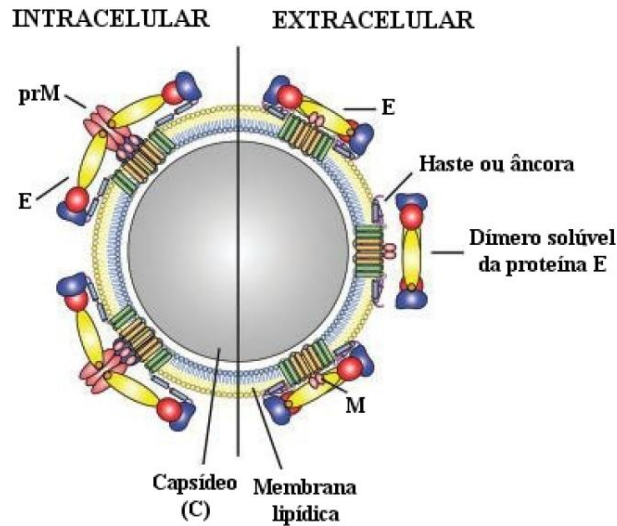


Figura 2 - **Desenho esquemático representando a partícula de DENV.** A representação demonstra as proteínas estruturais - glicoproteína do envelope viral (E), proteína de membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (C). O genoma RNA fita simples de polaridade positiva localiza-se no interior da partícula. Fonte: Stiasny e Heinz, 2006.

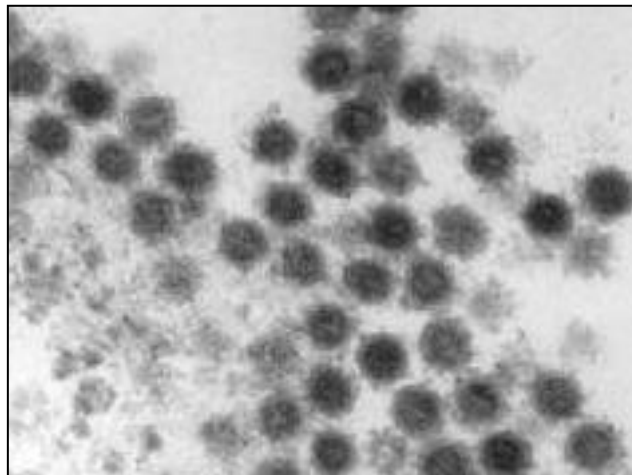


Figura 3- **Microfotografia de DENV-3 em microscopia eletrônica.** Fonte: Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, 2009.

O RNA viral apresenta regiões não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3', que são necessárias para a multiplicação viral. A UTR da região 5' é relativamente curta (cerca de 100 nucleotídeos) e possui a estrutura *cap* no final 5' enquanto a UTR 3' é maior (cerca de 450 nucleotídeos),

desprovida de cauda poli(A), mas contém uma estrutura de *stem-loop* muito conservada (Figura 4) (Alvarez *et al.*, 2005).

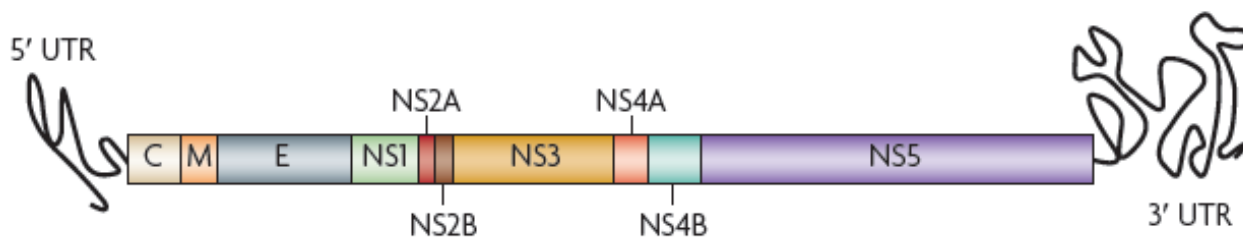


Figura 4- **Representação da estrutura do genoma do DENV.** A única janela aberta de leitura codifica três proteínas estruturais (capsídeo - C, membrana - M e glicoproteínas do envelope – E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: Guzman *et al.*, 2010.

1.1.3- Proteínas virais

As proteínas estruturais C, M e E são componentes das partículas virais maduras (Welsch *et al.*, 2009). A proteína do capsídeo consiste de aproximadamente 120 aminoácidos (aa) e envolve o genoma viral e forma o cerne do nucleocapsídeo. prM (aproximadamente 165 aa) e E (aproximadamente 495 aa) são glicoproteínas que contêm duas hélices transmembrana. Antes de ser clivada durante a maturação da partícula viral para gerar o peptídeo pr e a proteína M (aproximadamente 75 aa), a proteína prM possivelmente funciona como uma chaperona para o dobramento e montagem da proteína E. A proteína E contém o sítio de ligação ao receptor celular e um peptídeo de fusão (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Propriedades biológicas importantes dos DENV, além da ligação ao receptor, estão associadas com a glicoproteína E, como hemaglutinação de eritrócitos, indução de anticorpos neutralizantes e resposta imune protetora (Gubler *et al.*, 2007; revisado por Guzman *et al.*, 2010).

As proteínas não estruturais são protegidas dentro da célula hospedeira infectada, mas não são detectáveis nas partículas virais. Elas provavelmente estão envolvidas na replicação do genoma dos DENV, que ocorre em associação com as membranas celulares. NS3 e seu cofator, NS2B, estão envolvidas no processamento da poliproteína viral. NS3 também possui atividades de RNA helicase e nucleotídeo trifosfatase. NS5 possui atividade de RNA polimerase RNA dependente e está envolvida na colocação de *cap* no RNA viral das progênes (Welsch *et al.*, 2009).

A glicoproteína NS1 (aproximadamente 46 kDa) forma homodímeros altamente estáveis que possuem afinidade por membranas. A mesma encontra-se retida nas células infectadas, porém, pode estar localizada na superfície destas e ser secretada lentamente por células de mamíferos (Avirutnan *et al.*, 2007; Somnuk *et al.*, 2011). NS1 apresenta papel importante na atenuação da ativação do complemento, o que protege o DENV da neutralização dependente de complemento pelas lectinas ligadoras de manose (Avirutnan *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2010; Kurosu *et al.*, 2007; Somnuk *et al.*, 2011). Durante a infecção, NS1 desencadeia forte resposta humoral, sendo também um importante alvo dos anticorpos produzidos. A co-localização de NS1 com RNA dupla fita nas células infectadas sugere que esta proteína esteja envolvida na replicação do RNA de DENV (revisado por Chaturvedi *et al.*, 2006).

Pouco se sabe sobre as funções das proteínas NS2A, NS4A e NS4B, mas vários estudos sugerem que elas provavelmente ancoram as proteínas de multiplicação viral à membrana celular e contribuem para a montagem do vírus, além de inibirem a resposta de interferon (IFN) α/β (Welsch *et al.*, 2009). A proteína NS2A (cerca de 22 kDa) é hidrofóbica e encontra-se colocalizada com os complexos de replicação, sendo essencial no processo de acumulação do RNA (Murray *et al.*, 2008). As proteínas NS4A e NS4B (16 kDa e 27 kDa, respectivamente) são hidrofóbicas. A primeira potencialmente desempenha um papel de indução de alterações na membrana, servindo como um arcabouço para a formação de complexos de replicação viral e tem papel na replicação do RNA do vírus devido a sua colocalização nos complexos de replicação viral (Welsch *et al.*, 2009). NS4B aparece colocalizada com NS3 e com fitas duplas de RNA em estruturas de membrana derivadas do retículo endoplasmático que parecem ser sítios de replicação de RNA (Murray *et al.*, 2008).

1.1.4- Ciclo de Multiplicação

O primeiro passo na via de multiplicação dos *Flavivirus* na célula envolve a adsorção, que corresponde à ligação da glicoproteína E ao receptor celular. Os *Flavivirus* reconhecem moléculas ubíquas da superfície celular ou utilizam múltiplos receptores para a penetração na célula, tendo em vista que infecções por esses vírus já foram observadas em um grande número de linhagens celulares de diferentes espécies hospedeiras (Smit *et al.*, 2011).

Múltiplos receptores primários têm sido identificados para DENV em células de mamíferos, incluindo proteínas do choque térmico (HSP70/HSP90), neolactotetraosilceramida, moléculas

associadas ao CD14, proteína 78 reguladora da glicose (GRP78/BiP), laminina 37-kDa/67-kDa, molécula de adesão intracelular específica de células dendríticas ligante de ICAM-3 (DC-SIGN) e receptor de manose, dentre outros (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2011; revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). Glicosaminoglicanos carregados negativamente, como sulfato de heparan, que são abundantemente expressos em numerosos tipos celulares, são utilizados como receptores de baixa afinidade por vários vírus do gênero *Flavivirus*. Essas interações propiciam a concentração do vírus na superfície celular e são mediadas pela glicoproteína E (Smit *et al.*, 2011; Hidari e Suzuki, 2011).

Receptores Fc γ em células portadoras do mesmo como monócitos e macrófagos participam da internalização de imunocomplexos de partículas de DENV maduras ou imaturas, o que resulta no fenômeno de intensificação dependente de anticorpo, do inglês *antibody dependent enhancement* (ADE). Esse fenômeno ocorre quando anticorpos pré-existentes presentes no organismo a partir de uma primeira infecção por DENV ligam-se a uma partícula viral infectante durante uma infecção subsequente por um sorotipo diferente. Os anticorpos da infecção primária não conseguem neutralizar o vírus. Em vez disso, o complexo anticorpo-vírus liga-se a receptores denominados Fc γ em células portadoras desse receptor. Os anticorpos auxiliam o vírus a infectar células de forma mais eficiente (Halstead, 2003). Anticorpos anti-prM são os principais relacionados à ocorrência de ADE (revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

DENV têm se mostrado capaz de infectar numerosas células humanas, incluindo células dendríticas (DCs), monócitos, macrófagos, células B, T, endoteliais, hepatócitos e até mesmo as células neuronais. Contudo, há um consenso geral de que, *in vivo*, células da linhagem mononuclear fagocítica sejam os principais alvos para os DENV (revisado por Clyde *et al.*, 2006). DENV se propaga principalmente nas DCs da pele e, subsequentemente, a proliferação viral provavelmente ocorre em células-alvo como aquelas da linhagem monocítica (Hidari e Suzuki, 2011). Esses achados sugerem que DENV não utiliza um único receptor específico para penetração na célula, mas reconhece e se liga a diversas moléculas, possivelmente de uma maneira sorotipo específica, em concordância com o amplo número de tipos celulares que são susceptíveis à infecção (revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

DENV penetra na célula por meio de diferentes vias, as quais incluem endocitose mediada por clatrina, que constitui a principal via utilizada para penetração nas células, endocitose não clássica independente de clatrina ou macropinocitose, de acordo com a célula hospedeira e o sorotipo ou

amostra viral (revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). Após essa internalização, a vesícula endocítica que carrega o vírus funde-se a endossomos precoces. Na sequência, o endossomo precoce que carrega o vírus maduro se transforma em endossomo tardio. A fusão de membrana ocorre principalmente no compartimento endossomal tardio, mas dependendo do tipo celular, pode ocorrer no compartimento endossomal precoce. A fusão de membrana foi detectada em um tempo médio de dez a treze minutos após o início da infecção. O ambiente de baixo pH dentro do endossomo desencadeia uma série de eventos moleculares na estrutura da glicoproteína E, o que leva a fusão da membrana viral com a membrana endossomal e a subsequente liberação do nucleocapsídeo no citosol celular (Smit *et al.*, 2011). A proteína do capsídeo e o RNA então se dissociam e a replicação do genoma e a montagem da partícula são então iniciadas (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Durante a infecção, o RNA viral é traduzido em uma poliproteína, que é, simultaneamente e após a tradução, clivada por proteases celulares e virais em proteínas estruturais e não estruturais (Welsch *et al.*, 2009). Inicialmente, partículas virais imaturas são formadas no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Essas partículas, que contêm as proteínas E e prM, membrana lipídica e nucleocapsídeo, não podem induzir a fusão à célula hospedeira, mas podem penetrar na célula após formarem imunocomplexos, no fenômeno da ADE. Em seguida, a clivagem de prM ocorre na rede Golgi-trans, o que cria partículas maduras e infecciosas. Vírus maduros e partículas virais imaturas são liberados da célula hospedeira por exocitose (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005; revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). A figura 5 apresenta a representação do ciclo de multiplicação dos flavivírus.

A multiplicação dos *Flavivirus* ocorre em associação com estruturas da membrana celular. Essas estruturas envolvem a maquinaria de amplificação do RNA e são denominadas complexos de replicação. O complexo de replicação contém proteínas virais, RNA viral e provavelmente fatores da célula do hospedeiro. Esse complexo promove replicação viral eficiente por meio da ancoragem da maquinaria de replicação em compartimentos da membrana e proteção dessa maquinaria dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Welsch *et al.*, 2009).

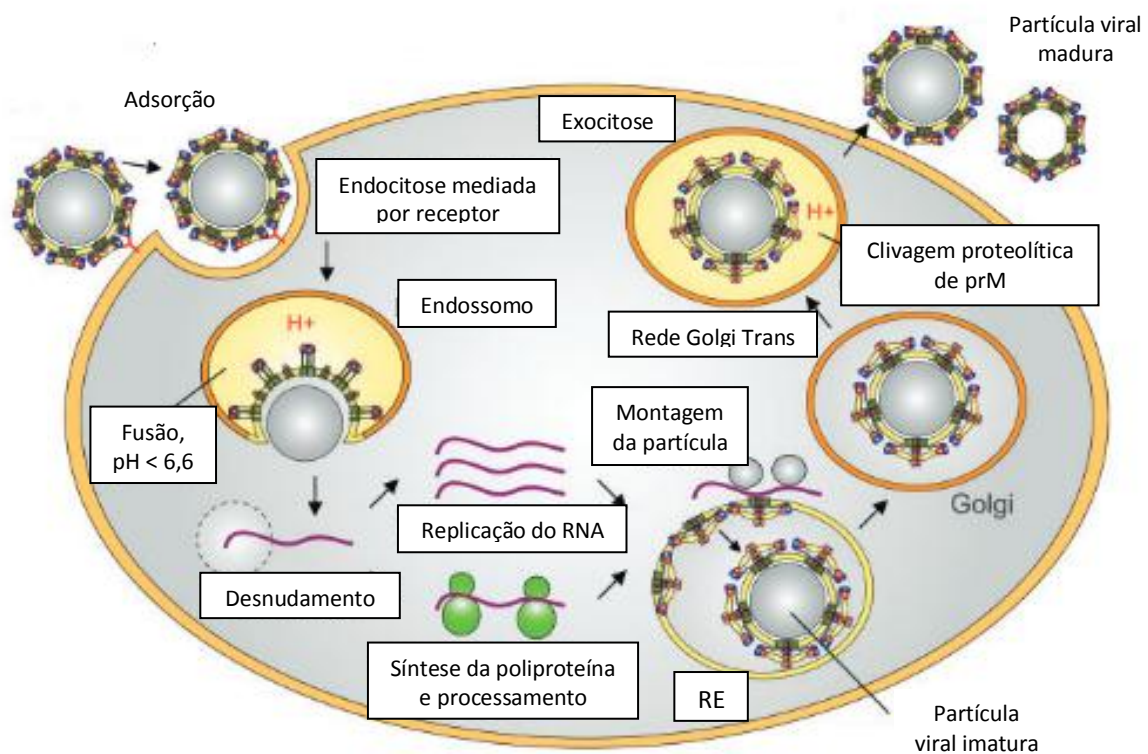


Figura 5- **Ciclo de multiplicação dos vírus do gênero *Flavivirus***. A penetração do vírus ocorre por endocitose mediada por receptor e o ambiente ácido no endossomo induz alterações estruturais na proteína E que acarreta fusão da partícula viral a membrana do endossomo e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Após o desnudamento, o genoma RNA fita simples de polaridade positiva é traduzido para iniciar a replicação do vírus. A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE) e leva a formação de partículas imaturas (que contêm prM), que são transportadas por meio da via exocítica. Existe evidência de que o ambiente ácido na rede Golgi-trans promove uma alteração conformacional irreversível no complexo prM-E, que é requerida para a clivagem de maturação por uma protease celular. Partículas maduras e infecciosas são liberadas por exocitose. Fonte: adaptado de Stiasny e Heinz, 2006.

1.1.5- Variabilidade genética

Os quatro sorotipos de DENV poderiam ser classificados em espécies virais distintas, tendo em vista que apresentam apenas 62 a 67% de identidade baseada em sequências nucleotídicas do genoma. No entanto, são tratados como quatro sorotipos de DENV (1-4) pertencentes a uma única espécie (revisado por Kyle e Harris, 2008). Apesar dessas diferenças, cada sorotipo de DENV desencadeia sintomas semelhantes em seres humanos e circulam no mesmo nicho ecológico (Guzman *et al.*, 2010).

Análises moleculares e filogenéticas evidenciaram uma grande variabilidade nos sorotipos de DENV, levando à identificação e descrição de diferentes genótipos dentro de cada sorotipo (*World Health Organization - WHO*, 2009). Rico-Hesse (1990) caracterizou o termo "genótipo" como sendo um grupo do DENV que não possua mais do que 6% de divergência na sequência de nucleotídeos, com base no sequenciamento de 240 pares de base da região Envelope/Proteína NS1 do genoma.

Atualmente, tem-se a identificação de vários genótipos dentro de cada sorotipo e a classificação dos mesmos pode variar segundo diferentes autores. DENV-1 possui cinco genótipos (Gonçalves *et al.*, 2002). As amostras que circulam no Brasil pertencem ao genótipo V (Drumond *et al.*, 2012). DENV-2 possui seis genótipos, sendo o Americano-Asiático o circulante no Brasil (Chen e Vasilakis, 2011; Drumond *et al.*, 2013). Lanciotti e colaboradores (1994) demonstraram a presença de quatro genótipos para DENV-3. No entanto, análises subsequentes envolvendo grande número de amostras desse sorotipo evidenciaram que o genótipo I descrito por Lanciotti *et al.*, 1994 englobava dois grupos distintos de vírus, o que levou à inclusão do genótipo V. As amostras brasileiras circulantes pertencem aos genótipos I e III (Araújo *et al.*, 2009; Chen e Vasilakis, 2011). Lanciotti e colaboradores (1997) descreveram dois genótipos para DENV-4. No entanto, trabalhos mais recentes (Chen e Vasilakis, 2011; Nunes *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2013) consideram três genótipos para esse sorotipo. Amostras pertencentes aos genótipos I e II estão circulando no Brasil (Nunes *et al.*, 2012).

Coinfecções por diferentes amostras de DENV em humanos e mosquitos favorecem a ocorrência de recombinação. Evidências fornecidas por análise de sequências nucleotídicas do genoma de DENV demonstram que a recombinação é um importante mecanismo responsável por geração de diversidade. Portanto, o intercâmbio genético entre amostras de DENV, apesar de raramente reportado em vírus RNA de polaridade positiva, provavelmente representa, além da mutação, importante fator envolvido na variação genética (Santos *et al.*, 2003). Outra forma de aumentar a variabilidade genética é a possibilidade de entrada de novos vírus por migração (fluxo de genes). Existem inúmeras evidências de que DENV seja transportado por grandes distâncias por hospedeiros e vetores. Com isso, sorotipos e genótipos podem ter ampla distribuição geográfica (Figueiredo, 2006).

Uma vez que variação antigênica intrasorotipo (genótipos) poderia estar associada com diferenças na gravidade das manifestações clínicas, o monitoramento da distribuição e da eventual introdução

de novos vírus/genótipos é essencial (Bennet *et al.*, 2003). A associação entre determinados genótipos e a ocorrência de formas graves da dengue, e de epidemias, tem sido demonstrada (Figueiredo, 2006; Rico-Hesse, 2003). O aumento na diversidade genética de DENV pode acarretar sérias consequências, como vírus com espectro mais amplo de propriedades patogênicas, bem como virulência e potencial de transmissão aumentados (Bona *et al.*, 2012). No entanto, DENV parece não evoluir tão rapidamente como muitos vírus RNA e, essa seleção estabilizadora deve-se, em parte, a necessidade do vírus de ser transmitido de forma eficiente e multiplicar nos hospedeiros mosquito e humano (Murphy e Whitehead, 2011).

1.1.6- Ciclo de transmissão

DENV é o mais importante arbovírus humano (Weaver e Barrett, 2004; Guzman *et al.*, 2010). Os arbovírus mantêm-se na natureza por meio de ciclos que envolvem principalmente mosquitos. Os vírus multiplicam-se e produzem viremia nos vertebrados, multiplicam-se nos tecidos de artrópodes e são, então, transmitidos para novos vertebrados pelas picadas dos artrópodes, após um período de incubação (Defoliart, 1987; Silva, 2010). No caso de vetor mosquito, a fêmea adquire o vírus a partir de sangue de um animal infectado. Quando a fêmea pica outro animal, ocorre a transferência de vírus por meio da saliva para esse novo hospedeiro (Weaver e Barrett, 2004).

Em ambientes urbanos, os DENV são transmitidos entre hospedeiros humanos por mosquitos peridomésticos, principalmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Ambos são adaptados a esse tipo de ambiente, onde obtêm alimento por meio do homem e de animais domésticos, e realizam a oviposição em uma variedade de recipientes que acumulam água, bem como em depósitos naturais (Ayres *et al.*, 2003; Lambrechts *et al.*, 2010). Os vetores, principalmente *A. aegypti*, se tornam infectados por DENV quando se alimentam de sangue humano contaminado durante o período usual de cinco dias de viremia (Guzman *et al.*, 2010).

No entanto, estudos da ecologia dos DENV em *habitats* silvestres no Oeste da África e na Malásia têm identificado ciclos de transmissão envolvendo primatas não humanos como reservatórios e *Aedes (Stegomyia)* spp. arbóreos como vetores (Figura 6) (Weaver e Barrett, 2004). Em florestas desses locais e provavelmente também do Vietnã, ciclos silvestres de DENV têm sido descritos envolvendo mosquitos *Aedes* spp e macacos. Na Guiana Francesa, foi demonstrado que DENV pode infectar pequenos mamíferos neotropicais, como morcegos, roedores e marsupiais oriundos tanto de ambientes silvestres quanto de ambientes de floresta secundária circundados por área

urbana. Esses achados sugerem que esses mamíferos podem servir para a manutenção do vírus em períodos interepidêmicos e apontam para a necessidade de maiores estudos sobre o ciclo de transmissão do DENV (Thoisy *et al.*, 2009).

Vetores silvestres de DENV na África incluem *Aedes (Stegomyia) africanus*, *Ae. (S.) luteocephalus*, *Ae.(S.) opok*, *Ae. (Diceromyia) taylori* e *Ae. (D.) furcifer*. *Ae. niveus* e *Ae. polynesiensis* também têm sido associados à transmissão na Malásia (Moncayo *et al.*, 2004) e na Polinésia Francesa (Cao-Lormeau, 2009), respectivamente.

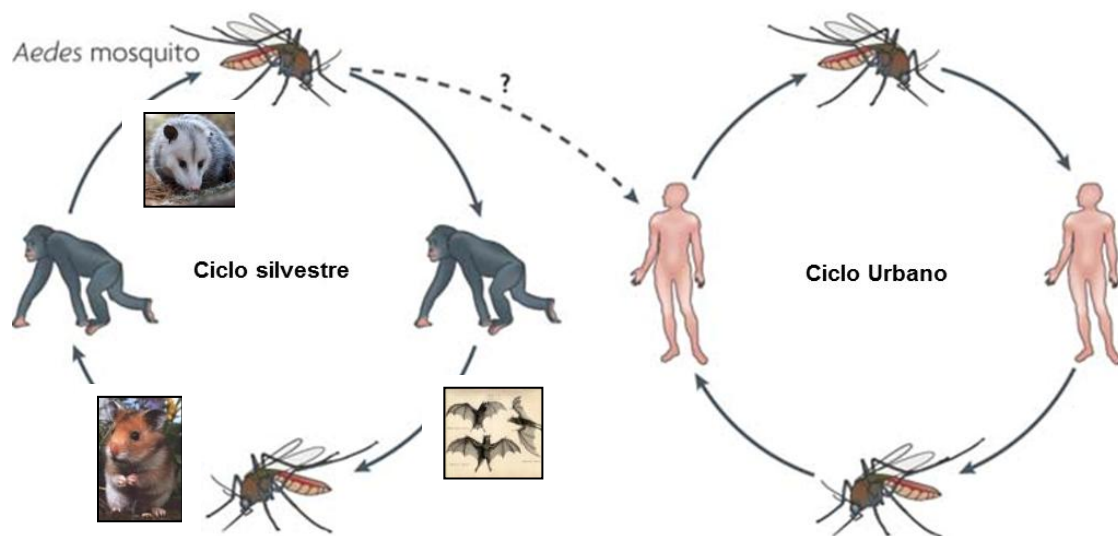


Figura 6- **Ciclo de transmissão do DENV.** Ciclo urbano com transmissão do vírus aos humanos principalmente por *Aedes aegypti*, à direita. Ciclo silvestre com transmissão entre primatas não-humanos por mosquitos do gênero *Aedes*, à esquerda. Fonte: adaptado de Whitehead *et al.*, 2007 e Thoisy *et al.*, 2009.

Outras formas de transmissão de DENV entre mosquitos são a transmissão venérea, no ato da cópula, e a transmissão da fêmea para a progênie, denominada transovariana ou vertical, que podem ser justificativas para o mosquito macho se tornar infectado, apesar de não ser hematófago (Mellor, 2000). A transmissão transovariana ou vertical ocorre quando o ovariolo da fêmea torna-se infectado e o vírus, então, infecta os ovos. Quando os folículos ovarianos em desenvolvimento se tornam infectados, o vírus se multiplica e persiste no inseto durante a embriogênese, desenvolvimento larval e na metamorfose para o estágio adulto desta geração (Woodring *et al.*, 1996). A transmissão transovariana é considerada um importante mecanismo de manutenção do vírus durante períodos entre epidemias. Existem vários relatos de transmissão transovariana em DENV (Joshi *et al.*, 2002; Evangelista, 2003; Cecílio *et al.*, 2009; Vilela *et al.*, 2010).

A. aegypti é considerado o principal vetor na reemergência global das epidemias da dengue, especialmente nas Américas (Ayres *et al.*, 2003; Moncayo *et al.*, 2004; Lambrechts *et al.*, 2010). A abundância, na África, de espécies proximamente relacionadas ao gênero *Aedes* dentro do subgênero *Stegomyia*, bem como a existência de *A. aegypti* silvestre (*A. aegypti formosus*) nesse continente, associadas à falta de espécies proximamente relacionadas ao subgênero *Stegomyia* nas Américas, sugerem uma origem africana para essa espécie. Movimentos de pessoas e recipientes de armazenamento de água que as mesmas utilizavam durante os séculos XVII a XIX provavelmente disseminaram *A. aegypti* ao longo das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Essa espécie de mosquito está presente em grande parte dos países situados entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul (Poersch *et al.*, 2005).

O mosquito asiático *A. albopictus*, originário do ciclo silvestre, disseminou-se pelo mundo a partir de 1970, alcançando Estados Unidos (EUA), América Latina, África tropical, ilhas do Pacífico e Europa. Embora menos antropofágico que *A. aegypti*, *A. albopictus* também é considerado um vetor de DENV e, possivelmente, de grande importância na emergência dos ciclos urbanos (Moncayo *et al.*, 2004).

No Brasil, além de *A. aegypti* e *A. albopictus*, também é descrita a presença de outras espécies do gênero *Aedes*, como *A. scapularis*, *A. serratus*, *A. stigmaticus*, *A. terreus* (Barbosa *et al.*, 1993; Tissot e Silva, 2008), *A. fluviatilis* (Lopes *et al.*, 1993), *A. fulvus*, *A. crinifer*, *A. hastatus*, *A. nubilus*, *A. oligopistus*, *A. rhyacophylus* e *A. argyrothorax* (Tissot e Silva, 2008; Barbosa *et al.*, 2008).

1.2- Biologia do vetor

A. aegypti e *A. albopictus* pertencem ao filo Arthropoda (pés articulados), classe Hexapoda (três pares de pernas), ordem Diptera (um par de asas anterior funcional e um par posterior modificado em halteres), família *Culicidae* e gênero *Aedes*. Os mosquitos se desenvolvem por meio de metamorfose completa (holometabologia), apresentando ciclo de vida que compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto, este último com sexos separados (Figura 7). Todos os estádios são aquáticos, com exceção do adulto (Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, 2001; Forattini, 2002).

O volume de postura das fêmeas do mosquito oscila entre 50 a 500 ovos, que são depositados diretamente em superfície líquida ou locais passíveis de serem inundados. Os ovos são capazes de

resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano. A capacidade de resistência dos ovos de *A. aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (dispersão passiva). A duração da fase larvária depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro. Em condições ótimas, o período entre a eclosão e a pupação pode não exceder a cinco dias. Contudo, em baixa temperatura e escassez de alimento, o 4º estágio larvário pode prolongar-se por várias semanas, antes de sua transformação em pupa. O estado pupal dura, geralmente, de dois a três dias. Os adultos de *A. aegypti*, na natureza, vivem, em média, de 30 a 35 dias (Forattini, 2002).

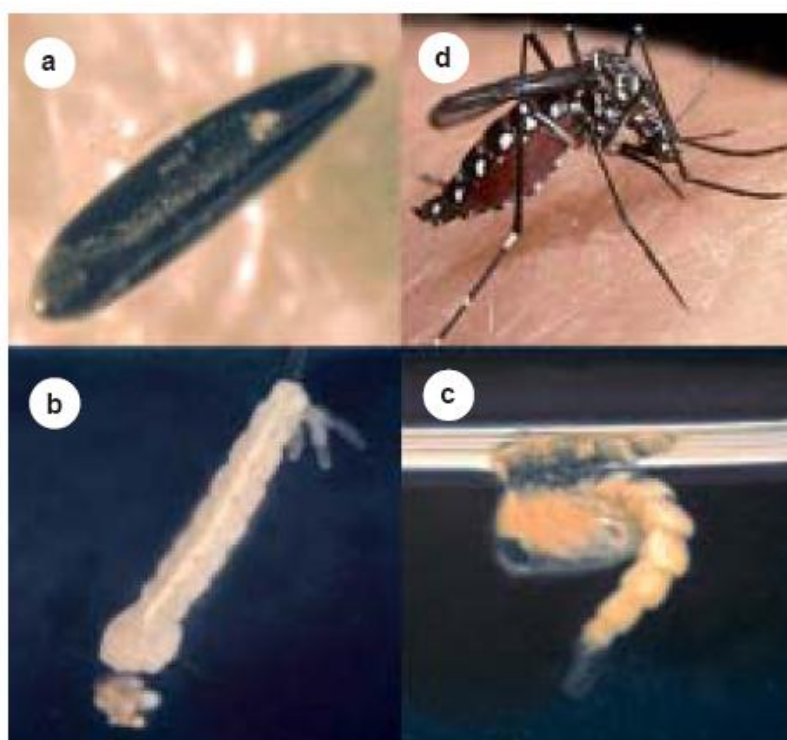


Figura 7- Estádios do ciclo biológico do *A. aegypti*. a- Ovo; b- Larva; c- Pupa; d- Adulto. Fonte: Sanchez, 2005.

O ciclo de transmissão urbano é altamente eficiente e, atualmente, ocorre de forma independente do ciclo silvestre. Essa alta eficiência é explicada, principalmente, pela ecologia do *A. aegypti*. Essa espécie coloca seus ovos nas paredes de criadouros sombreados que contêm água ou que são passíveis de serem inundados e prontamente adentra habitações humanas, onde realiza vários repastos sanguíneos durante cada ciclo reprodutivo, tanto para a produção de ovos quanto para nutrição. As fêmeas se alimentam de sangue da maioria dos vertebrados, mas há uma predileção por seres humanos (Weaver e Barrett, 2004; Sanchez, 2005).

O repasto sanguíneo normalmente é realizado durante o dia, nas primeiras horas dos períodos matutino e vespertino. A picada nos humanos ocorre principalmente nas partes inferiores do corpo, como pés e pernas (Melo, 2009). Em geral, a fêmea de culicídeos faz uma postura após cada repasto sanguíneo. Entretanto, *A. aegypti* alimenta-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando perturbado antes de estar totalmente ingurgitado. Essa característica aumenta a possibilidade do mosquito ingerir e transmitir o vírus (Barata *et al.*, 2001). Além disso, em um mesmo ciclo de oviposição a fêmea coloca os ovos em vários recipientes, garantindo a sobrevivência e a dispersão de sua prole, o que tem sido chamado de saltos de oviposição (Barreto e Teixeira, 2008).

Os mosquitos têm seu metabolismo influenciado pelos fatores ambientais. A temperatura afeta diretamente a multiplicação do vírus, além de influenciar no tempo em que o mesmo alcança as glândulas salivares do inseto. As altas temperaturas podem favorecer a transmissão do vírus, porém contribuem para o aumento da taxa de mortalidade dos mosquitos e ocasionam a diminuição da transmissão viral. A umidade e as chuvas afetam o comportamento e a biologia do vetor, como vôo e a oviposição (Gubler *et al.*, 2007).

1.3- Curso da infecção por DENV no vetor

O tempo em que o artrópode adquire o DENV de um hospedeiro vertebrado até o momento em que o vírus alcança as glândulas salivares é conhecido como período de incubação extrínseco (PIE) e a duração desse período pode variar com o título viral (Gubler *et al.*, 2007). Os vírus passam do trato intestinal do mosquito para as glândulas salivares após o PIE, um processo que leva aproximadamente dez dias e é mais rápido em ambientes de alta temperatura. Picadas do mosquito após o PIE podem resultar em infecção (Guzman *et al.*, 2010). O tempo em que o vírus é capaz de ocasionar viremia no hospedeiro vertebrado é conhecido como período de incubação intrínseco (Figura 8) (Gubler *et al.*, 2007).

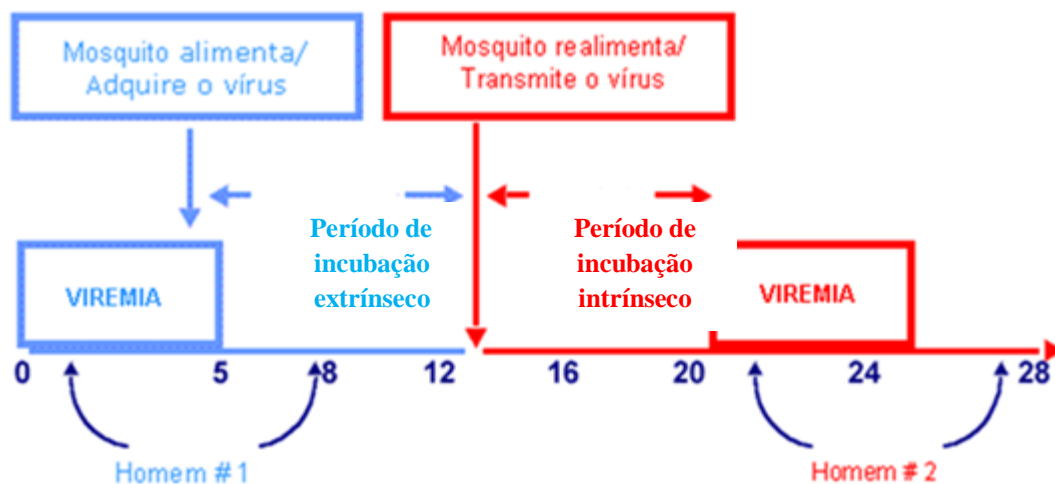


Figura 8- Modelo de infecção do mosquito pelo DENV. Fonte: adaptado de Gubler *et al.*, 2007.

Apesar da presença de DENV em um repasto sanguíneo constituir um requisito para a infecção do mosquito, apenas a presença do vírus não é suficiente para garantir a infecção. A susceptibilidade depende de fatores genéticos e não genéticos. Os fatores não genéticos referem-se à competência vetorial e incluem tamanho do mosquito, *status* nutricional e a competição larvária. Os fatores genéticos incluem as espécies de mosquito, embora a base para isso não esteja completamente elucidada (revisado por Smit, 2012).

A primeira etapa na infecção do mosquito como resultado da ingestão de um repasto sanguíneo virêmico é a infecção das células epiteliais do intestino médio. A passagem através da barreira do intestino médio requer a adsorção viral, seguida da penetração e multiplicação nas células epiteliais do intestino médio. Em seguida ao estabelecimento bem sucedido da infecção nessas células, as partículas virais geradas devem passar através da lâmina basal e se disseminar por meio da hemocele e estabelecer infecção em órgãos-alvo secundários, como as glândulas salivares. Subsequentemente, as partículas virais escapam para o lúmen dessa glândula e podem então ser transmitidas para o próximo hospedeiro vertebrado. Uma vez infectado, o vetor permanece infectado por todo o seu ciclo de vida (Figura 9) (revisado por Smit, 2012).

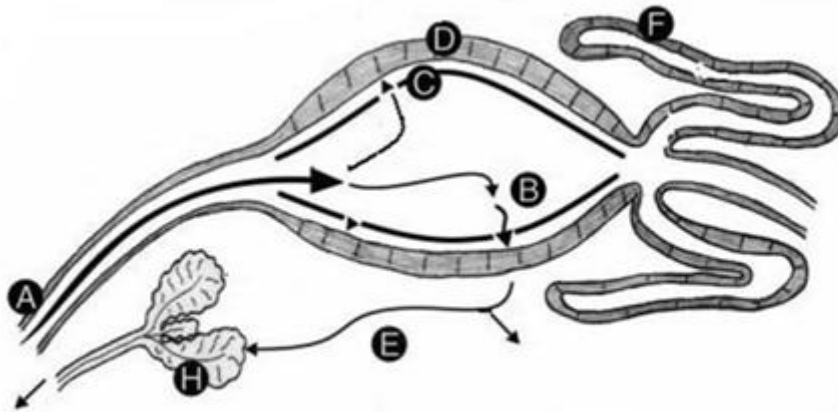


Figura 9- **Trajeto da infecção do DENV no mosquito vetor.** As letras indicam os locais de desenvolvimento viral e as setas indicam o caminho percorrido pelo patógeno dentro do inseto. Após a ingestão de sangue infectado (A) os vírus entram nas células epiteliais do intestino médio (D), se multiplicam e deixam estas células alcançando a hemolinfa (E) e posteriormente, podem infectar e se multiplicar em outros órgãos do inseto como, por exemplo, as glândulas salivares (H), onde, durante um novo repasto sangüíneo, podem infectar um hospedeiro susceptível. Neste desenho, a letra (C) indica a matriz peritrófica e a letra (F), os túbulos de Malpighi. Fonte: modificado de Beerntsen *et al.*, 2000.

Anticorpos específicos contra as proteínas R80 e R67, purificadas a partir de intestino do mosquito *A. aegypti* e células C6/36 de *A. albopictus*, inibiram a ligação às células e a infecção por DENV. Esses resultados sugerem que R67 e R80 são receptores para os quatro sorotipos de DENV em células de intestino de *A. aegypti* e células C6/36 de *A. albopictus* (Mercado-Curiel *et al.*, 2006; Smit *et al.*, 2011). Outros prováveis receptores para DENV em células de mosquito são a proteína proibitina, HSP 70 e duas glicoproteínas de 40 e 45-KDa (Smit *et al.*, 2011; revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). Esses achados corroboram a noção de que DENV utiliza múltiplas moléculas da superfície celular para ligação e infecção de células-alvo (Mercado-Curiel *et al.*, 2006).

1.4- Dengue

1.4.1- Manifestações clínicas

A infecção por DENV em humanos é comumente assintomática, mas pode levar a uma ampla gama de manifestações clínicas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as formas clínicas de dengue são classificadas em dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave, em que são observados desde febre branda e auto-limitante até ocorrência de

hemorragia, extravasamento de plasma e choque (WHO, 2009). A forma mais comum da doença é dengue sem sinais de alarme em que são observadas febre, mialgia e trombocitopenia e a forma menos comum é a dengue grave, com extravasamento de plasma levando a choque e falência múltipla de órgãos (Clark *et al.*, 2012). A imunidade protetora e duradoura desenvolvida após a infecção por DENV é específica contra o sorotipo infectante, podendo ocorrer uma imunidade de curta duração contra os outros três sorotipos (WHO, 2009; revisado por Rodriguez-Rouche e Gould, 2013).

Em relação à dengue sem sinais de alarme, os sintomas ocorrem após um período de incubação de quatro a sete dias, com um início abrupto de febre geralmente acompanhada por dor retro-orbitária. Alguns pacientes desenvolvem artralgia intensa, o que explica o nome histórico da doença “febre quebra ossos”. Durante a fase crítica da doença podem surgir petéquias. A recuperação pode ser complicada por fadiga e depressão. Trombocitopenia é quase universal nas infecções de dengue e pequenas hemorragias podem ser vistas na pele e nas superfícies mucosas (Whitehorn e Farrar, 2010). Alguns sinais indicativos da ocorrência de dengue com sinais de alarme são: dor abdominal, vômito persistente, evidência clínica de acúmulo de fluido, sangramento em mucosa, letargia, irritabilidade e hepatomegalia (WHO, 2009).

Alguns indivíduos infectados por DENV desenvolvem a forma grave da doença, que se caracteriza por febre e diversos sintomas que, durante a fase aguda, são indistinguíveis da dengue sem sinais de alarme, mas, de dois a cinco dias após o início da doença, evoluem com o aparecimento de manifestações hemorrágicas. A anormalidade fisiopatológica primária observada nesses pacientes é o aumento da permeabilidade vascular que induz ao extravasamento do plasma para o compartimento extracelular, resultando em hemoconcentração, o que acarreta aumento do hematócrito, e queda de pressão sanguínea. As manifestações hemorrágicas também estão presentes, porém mais frequentes e graves. Estas incluem petéquias, púrpuras, equimose e epistaxes. Hemorragia intestinal e hematúria são menos frequentes. Trombocitopenia grave ($< 100.000/\text{mm}^3$) também é observada (Gubler *et al.*, 2007; Oishi *et al.*, 2007). Alguns pacientes evoluem para falência circulatória, apresentando pulso rápido e fraco, pressão sanguínea não detectável, hipotensão, pele fria e *status* mental alterado (revisado por Guzman e Kouri, 2002).

A patogênese das formas graves não está elucidada. No entanto, infecções secundárias com outro sorotipo de DENV parecem aumentar o risco de doença grave por meio do fenômeno de ADE (Jiang *et al.*, 2012). Apenas o ADE não explicaria como formas mais graves da doença podem

ocorrer em uma primeira infecção. Outros fatores como sorotipo do vírus infectante, genótipos específicos, doenças crônicas, sexo e idade do hospedeiro estão associados com risco de manifestações mais graves da doença, o que demonstra a complexidade da interação vírus-hospedeiro (Nisalak *et al.*, 2003; Halsey *et al.*, 2012).

Atualmente, não existem agentes terapêuticos específicos para tratamento da dengue. A infecção sintomática é tratada com repouso, hidratação oral, analgésicos e antipiréticos. Medicamentos à base de ácido acetil salicílico (AAS) não devem ser administrados com o intuito de se evitar hemorragias (revisado por Mairuhu *et al.*, 2004). O AAS é um antiagregante plaquetário e, considerando o quadro de plaquetopenia já instalado, pode haver um risco aumentado de hemorragias (Pesaro *et al.*, 2007). Em quadros de doença grave, os pacientes devem ser observados cuidadosamente para identificação dos primeiros sinais de choque. Em casos menos graves, quando os vômitos ameaçarem causar desidratação ou acidose, ou houver sinais de hemoconcentração, a reidratação pode ser feita em nível ambulatorial (revisado por Mairuhu *et al.*, 2004).

Além de sintomas hemorrágicos, a dengue pode apresentar-se por meio de sinais menos típicos, como complicações neurológicas. Embora grande parte de complicações neurológicas ocorram em consequência da infecção sistêmica, recentemente se tornou evidente que DENV também causa doença neuroinvasiva em parcela de indivíduos infectados. De acordo com estudos epidemiológicos, manifestações neurológicas fazem parte do quadro clínico de, aproximadamente, 1 a 5% de todos os casos sintomáticos de infecção por DENV e, em áreas endêmicas, DENV provavelmente representa um significativo agente etiológico de encefalite viral, que permanece subnotificada (Sips *et al.*, 2012).

1.4.2- Métodos de Diagnóstico

Um ensaio laboratorial ideal para a detecção da dengue deve ser rápido, simples, com altas sensibilidade e especificidade, apto para detectar a doença em qualquer fase e, de preferência, ser capaz de identificar infecções primárias ou secundárias bem como os diferentes sorotipos. No entanto, esse teste ideal ainda não está disponível devido à complexidade da patogênese da dengue, hiperendemicidade e múltiplas infecções sequenciais e condições clínicas dos pacientes, como viremia e resposta de anticorpos (revisado por Sekaran *et al.*, 2014).

Durante a primeira semana após o início dos sintomas, o vírus pode ser detectado no soro, plasma, células sanguíneas circulantes e outros tecidos. O isolamento viral, a detecção do ácido nucléico e de antígenos do vírus são técnicas comumente utilizadas para diagnosticar infecções por DENV durante a fase inicial. Sete dias após o início de sintomas, os métodos sorológicos baseados na detecção de anticorpos anti-DENV são os métodos de escolha (Domingo *et al.*, 2011).

O isolamento viral é o teste mais específico para a detecção do DENV, sendo considerado “padrão ouro” para o diagnóstico (Kao *et al.*, 2005; Guzman *et al.*, 2010). A linhagem celular C6/36 de *A. albopictus* é a linhagem de escolha para o isolamento, embora outras células de mosquito e mamíferos possam ser utilizadas (Guzman *et al.*, 2010). A taxa de isolamento é maior nas amostras coletadas até seis dias após o início da doença (Kao *et al.*, 2005). Amostras como soro, sangue total, plasma, líquido céfalo-raquidiano e fragmentos de vísceras podem ser utilizadas nesta técnica (Guzman *et al.*, 2010). Os vírus isolados são detectados no cultivo celular por meio dos testes de imunofluorescência ou reação em cadeia da polimerase (PCR) (Kao *et al.*, 2005; Guzman *et al.*, 2010).

Recentemente, ensaios moleculares baseados na detecção do RNA genômico viral de DENV por reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) ou PCR em tempo real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) têm sido importantes no diagnóstico durante a fase aguda da dengue. Em comparação com o isolamento viral e os métodos sorológicos, essas técnicas são rápidas, de altas sensibilidade e especificidade e permitem a distinção dos sorotipos de DENV, fornecendo dados epidemiológicos valiosos sobre a distribuição espacial desses sorotipos (Domingo *et al.*, 2011). A RT-nested PCR envolve uma etapa inicial de transcrição reversa e amplificação do cDNA utilizando iniciadores para uma região conservada do genoma de DENV, seguida de um segundo passo de amplificação que é específico para cada sorotipo. Os produtos das reações são separados por eletroforese em gel de agarose, o que permite a diferenciação dos sorotipos de DENV com base no tamanho molecular (Guzman *et al.*, 2010). O método é sensível e reprodutível, podendo ser usado para detectar RNA viral em amostras clínicas, tecidos de autópsia, mosquitos e larvas (Lanciotti *et al.*, 1992). O RT-qPCR é um ensaio que permite a quantificação da carga viral em curto espaço de tempo. A detecção do alvo amplificado por sondas fluorescentes dispensa a necessidade de eletroforese após a PCR. Esse ensaio pode detectar todos os sorotipos de DENV em uma única reação. Outra vantagem dessa técnica é a possibilidade de determinar a carga viral no período inicial da doença, que pode ser um importante preditor da gravidade da mesma (WHO, 2009; Guzman *et al.*, 2010).

A utilização de testes sorológicos é favorável em hospitais de países endêmicos para a dengue, devido ao seu baixo custo e simplicidade. No entanto, a utilização dos mesmos pode ser um desafio em áreas hiperendêmicas, em que anticorpos pré-existentes complicam o diagnóstico (revisado por Sekaran *et al.*, 2014). Quando um indivíduo que já teve uma infecção prévia por DENV é novamente infectado, ocorre uma resposta imunológica secundária, que gera níveis elevados de IgG assim como resposta de IgM para a infecção recente. Devido ao fato de altos níveis de IgG competirem com IgM pela ligação ao antígeno, um ensaio de IgM de captura pode ser empregado (Guzman *et al.*, 2010). Para a diferenciação de infecções primária e secundária, a razão IgM/IgG tem sido mais comumente utilizada (WHO, 2009). Vários testes sorológicos possuem kits comerciais de diferentes formatos, incluindo microplacas, tiras e cassetes. Esses kits apresentam sensibilidade e especificidade variáveis e podem não ter sido testados contra painéis de soros referência (revisado por Sekaran *et al.*, 2014). Outras limitações dos métodos sorológicos são a possibilidade de reação cruzada com outros flavivírus e a incapacidade dos mesmos de diferenciar os sorotipos de DENV (Domingo *et al.*, 2011).

A detecção de NS1 de DENV tem sido realizada a partir do estabelecimento do NS1 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e de kits de teste rápido. O antígeno NS1 é detectado em soro e plasma de pacientes infectados com DENV desde o início da febre até o período de convalescência. Esse método de detecção de antígeno é considerado de baixo custo e de fácil execução. No entanto, o ELISA comercial e os kits de testes rápidos demonstraram baixa sensibilidade quando avaliados em diferentes países endêmicos. Tendo em vista o estado imunológico complicado de pacientes com dengue e ensaios que requerem maior padronização, a combinação de métodos diferentes como a detecção de NS1 e IgM/ IgG representa uma estratégia que aumenta o desempenho global (revisado por Sekaran *et al.*, 2014).

1.4.3- Epidemiologia

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A OMS estima que 2,5 bilhões de pessoas, 2/5 da população mundial, estão sob risco de contrair dengue e que ocorram anualmente cerca de 50 milhões de casos. Desse total, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem em consequência da doença (Ministério da Saúde, 2009). Esses números provavelmente tendem a aumentar devido à falta de sucesso nas estratégias de controle da transmissão e prevenção de surtos (Clark *et al.*, 2012). Bhatt e colaboradores (2013)

estimaram a ocorrência de 390 milhões infecções de dengue por ano, das quais 96 milhões representam casos clínicos aparentes.

As áreas geográficas nas quais a transmissão da dengue ocorre têm se expandido nos últimos anos, sendo a doença atualmente endêmica em mais de 100 países da África, das Américas, do Sudeste Asiático, do Leste do Mediterrâneo e do Oeste do Pacífico (WHO, 2014). Do total de 2,5 bilhões de pessoas que estão sob risco de contrair dengue, aproximadamente 975 milhões residem em áreas urbanas de países de climas tropical e subtropical, mas comunidades rurais têm sido afetadas de maneira crescente (Guzman *et al.*, 2010) (Figura 10).

DENV-1-4 estão circulando atualmente na Ásia, África e nas Américas, um cenário bastante distinto do que predominava há 20 ou 30 anos (Figura 11). Viajantes oriundos de áreas endêmicas contribuem para a disseminação viral (Guzman *et al.*, 2010). O custo da doença para a sociedade é considerável, de queda na produção e perdas de salário até custos diretamente associados com assistência médica. Em 2013, a OMS considerou a dengue como a doença viral transmitida por vetor de mais rápida disseminação com potencial epidêmico do mundo (WHO, 2014).



Figura 10- Mapa dos países ou áreas do mundo sob risco de infecções pelo DENV, em 2011. Os países ou áreas em cor laranja são aqueles em que a dengue já foi reportada. Fonte: WHO, 2013.

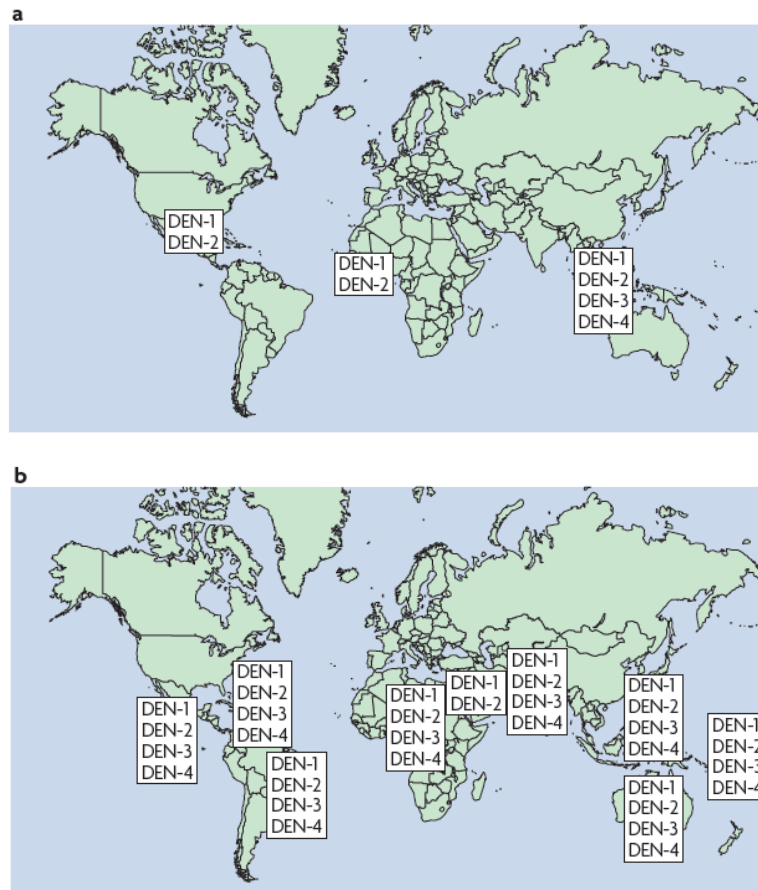


Figura 11- **Mudança na distribuição dos sorotipos de DENV.** A figura mostra a distribuição em 1970 (a) e 2004 (b). Fonte: Guzman *et al.*, 2010.

Após a Segunda Guerra Mundial, a prevalência e a distribuição do *A. aegypti* aumentaram na Ásia e nas Ilhas do Pacífico (Moncayo *et al*, 2004). *A. albopictus* foi apontado como responsável por algumas epidemias de dengue no Japão, Taipei e Taiwan durante a Segunda Guerra Mundial. Mais recentemente, essa espécie foi associada com algumas epidemias de dengue na China, ilhas Maldivas, Macau e no Havaí. As poucas epidemias atribuídas a *A. albopictus*, no entanto, foram essencialmente de dengue sem complicações. Todas as epidemias de dengue grave ocorreram somente em áreas em que *A. aegypti* é encontrado (Lambrechts *et al.*, 2010).

A dengue tem se disseminado para praticamente quase todos os lugares do mundo devido ao aumento do deslocamento humano, urbanização descontrolada, aquecimento global, falta de um efetivo controle do vetor e a expansão dos nichos de *Aedes* spp. O aumento da incidência da dengue no mundo e seus crescentes custos para o sistema de saúde têm contribuído para o desenvolvimento de uma consciência pública e levado ao fomento nas atividades de pesquisa e desenvolvimento de vacinas e medicamentos (Clark *et al.*, 2012).

1.4.4- Cenário no Brasil

Em 1947, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a OMS decidiram coordenar a erradicação do *A. aegypti* no continente, por intermédio do Programa de Erradicação do *A. aegypti* no Hemisfério Oeste. Eficientes programas contra o vetor foram implementados em todos os países latino-americanos, entre o final da década de 1940 e a década de 1950. Essa espécie foi eliminada em quase toda a América. O Brasil participou da campanha de erradicação continental do *A. aegypti* e teve êxito na primeira eliminação desse vetor em 1955 (revisado por Braga e Valle, 2007).

Em 1967, confirmou-se a reintrodução do *A. aegypti* no país, no Estado do Pará, e dois anos depois, em 1969, no Estado do Maranhão. Em 1973, um último foco foi eliminado e o vetor, novamente, considerado erradicado do território brasileiro. Em 1976, entretanto, o *A. aegypti* retornou ao Brasil, em função de mudanças sociais e ambientais decorrentes da urbanização acelerada dessa época e dificuldades da vigilância em saúde de conter a dispersão do vetor pelo território. Foram confirmadas reinfestações nos Estados do Rio Grande do Norte e do Rio de Janeiro e, desde então, o Ministério da Saúde tem implantado programas de controle. Na época, como ainda não havia o registro de casos da dengue, todas as ações eram focadas na erradicação do vetor (revisado por Braga e Valle, 2007). O crescimento global da população, a urbanização e as condições socioambientais, como saneamento inadequado, pouco tratamento e destinação seletiva de lixo, má distribuição de renda e baixa escolaridade da maior parte da população, contribuíram para a disseminação do vetor (Ferreira *et al.*, 2009).

A presença de *A. albopictus* foi reportada pela primeira vez no Brasil em 1986, no Rio de Janeiro (Forattini, 1986). Nesse mesmo ano, esse mosquito foi também encontrado em São Paulo e Minas Gerais e, no ano seguinte, foi registrada sua presença no Espírito Santo (Pessoa *et al.*, 2013). Desde então, tem-se observado sua crescente e acelerada expansão para praticamente todos os estados brasileiros. O *A. albopictus* ocorre de maneira mais concentrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Goiás e Mato Grosso do Sul (Oliveira e Lima, 2012). Até 2013, apenas quatro estados brasileiros não tinham registrado a presença de *A. albopictus*: Acre, Amapá, Piauí e Sergipe (Pessoa *et al.*, 2013).

No Brasil, há referências de epidemias por dengue desde 1923, em Niterói, Rio de Janeiro, sem confirmação laboratorial. A primeira epidemia com confirmação laboratorial foi em 1981-1982, em Boa Vista, Roraima, sendo isolados os vírus DENV-1 e DENV-4 (FUNASA, 2001).

DENV-1 foi reintroduzido no Brasil em 1986, tendo sido isolado em Nova Iguaçu, cidade que compõe a segunda maior Região Metropolitana do país, situada no Estado do Rio de Janeiro. A partir daí, a dengue se disseminou de forma intensa para as cidades vizinhas, incluindo Niterói e Rio de Janeiro. Desse modo, só naquele primeiro ano, mais de 33.500 casos foram notificados e, em 1987, cerca de 60 mil. Em 1986, já atingia o Ceará e Alagoas e em 1987, Pernambuco. São Paulo, Bahia e Minas Gerais foram acometidos por surtos localizados em pequenas cidades (Teixeira *et al.*, 1999).

Um recrudescimento da doença, de proporções consideradas vultosas na época, teve início em 1990, provocado pelo aumento da transmissão do DENV-1 e introdução do DENV-2, também em Nova Iguaçu. A entrada do DENV-2 trouxe em seu bojo os primeiros diagnósticos de dengue grave no país quando foram confirmados 462 casos e oito óbitos (Teixeira *et al.*, 2005). Foi verificado aumento tanto no número de epidemias quanto na gravidade da doença desde a introdução de DENV-2 no país (Drumond *et al.*, 2013). Em seguida, foi observada rápida disseminação de DENV-2 para outros Estados (Figueiredo *et al.*, 2014).

A circulação de DENV-3 foi identificada, pela primeira vez, em um paciente em fase aguda de dengue, em dezembro de 2000, também no Rio de Janeiro e, posteriormente, em Roraima, em novembro de 2001. Em 2002, foi observado o maior registro de casos, cerca de 697.000 casos confirmados, refletindo a introdução e disseminação do sorotipo DENV-3. Essa epidemia levou a uma rápida dispersão desse sorotipo para outros Estados, sendo que em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos DENV-1, 2 e 3 (MS, 2009).

DENV-4 não foi detectado no Brasil após as primeiras notificações de casos de dengue confirmadas laboratorialmente em Roraima, 1981-1982. Desde então, nenhum caso envolvendo esse sorotipo foi reportado no país até 2008, quando esse vírus foi detectado em três pacientes em fase aguda residentes em Manaus, Amazonas, sem histórico de viagem (Figueiredo *et al.*, 2008). Figueiredo e colaboradores (2013) detectaram DENV-4 em um *pool* de dez mosquitos *A. aegypti* coletados em Manaus, 2008, o que confirma a circulação desse sorotipo nessa localidade e período. Em 2010 e 2011, foi constatada a reemergência de DENV-4 em pacientes que apresentaram a forma clássica da doença em Roraima, nos municípios de Boa Vista e Cantá (Temporão *et al.*, 2011). Após essa detecção de DENV-4 em Roraima, o vírus foi identificado em diferentes regiões geográficas em 2011, como Amazonas (Bastos *et al.*, 2012), Rio de Janeiro (Campos *et al.*, 2013), São Paulo,

Paraná e Rio Grande do Sul (Souza *et al.*, 2011), o que demonstra o potencial do vírus para disseminar rapidamente para diferentes áreas (Nunes *et al.*, 2012).

Em 2013, foram registrados 1.452.489 casos prováveis de dengue no país e confirmados 674 óbitos, dos quais a maioria ocorreu no estado de Minas Gerais. Foram enviadas 17.339 amostras para realização do exame de isolamento viral, sendo 5.593 positivas (32,3%). As proporções dos sorotipos virais identificados foram: DENV-4 (56%), seguido de DENV-1 (39,9%), DENV-2 (3,5%) e DENV-3 (0,6%) (Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS/MS, 2015).

Em 2014, foram registrados 591.080 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica (SE) 53 (28/12/14 a 03/01/15). A região Sudeste teve o maior número de casos prováveis (312.318 casos; 52,8%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (114.814 casos; 19,4%), Nordeste (90.192 casos; 15,3%), Norte (49.534 casos; 8,4%) e Sul (24.222 casos; 4,1%). Na análise comparativa em relação a 2013, observa-se redução de 59,3% dos casos no país (Figura 12) (SVS/MS, 2015).

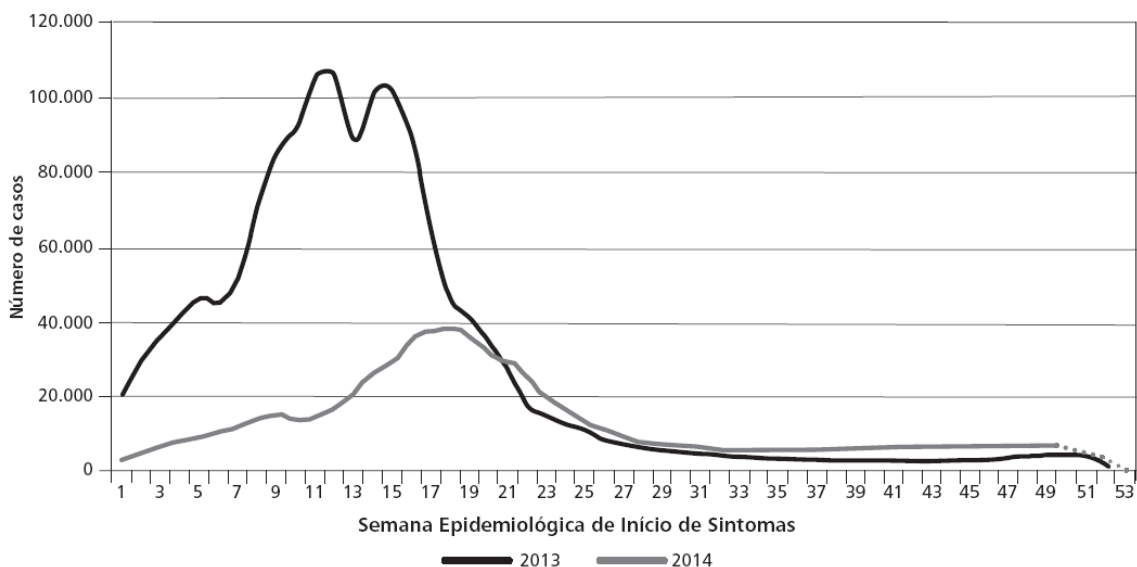


Figura 12- Casos prováveis de dengue por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2013^a e 2014^b. Fonte:^aSinan *online* (atualizado em 10/07/2014) para SE 52. ^bSinan *online* (consultado em 05/01/2015) para SE 01 a 53. Dados sujeitos à alteração.

Em 2014, o Brasil começou a adotar a nova classificação de casos de dengue da OMS. Da SE 01 até a SE 53, foram confirmados no país 689 casos de dengue grave e 8.150 casos com sinais de alarme. A região com maior número de registros de casos graves e com sinais de alarme é a região Sudeste

(285 graves; 6.042 com sinais de alarme), com a seguinte distribuição entre seus estados: São Paulo (191 graves; 4.975 com sinais de alarme), Minas Gerais (45 graves; 666 com sinais de alarme), Espírito Santo (29 graves; 313 com sinais de alarme) e Rio de Janeiro (20 graves; 88 com sinais de alarme). Houve também confirmação de 410 óbitos, o que representa uma redução no país de 39,0% em comparação com o mesmo período de 2013 (SVS/MS, 2015).

Foram enviadas 12.064 amostras para realização do exame de isolamento viral em 2014, sendo 3.807 positivas (31,6%). As proporções dos sorotipos virais identificados foram: 81,7% de DENV-1, seguido de 16,3% de DENV-4, 1,5% de DENV-2 e 0,5% de DENV-3 (SVS/MS, 2015). Esses dados confirmam a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV no país.

1.4.4.1- Cenário em Minas Gerais

A primeira notificação de dengue em Minas Gerais ocorreu em 1987. Até 1996, a doença restringiu-se a alguns municípios do interior. Nesse mesmo ano, foram confirmados os primeiros casos na Região Metropolitana de Belo Horizonte. Em 1998, Minas Gerais enfrentou sua primeira epidemia que atingiu todo o Estado e principalmente a Região Metropolitana de Belo Horizonte, sendo identificada a circulação de DENV-1 e 2. Essa região respondeu por 87% dos 147.418 casos notificados. No ano seguinte, ocorreu diminuição no número de casos seguida de nova tendência de aumento, culminando com o segundo pico epidêmico em 2002 (Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, SES-MG, 2009; Freitas *et al.*, 2011).

O ano de 2006, em relação a 2005, apresentou nova tendência de aumento de casos no Estado, principalmente nas regiões do Triângulo Mineiro, da capital e do Norte de Minas. Esse fato foi atribuído à introdução e circulação do DENV-3, à desmobilização político-administrativa dos programas municipais após as eleições de 2004, à descontinuidade das ações de controle vetorial e à desinformação da população sobre a necessidade de ações permanentes de prevenção (SES-MG, 2009).

Considerando que o município de Contagem, alvo desse estudo, apresenta áreas conurbadas com Belo Horizonte, assim como fluxo constante de pessoas para essa cidade, principalmente para fins de trabalho (deslocamento pendular), espera-se que o cenário epidemiológico observado seja semelhante em ambas às localidades. Em Belo Horizonte, foram notificados 86.883 casos em 1998. Em 1999 e 2000, houve redução do número de casos, seguida de aumento em 2001 e 2002, com a

introdução, neste último ano, de DENV-3. A entrada desse sorotipo do vírus trouxe elevado risco de nova epidemia no município, além da possibilidade de aumento da ocorrência de casos graves. Um novo aumento do número de casos da dengue foi registrado em 2006, ano considerado epidêmico (Freitas *et al.*, 2011).

Segundo a Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, a Fundação Ezequiel Dias (FUNED) comprovou a circulação simultânea de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 no Estado, por meio dos exames de isolamento viral realizados a partir de 2008 (SES-MG, 2015). Em 2010, considerado ano epidêmico, foram confirmados 194.636 casos, com 106 óbitos por dengue grave em Minas Gerais. Em Belo Horizonte, foram notificados 51.737 casos (Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, 2011).

A circulação de DENV-4 no Estado foi confirmada em setembro de 2011 por meio dos exames de isolamento viral realizados pela FUNED (SES-MG, 2015). Em 2013, foram confirmados 368.387 casos no Estado, maior número já registrado, caracterizando situação de epidemia, com 117 óbitos por dengue grave (SES-MG, 2014). Nesse ano, foram identificadas as seguintes proporções dos sorotipos de DENV em amostras de Minas Gerais encaminhadas para isolamento viral: 52,1% de DENV-1 e 47,9% de DENV-4 (SVS/MS, 2015).

Em Belo Horizonte, foram notificados 131.459 casos em 2013, dos quais 96.187 foram confirmados, bem como sete óbitos. Foi detectada a circulação de DENV-1 e DENV-4 (Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, 2013). Segundo a SES-MG, o grande número de casos notificados e confirmados em 2013 considerado sem precedentes, principalmente no primeiro semestre, está relacionado à introdução de um sorotipo não circulante no Estado (DENV-4), às condições climáticas observadas no período de novembro a maio, que são favoráveis ao ciclo biológico de mosquitos do gênero *Aedes* e a troca de gestão em grande parte dos municípios do Estado, o que contribuiu para certa desmobilização dos sistemas de saúde.

Em 2014, foram confirmados 49.360 casos de dengue e 49 óbitos em Minas Gerais (SES-MG, 2015). De janeiro a julho de 2014, foram identificadas as seguintes proporções dos sorotipos de DENV em amostras de Minas Gerais encaminhadas para isolamento viral: 88,2% de DENV-1, 11,5% de DENV-4 e 0,3% de DENV-3 (SVS/MS, 2015).

1.4.4.1.1- Cenário em Contagem

O município de Contagem localiza-se na Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, e tem por limite os seguintes municípios: Belo Horizonte, Betim, Esmeraldas, Ibirité e Ribeirão das Neves (Figura 13). De acordo com o censo demográfico de 2010, esse município possui 603.442 habitantes. Do total da população, 49% encontra-se na faixa etária dos adultos jovens (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2010). A região em que Contagem está situada apresenta clima marcado por sazonalidade térmica e pluviométrica, o que caracteriza o clima tropical de altitude. A principal característica desse clima é apresentar temperatura reduzida no inverno, época de estiagem prolongada. O verão coincide com o período chuvoso. O índice pluviométrico é de 1.497,3 mm anuais (Secretaria de Educação e Cultura de Contagem, 2009).

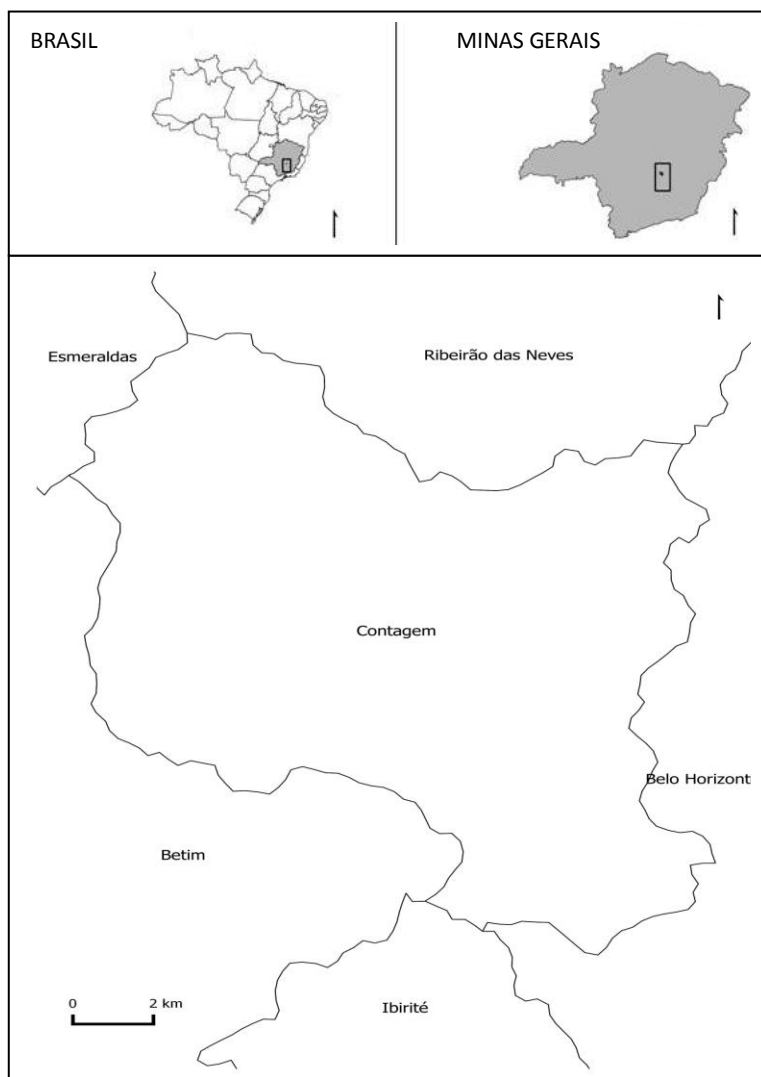


Figura 13- **Localização do município de Contagem.** O mapa foi confeccionado por meio do software QUANTUM GIS versão 2.0.1.

Contagem possui uma extensão geográfica de 195 Km² e 252.800 imóveis (Reconhecimento geográfico, 2013). Segundo a Lei Complementar 60 de 2009 do município, a cidade está dividida em sete distritos sanitários, a saber: Eldorado, Industrial, Nacional, Petrolândia, Ressaca, Sede e Vargem das Flores (Figura 14). O território referente à região administrativa Riacho está dividido entre os distritos sanitários Eldorado e Industrial.

Em fevereiro de 2009, a Secretaria Municipal de Saúde implantou o Comitê Municipal de Enfrentamento da Dengue, constituído por representantes das seguintes áreas técnicas de Vigilância em Saúde: Epidemiologia, Zoonoses, Vigilância Sanitária e Saúde Ambiental; e por representantes da Atenção Básica, da Urgência e Emergência, do Serviço de Atendimento Móvel de Urgência (SAMU), do Laboratório Central, do Apoio Diagnóstico e da Assistência Farmacêutica.



Figura 14- **Distritos sanitários do município de Contagem.** A região administrativa Riacho está dividida entre os distritos sanitários Eldorado e Industrial.

Fonte: <http://www.contagem.mg.gov.br/?hs=303766&hp=952618>.

A tabela 1 apresenta os casos de notificações da dengue segundo o ano e o distrito de residência em Contagem, de 2007 a 2014. O maior número de casos suspeitos de dengue (22.881 notificações) foi registrado no ano de 2013, considerado ano epidêmico, bem como o ano de 2010 (10.094 notificações). A tabela 2 mostra o número e percentual de casos confirmados dentre os notificados, de residentes em Contagem, de 2007 a 2014. Pode-se observar que 2013 tem o maior número de casos confirmados, que corresponde a 72,7% do total de casos notificados, seguido do ano de 2010. Considerando os óbitos por dengue que ocorreram no município no período de 2007 a 2014, os anos de 2010 e 2013 apresentaram o mesmo número de óbitos (03). No entanto, a taxa de letalidade, considerando os casos graves, foi maior em 2010 (Tabela 3). Em 2011, foi registrado um óbito.

Tabela 1- Notificações de dengue segundo ano de notificação e distrito de residência em Contagem, de 2007 a 2014.

Distrito	Ano								Total
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
INDUSTRIAL	165	374	404	1442	243	180	2835	214	5857
SEDE	212	196	243	866	282	141	2244	433	4617
ELDORADO	139	313	436	1316	429	227	4580	296	7736
RESSACA	219	633	1052	2753	415	229	5075	322	10698
PETROLÂNDIA	95	428	749	980	416	301	3349	364	6727
VARGEM DAS FLORES	92	63	123	1155	244	124	1601	174	3576
NACIONAL	122	310	416	1582	609	163	3197	183	6582
Total	1044	2317	3468	10094	2638	1365	22881	1986	45793

Fonte: SINAN *online*/ Gerência de Vigilância Epidemiológica (GEVEPI)/ Secretaria Municipal de Saúde/ Contagem. Nota: dados atualizados em 06/02/2015, sujeitos a alteração.

Tabela 2- Número de casos notificados e confirmados de dengue de residentes em Contagem, de 2007 a 2014

Ano	Casos notificados	Casos Confirmados (%)
2007	1044	464 (44,4)
2008	2317	562 (24,3)
2009	3468	1468 (42,3)
2010	10094	5482 (54,3)
2011	2638	361 (13,7)
2012	1365	161 (11,8)
2013	22881	16636 (72,7)
2014	1986	615 (31)

Fonte: SINAN *online* / GEVEPI/ Secretaria Municipal de Saúde/ Contagem

Nota: dados atualizados em 06/02/2015, sujeitos a alteração.

Tabela 3- Óbitos por dengue e letalidade segundo ano de início de sintomas em Contagem, de 2007 a 2014.

Ano	Óbitos	Letalidade
2007	-	-
2008	-	-
2009	-	-
2010	3	14,28%
2011	1	11,11%
2012	-	-
2013	3	9,68%
2014	-	-
Total	7	-

Fonte: SINAN *online*/ GEVEPI/ Secretaria Municipal de Saúde/ Contagem. Nota: dados atualizados em 06/02/2015, sujeitos a alteração.

Foi construído o diagrama de controle para avaliação do número de casos suspeitos no ano de 2013. O mesmo evidencia a epidemia ocorrida no município, pois observa-se que a curva do número de casos suspeitos em 2012-2013 está acima do terceiro quartil. O número de casos suspeitos notificados em 2013-2014 foi considerado dentro do esperado, pois situa-se entre o primeiro e o

terceiro quartil (Figura 15). Cabe ressaltar que a epidemia de 2013 foi a de maior proporção em relação às anteriores (2006, 2010).

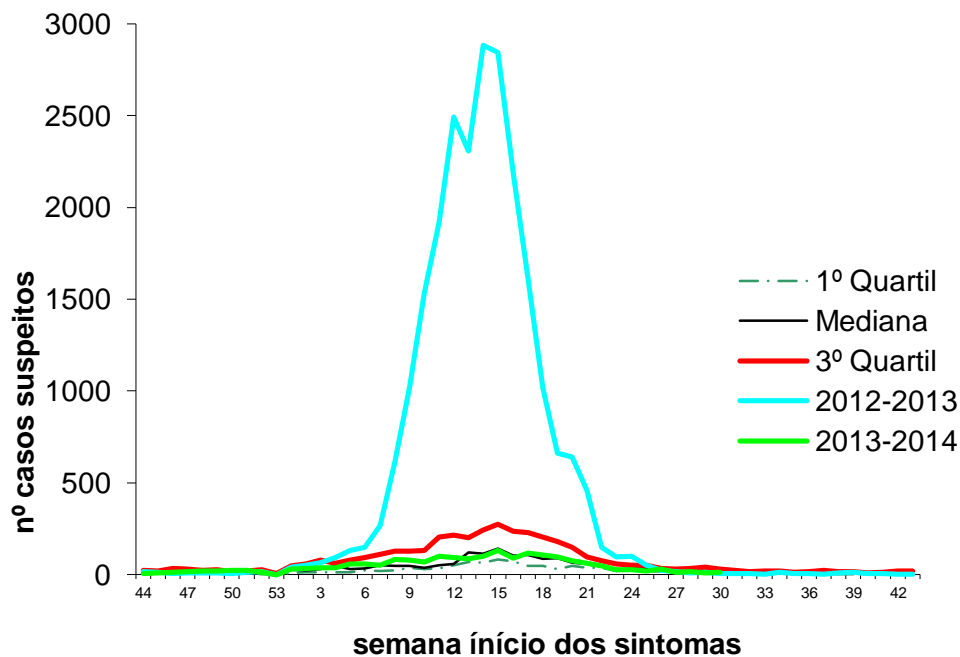


Figura 15- **Diagrama de controle da dengue de 2013 e 2014**, com base no número de casos suspeitos com referência em 2007-2012, excluído 2010. Fonte: SINAN *online*/GEVEPI/ Secretaria Municipal de Saúde/ Contagem. Nota: dados atualizados em 06/08/2014 sujeito a alterações.

Por meio de isolamentos virais realizados pela FUNED, foi detectada a circulação de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em 2009. Em 2010, três das amostras analisadas eram de DENV-1 e uma de DENV-4. Em 2011, as duas amostras submetidas ao isolamento viral eram de DENV-1. Em 2012 e 2013, foi detectada a circulação de DENV-1 e DENV-4. Em 2014, a única amostra analisada era de DENV-1 (Tabela 4). É possível observar que, apesar de todos os sorotipos de DENV terem sido detectados no período de 2009 a 2014, em nenhum ano dessa série eles foram detectados simultaneamente.

Tabela 4- Sorotipos de DENV isolados de residentes em Contagem, de 2007 a 2014

Ano	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
2007	-	-	-	-
2008	-	-	-	-
2009	1	1	1	-
2010	3	0	0	1
2011	2	0	0	0
2012	1	-	-	1
2013	3	-	-	1
2014	1	-	-	-
Total	11	1	1	3

Fonte: SINAN *online* / GEVEPI/ Secretaria Municipal de Saúde/ Contagem

Nota: dados atualizados em 06/02/2015, sujeitos a alteração.

A tabela 5 apresenta os Índices de Infestação Predial (IIP) gerados a partir de Levantamentos de Índice Rápido de *Aedes aegypti* (LIRAA) realizados em Contagem, de 2008 a 2014. Quando o índice é menor que 1%, considera-se baixo risco de epidemia; de 1 a 3,9%, médio risco e maior que 3,9%, alto risco, sinalizando estado de alerta. Pode-se observar que, apesar de 2013 ter sido um ano epidêmico, os IIP obtidos foram relativamente baixos. Apenas o índice obtido para o mês de março situa-se na faixa de médio risco de epidemia, o que demonstra a importância da utilização de outras estratégias para monitoramento do vetor e de DENV, além do LIRAA.

Tabela 5- Índices de Infestação Predial (IIP) em % obtidos em LIRAA's realizados no município de Contagem de 2008 a 2014

Mês de realização	Ano						
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Janeiro	1,3	1,3	2,4	2,9	1	0,9	1
Março	2,2	0,5	2,4	2,4	0,2	1,4	1,4
Outubro	0,9	1,1	0,6	0,8	0,4	0,6	0,2

Fonte: Gerência de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde/ Contagem

2- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Atualmente, a dengue é a mais importante infecção viral transmitida por mosquitos para seres humanos do mundo. De acordo com a OMS, bilhões de pessoas estão sob risco de infecção, principalmente nos países de clima tropical. O número de hospitalizações em decorrência desse agravo é elevado bem como as taxas de óbito em determinadas regiões, em consequência principalmente das formas mais graves. Até o momento, não há vacina ou terapia específica para a dengue. Dessa forma, a única medida de controle da doença é o combate ao vetor. Esse cenário demonstra o significativo impacto da dengue nos sistemas de saúde e justifica sua relevância no contexto da saúde pública no mundo e no Brasil.

O agente etiológico da dengue é o *Dengue virus* (DENV). Em ambientes urbanos, os DENV são transmitidos entre hospedeiros humanos por mosquitos do gênero *Aedes*, com destaque para *A. aegypti* e *A. albopictus*. Ambos são adaptados a esse tipo de ambiente, onde obtêm alimento por meio do homem e de animais domésticos, e realizam a oviposição em recipientes que acumulam água. *A. aegypti* é considerado o principal vetor na reemergência global das epidemias da dengue, especialmente nas Américas. A dengue tem se disseminado para as regiões tropicais e sub-tropicais do mundo devido a maior frequência de deslocamento humano, urbanização descontrolada, aquecimento global, falta de um efetivo controle do vetor e a expansão dos nichos de *Aedes* spp.

No Brasil, as condições sócio-ambientais são favoráveis à expansão do *A. aegypti*. Esse mosquito foi erradicado do país, mas foi posteriormente reintroduzido, o que favoreceu a disseminação de DENV. Além disso, *A. albopictus* também é encontrado em praticamente todo o território nacional. Atualmente, a dengue ocorre de forma endêmica, intercalando-se com epidemias. A situação epidemiológica é caracterizada pela co-circulação dos quatro sorotipos de DENV.

O município de Contagem, situado em Minas Gerais, apresenta áreas conurbadas com outros municípios, dentre eles Belo Horizonte, alta densidade demográfica, considerável grau de urbanização e fluxo constante de pessoas (deslocamento pendular), o que propicia a disseminação do vetor e elevada circulação viral. Em 2013, foi registrado o maior número de notificações de casos de dengue (22.881) e três óbitos, caracterizando situação de epidemia. Tendo em vista esse contexto, o presente trabalho se propôs a identificar os sorotipos de DENV que infectaram mosquitos adultos e larvas de *A. aegypti*, bem como indivíduos em Contagem, nos anos de 2013 e 2014.

A detecção do DENV em larvas e mosquitos de campo, bem como a caracterização da dinâmica da circulação do vírus são informações essenciais para a vigilância epidemiológica, que podem auxiliar na prevenção de epidemias pelas autoridades de saúde pública. Diante das dificuldades no controle da dengue, esse estudo permitirá o monitoramento da circulação de DENV no vetor e em humanos, numa mesma área geográfica, no período de um ano, bem como a correlação da presença do vetor com a transmissão da dengue, de forma a subsidiar programas mais eficientes de vigilância entomológica, associados à vigilância virológica, principalmente em função da introdução ou reintrodução de sorotipos ou genótipos de DENV. Nesse contexto, o uso de métodos de identificação do vírus, de monitoramento da presença do vetor e o georreferenciamento constituem importantes ferramentas norteadoras de medidas de prevenção e controle a serem adotadas pelos serviços de saúde.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Detectar e identificar *Dengue virus* em amostras de pacientes com suspeita clínica de dengue, em larvas de *Aedes aegypti* coletadas em LIRAA's e em mosquitos adultos *Aedes aegypti*, no município de Contagem, MG.

3.2- Objetivos específicos

- Verificar a distribuição geográfica dos sorotipos de *Dengue virus* identificados em amostras clínicas de humanos, larvas e mosquitos adultos *Aedes aegypti* em Contagem, MG;
- Determinar o genótipo dos *Dengue virus* identificados;
- Determinar a espécie em que fêmeas de *Aedes aegypti* ingurgitadas com sangue realizaram repasto sanguíneo;
- Estabelecer a relação filogenética das amostras de DENV;
- Contribuir com o setor de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Saúde de Contagem para o fechamento de casos abertos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN);

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Obtenção das amostras

4.1.1- Amostras clínicas de humanos

Foram analisadas 49 amostras de plasma, obtidas a partir da centrifugação de tubos contendo sangue total e anticoagulante, de pacientes com suspeita clínica de Dengue, atendidos na Unidade de Pronto Atendimento (UPA) Geraldo Pinto Vieira (GPV), localizada no distrito sanitário Eldorado, Contagem, Minas Gerais. Essas amostras foram coletadas pela própria equipe da unidade de saúde durante o mês de maio de 2013, semanas epidemiológicas 19, 20, 21 e 22, armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C e, posteriormente, enviadas ao Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/ UFMG), onde foram estocadas a -70°C até o processamento. Não foram observados faixa etária, sexo, cor, classe ou grupo social como critério para coleta do material clínico do indivíduo. Por envolver manipulação de amostras clínicas humanas, esse projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG e aprovado, segundo parecer consubstanciado anexo. Os pacientes, antes da coleta, receberam e assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) adequado a faixas etárias, consentindo com a realização do procedimento.

4.1.2- Amostras de larvas e mosquitos do gênero *Aedes*

Foram coletados 28 *pools* de larvas de *A. aegypti* de até 10 indivíduos, o que totalizou 177 larvas, durante a realização do Levantamento de Índice Rápido de *Aedes aegypti* (LIRAA), nos meses de março e outubro de 2013 e janeiro de 2014 (semanas epidemiológicas 11 e 43 de 2013 e 02 de 2014), no distrito sanitário Eldorado, em Contagem. Nos LIRAA's de março e outubro de 2013, foram coletados 15 e sete *pools* de larvas, respectivamente, enquanto que no LIRAA de janeiro de 2014 foram coletados seis *pools* de larvas. As larvas foram coletadas pelos agentes de combate a endemias (ACE) do referido distrito e acondicionadas em tubos contendo solução de *RNA lather* para preservação do RNA viral. Em seguida, os *pools* foram encaminhados ao Laboratório de Vírus do ICB/UFMG para identificação e processamento das larvas.

Para a captura de mosquitos, foi utilizada a armadilha BG Sentinela (BGS) (Figura 16), instalada em imóveis selecionados no distrito sanitário Eldorado, em Contagem, de acordo com as instruções

do fabricante (Biogents, Regensburg, Germany). A BGS foi desenvolvida no Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade Regensburg (Alemanha) em parceria com o Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores do ICB/UFMG. Esta armadilha utiliza um mecanismo de sucção para captura de mosquitos, sendo específica para fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* à procura de hospedeiro para realização de repasto sanguíneo (Kröckel *et al.*, 2006).

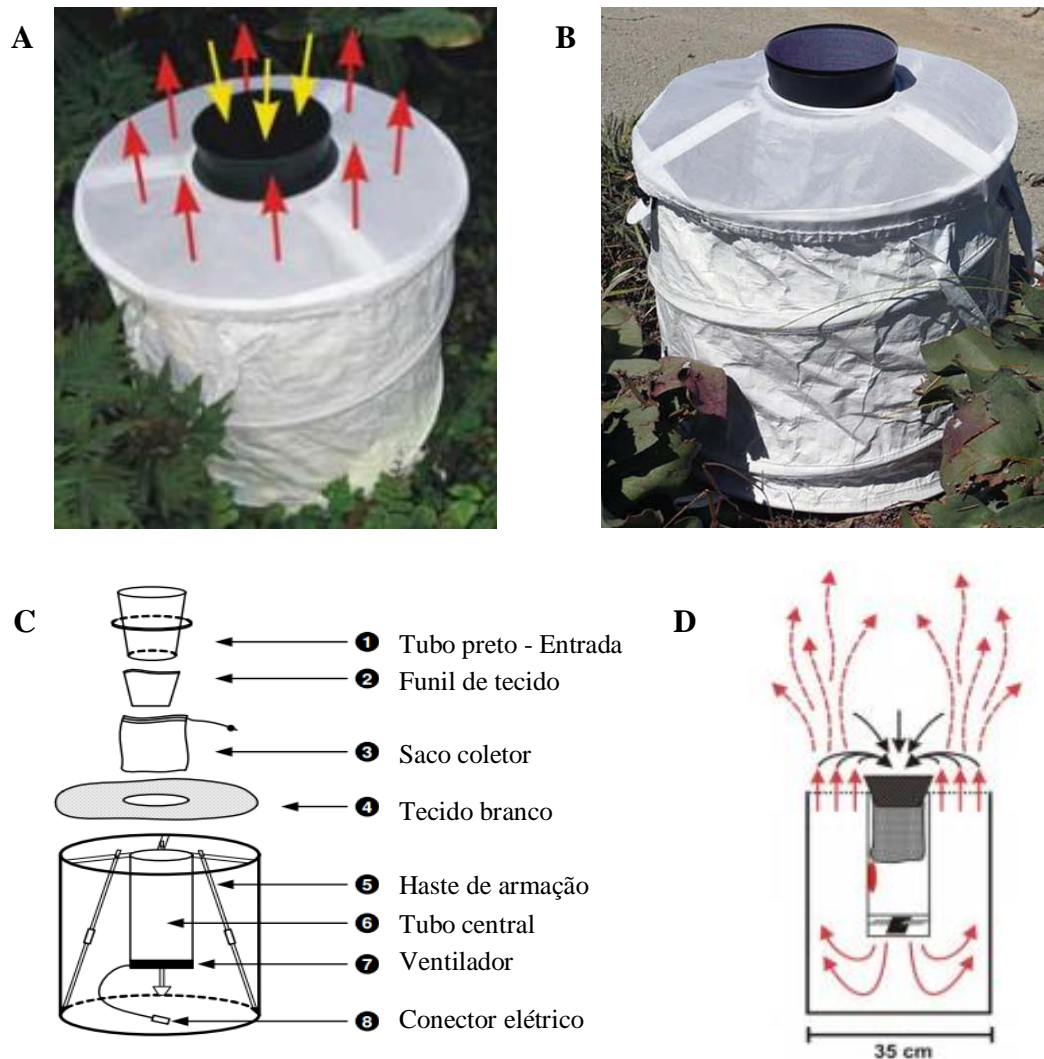


Figura 16- **Armadilha BG Sentinel**®. A-B: Fotografias da armadilha em campo; C: Partes componentes da armadilha; D: Diagrama funcional da armadilha (setas indicam direção das correntes de convecção formadas pelo ventilador no interior da armadilha) (Biogents, 2006).

A armadilha é composta por um cilindro de lona branca, de 60 cm de altura por 35 cm de diâmetro, coberto por tecido branco. Possui um tubo central e no seu interior um ventilador que funciona por energia elétrica (12 volts). O fluxo produzido pelo ventilador faz com que os mosquitos adjacentes à armadilha sejam sugados para seu interior, onde são armazenados em um saco coletor. O saco

coletor é posicionado acima do ventilador, o que evita que os exemplares capturados sofram danos ao passar através das hélices, garantindo assim que a estrutura dos mesmos seja preservada. O ar sugado pelo ventilador sai através do tecido, gerando correntes ascendentes similares às correntes de convecção formadas por um hospedeiro humano, quanto à direção e estrutura geométrica. O estímulo visual (contraste entre as cores preto e branco) também constitui estímulo atrativo para as fêmeas (Kröckel *et al.*, 2006) (Figura 16).

O atraente BG-Lure® (BGL) (BioGents GmbH) é um composto de substâncias não-tóxicas encontradas no suor humano como amônia, ácido lático e ácido caprótico. A adição desse atraente à BGS confere à armadilha composição química semelhante à de um hospedeiro humano, o que constitui estímulo para atrair fêmeas do gênero *Aedes* (Geier *et al.*, 1999). No entanto, neste trabalho não foi utilizado esse atraente.

As coletas foram realizadas nos meses de janeiro, fevereiro, março, abril e junho de 2013, semanas epidemiológicas 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17 e 25. Os critérios para seleção dos imóveis onde houve colocação de armadilhas foram: residência de paciente com suspeita de dengue ou confirmado (casos autóctones), presença de formas aladas (queixa dos próprios residentes ou denúncia), presença de formas imaturas de mosquito (larvas e pupas) ou ponto estratégico (PE – imóvel com grande quantidade de material propício à desova do vetor). Todos os imóveis localizam-se no distrito sanitário Eldorado, em Contagem. As armadilhas foram instaladas após consentimento dos residentes ou responsáveis pelo imóvel, que assinaram TCLE. As armadilhas permaneceram ligadas em baterias de 12 volts por 24 horas. Após este período, as mesmas foram desarmadas e os sacos coletores de insetos conduzidos ao Laboratório de Vírus do ICB/UFMG.

4.2- Identificação de larvas e mosquitos do gênero *Aedes*

As larvas foram identificadas por meio de características morfológicas das escamas no VIII segmento, do pécten no sifão e a presença de espinhos laterais no tórax. Larvas de *A. aegypti* apresentam escamas do pente do segmento VIII com um espinho longo mediano, com dentes bilaterais, enquanto larvas de *A. albopictus* apresentam escamas do pente do segmento VIII com aspecto de um único espinho longo, sem dentes laterais, apenas com pequena serrilha ou franja nas bases laterais (Consoli e Oliveira, 1994) (Figura 17). Larvas de *A. aegypti* apresentam espinhos laterais proeminentes no tórax, enquanto nas larvas de *A. albopictus* essa estrutura está presente,

mas é menos protuberante (FUNASA, 2001) (Figura 18). Após a identificação, as larvas foram contadas, acondicionadas em *RNA latter* e estocadas a -70°C até o processamento.

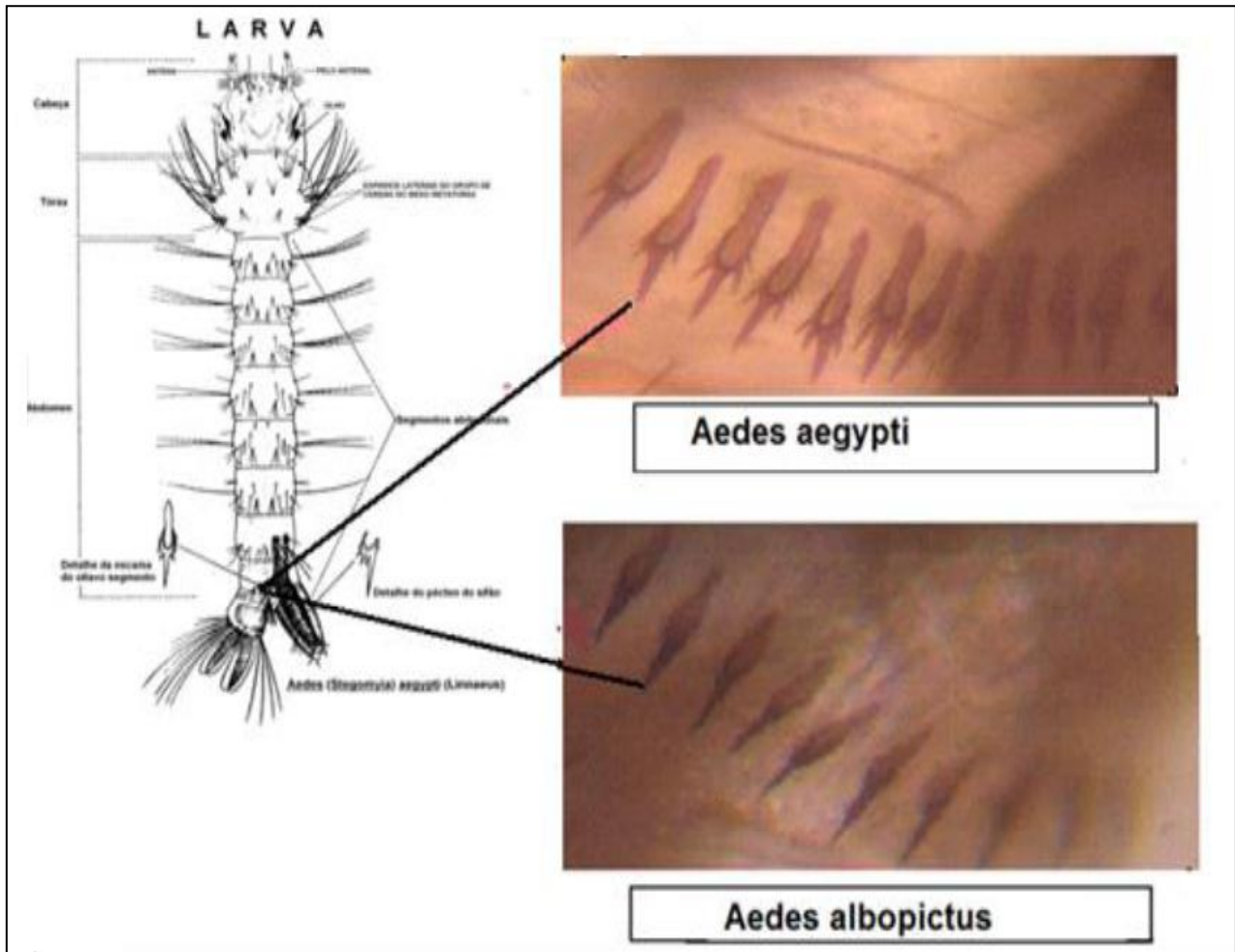


Figura 17 – **Diferenças morfológicas das escamas do VIII segmento do abdômen entre larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*.** Aumento de 100x. As larvas foram identificadas por meio de características morfológicas das escamas no VIII segmento. Larvas de *A. aegypti* apresentam escamas do pente do segmento VIII com um espinho longo mediano, com dentes bilaterais, enquanto larvas de *A. albopictus* apresentam escamas do pente do segmento VIII com aspecto de um único espinho longo, sem dentes laterais, apenas com pequena serrilha ou franja nas bases laterais. Fonte: cedido por Daniela Pádua Jardim.

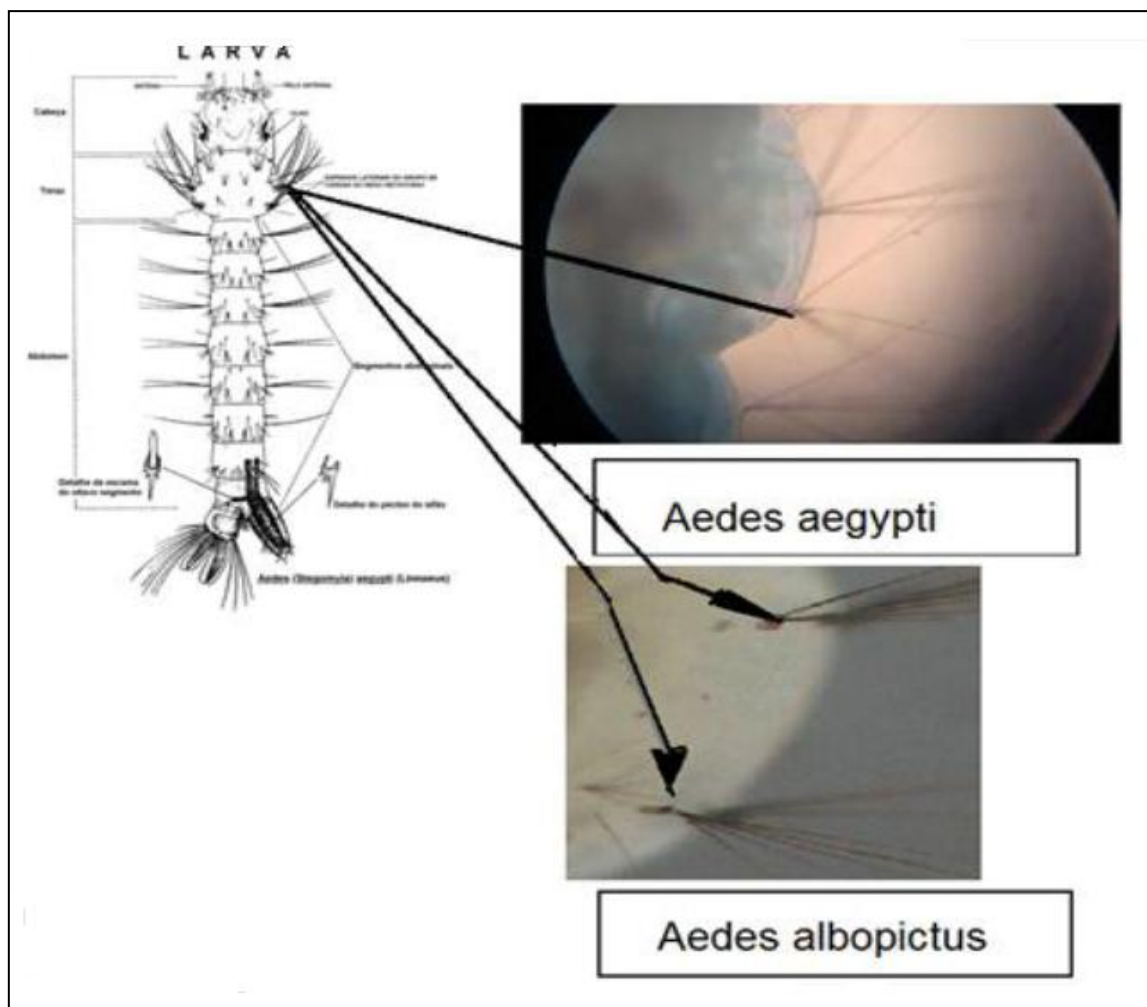


Figura 18– **Diferenças morfológicas do tórax entre *A. aegypti* e *A. albopictus***. Aumento de 100x. Larvas de *A. aegypti* apresentam espinhos laterais proeminentes no tórax, enquanto nas larvas de *A. albopictus* essa estrutura está presente, mas é menos protuberante. Fonte: cedido por Daniela Pádua Jardim.

A. aegypti e *A. albopictus* adultos são escuros, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais. *A. aegypti* possui mesonoto ornamentado com escamas branco-prateadas formando desenho em forma de lira (Figura 19A). Nos espécimes mais velhos, o desenho da lira pode desaparecer, mas dois tufos de escamas branco-prateadas no clipeo, escamas claras nos tarsos e palpos permitem a identificação da espécie. *A. albopictus* apresenta mesonoto com faixa longitudinal de escamas prateadas e toro com tufo de escamas prateadas, internamente (Figura 19B). O macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos (Consoli e Oliveira, 1994; FUNASA, 2001) (Figura 20).

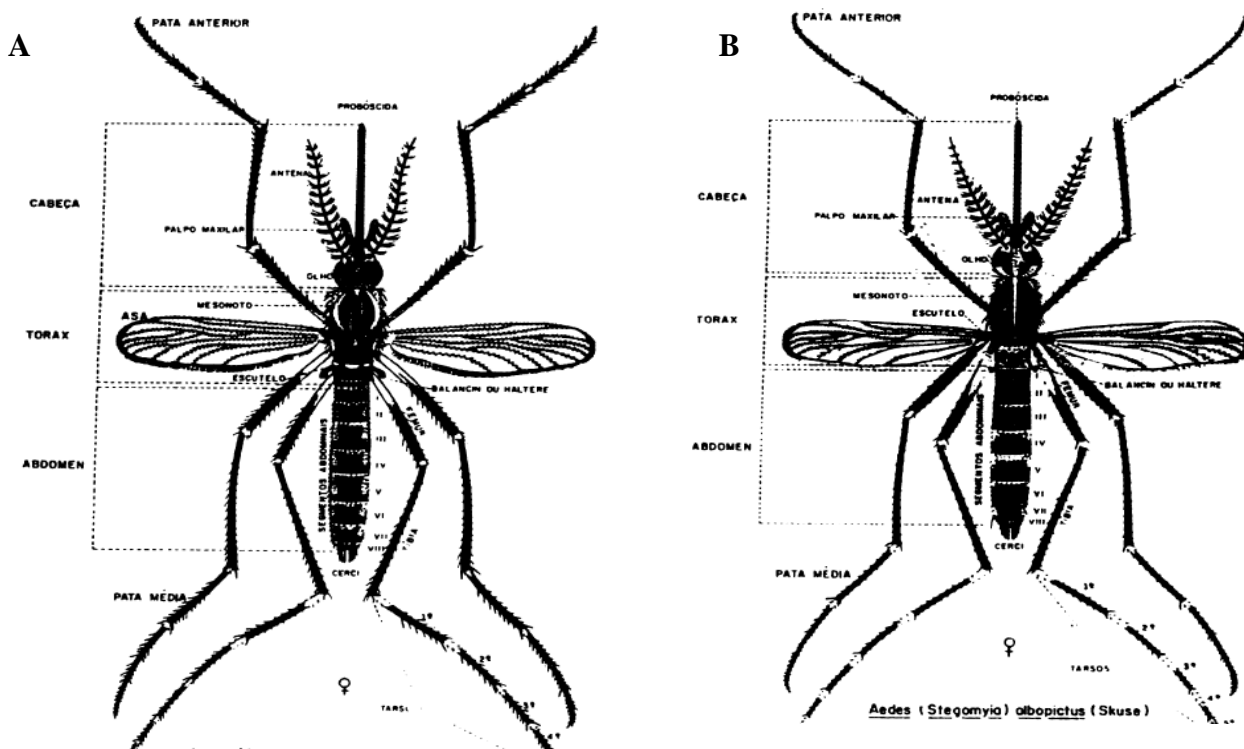


Figura 19- Morfologia externa de adultos do gênero *Aedes*. *A. aegypti* e *A. albopictus* adultos são escuros, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais. *A. aegypti* possui mesonoto ornamentado com escamas branco-prateadas formando desenho em forma de lira, evidenciadas pela seta (A). *A. albopictus* apresenta mesonoto com faixa longitudinal de escamas prateadas, que está indicada pela seta (B). Fonte: FUNASA, 2001 e Pessoa *et al.*, 2013.

Após a identificação, os mosquitos coletados foram agrupados por sexo, local de coleta e data (SE) e foram acondicionados em freezer a -70°C até o processamento.

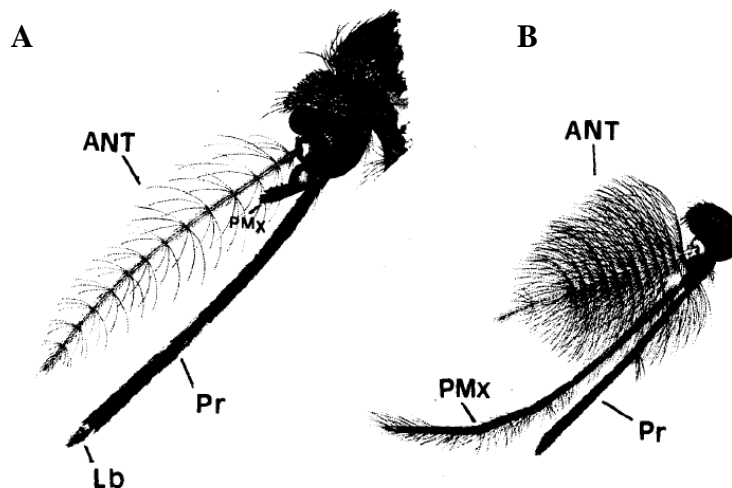


Figura 20- Aspectos da morfologia externa do adulto – cabeça vista lateral. A- Fêmea de Culicinae; B- Macho de Culicinae. O macho se distingue da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. ANT- antena; PMx- palpo maxilar; Pr- probóscide; Lb- Labela; Fonte: Consoli e Oliveira, 1994.

4.3- Maceração de larvas e mosquitos

As larvas e mosquitos processados em *pools* de até dez indivíduos foram macerados com micropistilo de plástico estéril em 300 μ L de PBS 1X estéril e homogeneizados em vortex por 15 segundos. Os macerados foram então centrifugados a 12.000g por 30 minutos a 4°C (Sorvall RT-6000 B). Foi então retirada alíquota de 140 μ L para extração de RNA viral e o restante do volume armazenado a -70°C.

Os mosquitos processados individualmente foram macerados com micropistilo de plástico estéril em tubos cônicos de 1,5 mL contendo 250 μ L de reagente Trizol[®] (Invitrogen, EUA).

4.4- Extração de RNA total das amostras de plasma e macerados de *pools* de larvas e mosquitos

A extração de RNA das amostras de plasma e macerados de *pools* de larvas e mosquitos foi feita utilizando-se o kit comercial QIAmp[®] Viral RNA (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Um volume de 140 μ L de cada amostra foi lisado pela solução tampão AVL, aplicados a uma coluna com afinidade para o RNA e submetidos a uma centrifugação de 8000 g (rotor 5417R, Eppendorf, Alemanha), por um minuto. O material foi então lavado duas

vezes: uma com a solução tampão AW1 e outra com a solução tampão AW2. Após a lavagem, os RNAs foram eluídos das colunas pela solução AVE e utilizados como moldes para a síntese de DNA complementar (cDNA). O volume restante foi estocado a -70°C .

4.5- Extração de RNA total dos macerados de mosquitos processados individualmente

A extração de RNA total dos macerados de mosquitos foi realizada pelo método do Trizol. Após homogeneização dos macerados de mosquito em reagente Trizol[®] e incubação a 37°C por 5 minutos, foram adicionados ao microtubo 50 μL de clorofórmio. A mistura foi novamente homogeneizada e incubada a 37°C por 3 minutos e centrifugada a 12000 g a 4°C por 15 minutos. A parte aquosa foi transferida para um novo microtubo contendo 10 ng de glicogênio (polissacarídeo utilizado como carreador do RNA ajudando a sedimentá-lo) e, à mesma, foram adicionados 250 μL de isopropanol. Ao término da homogeneização e incubação por 10 minutos a 37°C , o microtubo foi novamente centrifugado a 12000 g a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante desprezado com cuidado para não descartar o sedimento de RNA. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 75% e, após centrifugação a 7500 g a 4°C por 5 minutos, o etanol foi descartado e o microtubo deixado aberto para secagem do sedimento. O RNA foi homogeneizado em 10 μL de água livre de RNAses e imediatamente utilizado como molde para a síntese de cDNA. O volume restante foi estocado em freezer -70°C .

4.6- Síntese de cDNA

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), foi utilizado iniciador randômico (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Uma pré-mistura contendo 1 a 5 μg de RNA e 5 μL de iniciador randômico (0,5 μg) foi incubada a 70°C por cinco minutos. No caso de mosquitos, foi utilizado cerca de 100 ng a 1 μg de RNA. Em seguida, os tubos contendo essa pré-mistura foram submetidos a banho de gelo por cinco minutos. Uma segunda mistura contendo 5 μL de tampão 5x (250 mM Tris pH 8,3 375 mM KCl, 15 mM MgCl), 1,25 μL de dinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (25 mM) e 1 μL de transcriptase reversa M-MLV (200U) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA) e 2,75 μL de água foi adicionada à pré-mistura inicial e as amostras foram incubadas a 37°C por uma hora e, em seguida a 70°C por dez minutos para a inativação da enzima. Os cDNA's foram armazenados a -20°C até serem submetidos a amplificação por reação em cadeia pela polimerase (PCR).

4.7- PCR

Foram utilizadas estratégias diferentes para realização da PCR de acordo com a amostra analisada. Para os plasmas, foi feita somente semi-Nested PCR, descrita no item 4.7.2, enquanto que, para larvas e mosquitos, foi procedida uma triagem com PCR em tempo real (qPCR), descrita no item 4.7.1. Para as amostras consideradas suspeitas no qPCR, foi feita a semi-Nested PCR para confirmação (item 4.7.2).

4.7.1- PCR em tempo real (qPCR)

Para a amplificação de regiões do genoma de DENV por qPCR, utilizou-se iniciadores específicos desenhados para as regiões 5'UTR de cada sorotipo no caso das larvas, e para a região do capsídeo, no caso de mosquitos. Um par de iniciadores foi desenhado para o gene que codifica a proteína ribossomal L32 (Rpl32) de *Aedes* sp. Os oligonucleotídios iniciadores utilizados estão representados na tabela 6.

A qPCR foi feita utilizando-se o kit comercial SYBR[®] Green I (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), no aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com o programa padrão: 94°C por 1 minuto, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos e 60°C por 15 segundos, acrescido do passo do cálculo da temperatura de *melting* (T_m). Para a mistura das reações de amplificação foram utilizados 2,0 µL de cDNA, 5,0 µL de Mix Syber Green, 0,5 µL de mistura de iniciador senso e antisenso, cada um a 10 pmol, e H₂O ultra pura q.s.p. 10 µL. Para mosquitos, foi utilizado cDNA diluído 1:10. As reações foram feitas em duplicata, em placa de 48 poços. Como controles positivos das reações, foram utilizados cDNA's obtidos de larvas e mosquitos sabidamente positivos para DENV e como controle negativo, foi utilizado água de injeção.

Tabela 6- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção das regiões 5'UTR e capsídeo dos sorotipos de DENV e para a proteína ribossomal L32 de *Aedes* sp. por RT-qPCR

Sorotipo	Iniciador	Região	Sequência (5' - 3')
DENV-1, 3, 4	5UTR F C267R	5'UTR	TGATGAACAACCAACGGAAAAAG TTCCTGCTGTTGGGGGTATGG
DENV-2	DV-2UL DV-2UR	5'UTR	AAGCTCAACGTTAGTTCTAACAGTTTTT GCCTTTTTCCGTTGGTTATTC
DENV-1, 2, 3, 4	C14F C69R	Capsídeo	AATATGCTGAAACGCGAGAGAAAACC CCCATCTCITCAIATCCCCTGCTGTTGG*
Espécie	Iniciador	Região	Sequência (5' - 3')
<i>A. aegypti</i>	A.aegL32- 43Left	Proteína	AGCCGCGTGTTGTACTCTG
	A.aegL32- 112Right	Ribossomal RPL32	ACTTCTTCGTCGCTTCTTG

*I- Deoxinosinas

4.7.2- Semi-nested PCR

As amostras de cDNA foram submetidas à PCR, visando amplificar a região C-prM do genoma de DENV, conforme metodologia proposta por Lanciotti *et al.*, 1992, com modificações. Os oligonucleotídios iniciadores utilizados estão representados na tabela 7.

Para a mistura das reações de amplificação foram utilizados 2,5 µL de cDNA, 2,5 µL de tampão 10X, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador D1 e D2 (Tabela 4), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTP's (10 mM), 0,25 µL de Taq polimerase (Promega) (5U/ µL) e e H₂O ultra pura q.s.p. 25 µL.

Como controles positivos das reações, foram utilizados cDNA's obtidos de amostras clínicas de humanos, larvas e mosquitos sabidamente positivos para DENV e como controle negativo, foi utilizado água de injeção. As amplificações foram feitas em termociclador (Eppendorf, EUA), seguindo as seguintes variações de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94° C, por 45 segundos; pareamento a 58° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto.

Na reação "semi-nested", foram utilizados os iniciadores D1, TS1, TS2, TS3 e TS4 (PCR Multiplex) para amplificação dos fragmentos específicos de cada sorotipo de DENV. Foram utilizados 2,5 µL do produto da primeira reação diluído a 1:100 (plasmas), 1:20 (*pools* de larvas) e

1:50 (mosquitos), 2,5 µL de tampão 10X, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (D1, TS1, TS2, TS3 e TS4, Tabela 4), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTP's (10 mM), 0,25 µL de Taq polimerase (5U/ µL) e H₂O ultra pura q.s.p. 25 µL. Os ciclos de amplificação foram os mesmos utilizados para a primeira reação de PCR, diferenciando-se apenas a temperatura de pareamento, que foi de 60°C.

Com o intuito de se obter fragmentos de DNA maiores para sequenciamento, também foi feita uma semi-nested PCR alternativa, em que a primeira reação é idêntica a descrita acima e a segunda reação foi conduzida utilizando-se os iniciador *forward* D1.1 (Tabela 7) e *reverse* D2. Esses iniciadores permitem a amplificação de um produto de 490 pb da região C-prM do genoma de DENV (Vilela *et al.*, 2010).

Tabela 7- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da região C-prM do genoma de DENV por RT-semi-nested PCR

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)
D1*	TCAATATGCTGAAACGCGCGGAGAACCG	511
D2**	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	490 (D1.1 e D2), 511 (D1 e D2)
TS1**	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482 (D1 e TS1)
TS2**	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119 (D1 e TS2)
TS3**	TAACATCATCATGAGACAGAGG	290 (D1 e TS3)
TS4**	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392 (D1 e TS4)
D1.1*	CGAGAAACCGCGTGTC AAC	490

*Iniciador *forward*; **Iniciador *reverse*. Fonte: Lanciotti *et al.*, 1992

4.7.3- PCR para identificação das espécies em que fêmeas de *A. aegypti* realizaram repasto sanguíneo

Para a verificação dos hospedeiros em que as fêmeas de *A. aegypti* coletadas realizaram repasto sanguíneo, foi utilizada a PCR para detecção das regiões ribossomais 12S e 16S do DNA mitocondrial de vertebrados, seguida do sequenciamento dos produtos amplificados (Kitano *et al.*, 2007). Para as amplificações, foram utilizados cDNAs das amostras de mosquitos de campo visualizadas com repasto sanguíneo diluídos 1:10, os iniciadores para as regiões 12S (L – 5'-CCC

AAA CTG GGA TTA GAT ACC C-3' e R – 5'- GTT TGC TGA AGA TGG CGG TA-3') e 16S (L – 5'-GCC TGT TTA CCA AAA ACA TCA C-3' e R– 5'- CTC CAT AGG GTC TTC TCG TCT T-3'). As reações foram feitas em termociclador Eppendorf, modelo Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler, seguindo as seguintes variações de temperatura: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 57°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; e uma extensão final de 72°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C.

4.8- Fracionamento dos produtos de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de PCR foram fracionados em gel de poliacrilamida 8% (1,86 mL de acrilamida/bisacrilamida, na proporção de 29:1, 1,40 mL de Tris Borato Ácido etilenodiaminotetracético [TBE], 10% de persulfato de amônio [PSA], 7 µL de tetrametiletilenodiamina [TEMED] e 3,74 mL de H₂O). O fracionamento foi feito a 100 V, por uma hora, em tampão de corrida TBE 1X (0,089M TRIS-ACETATO, 0,089M ácido bórico, 0,002M Ácido etilenodiaminotetracético). Para a coloração, foi empregado o método com o nitrato de prata conforme protocolo descrito pelo fabricante (BIORAD): os géis foram fixados em solução fixadora A (40% metanol, 10% ácido acético, v/v) e solução fixadora B (10% etanol, 5% ácido acético v/v) seguida de incubação com solução oxidante (bicromato de potássio 0,034 M, ácido nítrico 0,032 M) por 5 minutos. Os géis foram corados com nitrato de prata (0,6 g/300 ml de água) por 20 minutos e lavados com água deionizada por 1 minuto, acrescentando-se posteriormente a solução reveladora (5,9 gramas de carbonato de sódio, 0,1 gramas de paraformaldeído em 200mL de água) por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido acético 5% e os fragmentos visualizados e fotografados.

4.9- Purificação dos produtos de PCR

Para purificação dos produtos de PCR, foram utilizadas duas estratégias: solução de polietileno glicol (PEG) 8000 20%, 2,5 M NaCl, e o Kit MinElute PCR Purification (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

A purificação utilizando-se a solução de PEG 8000 20%, 2,5 M NaCl, baseou-se no protocolo descrito por Rosenthal e colaboradores, 1993, com algumas modificações. Ao volume do produto de PCR, foi adicionado o mesmo volume da solução de PEG 8000. Tal mistura foi homogeneizada

em vortex e então incubada a 37°C por 15 minutos. Após incubação, o produto foi então centrifugado a 14.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 80% gelado, o sobrenadante descartado e o sedimento seco a 37°C. Para ressuspensão do DNA purificado, foram adicionados 12 µL de água ultra pura estéril. Posteriormente, o DNA eluído foi incubado em banho-maria a 37°C por 15 minutos.

A purificação dos produtos de PCR utilizando o MinElute PCR Purification Kit foi procedida de acordo com as instruções do fabricante. Ao volume do produto de PCR, foi adicionado cinco vezes o volume do tampão PB e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, a mistura foi transferida para uma coluna MinElute e centrifugada por um minuto a 10.000g. Em seguida, foram então adicionados 750 µL do tampão PE e realizada nova etapa de centrifugação. Para eluição do DNA, 10 µL do tampão EB (10 mM TrisCl, pH 8,5) foram adicionados à coluna MinElute, seguido de centrifugação a 10.000g por um minuto. Esse procedimento foi realizado duas vezes.

Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados em Nanodrop (Nanodrop[®], ND-1000 Spectrophotometer, EUA) a 260 nm.

4.10- Sequenciamento

O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi descrito por Sanger *et al.*, 1977, em sequenciador automático capilar ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o kit “ABI Prism R Big Dye M Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Aproximadamente 10 ng do DNA de cada amplicon purificado foram utilizados em cada reação de sequenciamento, acrescidos dos respectivos iniciadores específicos senso e antissenso (5 µM). Cada amplicon foi sequenciado em triplicata, em ambas as direções (*forward* e *reverse*). A reação de sequenciamento foi feita em placa de 96 poços, sendo utilizados os seguintes parâmetros de tempo e temperatura: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Alemanha). Em seguida, as reações de sequenciamento foram precipitadas para eliminação dos iniciadores não utilizados e o DNA purificado ressuspensão em formamida HI DI.

4.11- Análise das sequências

Para montagem e visualização das sequências finais, os cromatogramas obtidos foram analisados por meio dos programas Chromas Lite™ (Technelysium Pty Ltd), Phred, Cross-match, Phrap e CAP3, disponíveis no sítio eletrônico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), por meio do endereço: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank, por meio de um alinhamento no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information”, utilizando-se o programa BLAST2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- *Basic Local Alignment Tool*, Altschul *et al.*, 1990). As sequências de nucleotídeos que foram compatíveis à região amplificada e analisada neste trabalho foram selecionadas para análises comparativas.

4.12- Alinhamento das sequências

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e sequências inferidas de aminoácidos foram realizados com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no pacote MEGA 6.1 (Thompson *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 2004; <http://megasoftware.net>) e MUSCLE (Edgar, 2004), disponível no sítio eletrônico <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. Durante a revisão dos alinhamentos, foram feitos ajustes manualmente, quando necessário. Após comparações e alinhamentos, as sequências obtidas foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas. As análises de identidade e similaridade das sequências de nucleotídeos e sequências inferidas de aminoácidos foram realizadas com o auxílio do programa LALIGN (disponível em: http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

4.13- Inferências filogenéticas

A seleção do melhor modelo para a construção das árvores filogenéticas foi feita por meio do programa JModelTest (Posada, 2011).

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o programa PhyML v.3.1 (Guindon *et al.*, 2010) com 100 replicatas de *bootstrap*, empregando o critério *Akaike Information Criterion* (AIC). Foi feita a análise por Máxima Verossimilhança (MV), utilizando-se os métodos TIM1 com correção gama (TIM1+G) para DENV-1, TIM1 com sítio invariável estimado (TIM3+I) para

DENV-2, TIM1 com sítio invariável estimado (TIM2+I) para DENV-3 e TPM2+G com TIM1 com correção gama (TIM3+I) para DENV-4. As árvores filogenéticas foram visualizadas no FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2007).

4.14- Distribuição geográfica de casos humanos e pontos de coleta de *pools* de larvas e mosquitos

Os endereços residenciais contidos em fichas de notificação de pacientes positivos para DENV e os endereços dos pontos de coleta de *pools* de larvas e mosquitos foram utilizados para caracterização da distribuição geográfica, a partir da plotagem dos pontos em um mapa de Contagem e do distrito sanitário Eldorado, respectivamente, por meio do software livre QUANTUM GIS versão 2.0.1 (www.qgis.org). Para tal, foi utilizado o sistema de coordenadas UTM e o Datum SIRGAS 2000. A base de endereços de Contagem foi fornecida pela Prefeitura Municipal de Contagem e para endereços fora desse município, foi utilizado o *Google Earth*.

5- RESULTADOS

5.1- Detecção de DENV nas amostras clínicas de pacientes com suspeita de dengue

As amostras clínicas foram obtidas de pacientes em fase aguda de dengue sem sinais de alarme, que apresentaram início de sintomas nas SE's 19, 20, 21 e 22 de 2013, correspondentes ao mês de maio. Dos 49 plasmas analisados, 35 (71%) foram positivos para algum sorotipo de DENV por RT-semi-nested PCR (Figura 21). Foram amplificados fragmentos gênicos correspondentes à região C-prM de cada um dos sorotipos de DENV, utilizando os iniciadores D1 e D2, comuns aos quatro sorotipos, e, em seguida, iniciadores específicos para cada sorotipo (TS1, TS2, TS3 e TS4) juntamente com o iniciador D1 (semi-nested PCR). O tamanho dos fragmentos encontrados eram de, aproximadamente, 482 pb (DENV-1), 119 pb (DENV-2), 290 pb (DENV-3) e 392 pb (DENV-4) (Figura 22). Amostras positivas para DENV-2 e DENV-3 foram submetidas à semi-nested PCR alternativa com o iniciador D1.1, com o intuito de obter fragmentos maiores para o sequenciamento. Na primeira reação, também foram utilizados os iniciadores D1 e D2; no entanto, a segunda reação foi conduzida utilizando-se os iniciadores D1.1 e D2 (semi-nested PCR), que permitem a amplificação de um produto de 490 pb da região C-prM do genoma de DENV (Figura 23).

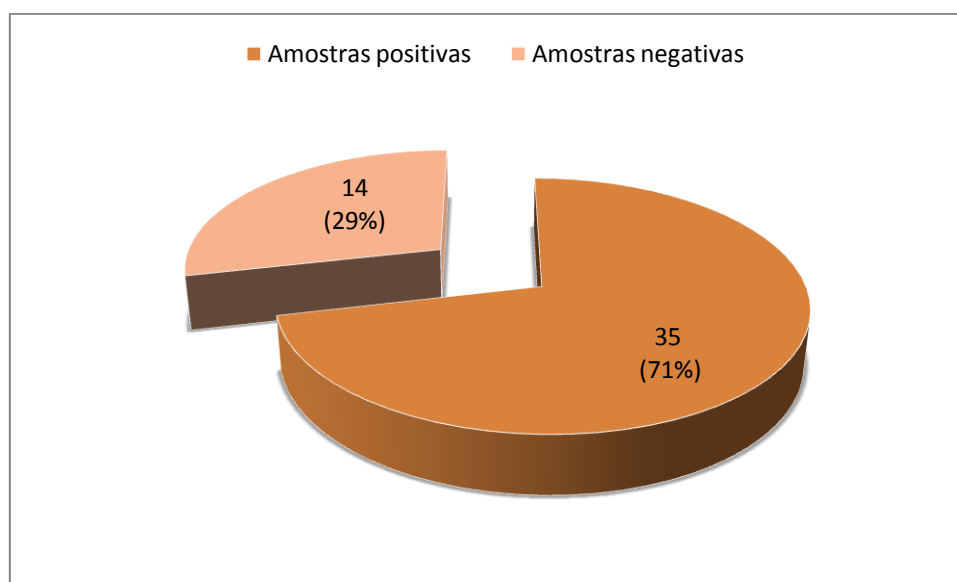


Figura 21- **Distribuição das amostras clínicas de humanos de Contagem quanto à positividade para DENV.** 49 amostras de plasmas obtidas de pacientes em fase aguda de dengue sem sinais de alarme com início de sintomas nas semanas epidemiológicas 19, 20, 21 e 22 de 2013 foram analisadas por RT-semi-nested PCR para amplificação da região C-prM do genoma de DENV. Dessas, 35 (71%) foram positivas.

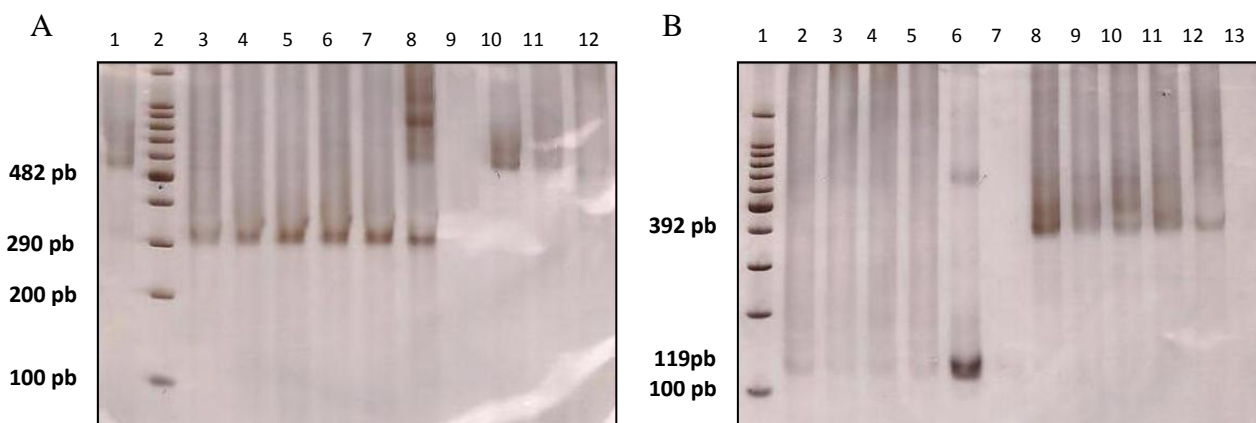


Figura 22- **DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando iniciadores específicos para a região C-prM de cada sorotipo de DENV.** Amostras clínicas de humanos foram submetidas à extração de RNA e síntese de cDNA, que foi utilizado como molde para a PCR. O DNA amplificado foi fracionado em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. A- DNA amplificado utilizando iniciadores específicos para DENV-1 e para DENV-3. Canaletas da esquerda para a direita: 1. controle positivo DENV-1; 2. marcador de tamanho molecular 100 pb; 3-7. amostras positivas para DENV-3; 8- controle positivo DENV-3; 9. controle negativo DENV-3; 10-12. amostras positivas para DENV-1; B- DNA amplificado utilizando iniciadores específicos para DENV-2 e para DENV-4. Canaletas da esquerda para a direita: 1. marcador de tamanho molecular 100 pb; 2-5. amostras positivas para DENV-2; 6. controle positivo DENV-2; 7. controle negativo DENV-2; 8-11. amostras positivas para DENV-4; 12. controle positivo DENV-4; 13. controle negativo DENV-4;



Figura 23- **DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando o iniciador D1.1.** Amostras clínicas de humanos foram submetidas à extração de RNA e síntese de cDNA, que foi utilizado como molde para a PCR. O DNA amplificado foi fracionado em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. Canaletas da esquerda para a direita: 1. marcador de tamanho molecular 100 pb; 2-12. amostras de DENV-2 e DENV-3 positivas; 13. controle positivo; 14. controle negativo;

Um total de 27 amostras, das 35 positivas, que apresentaram fragmentos de DNA representativos de bandas características para os quatro sorotipos foram sequenciadas. Considerando as amostras sequenciadas, 21 (77,8%) foram identificadas com um único sorotipo de DENV (Figura 24A), de acordo com a seguinte distribuição: sete (26%) de DENV-3, seis (22,2%) de DENV-4, cinco (18,5%) de DENV-2 e três (11,1%) de DENV-1 (Figura 24B). Foram identificadas seis amostras com mais de um sorotipo, o que resultou em uma taxa de coinfeção de 22,2% (Figura 24), de acordo com a seguinte distribuição: 4 (14,8%) com dois sorotipos de DENV (duas com DENV-2 e DENV-3, uma com DENV-3 e DENV-4 e uma com DENV-2 e DENV-4). Foram detectados três sorotipos de DENV (DENV-2, DENV-3 e DENV-4) em amostras de dois pacientes (7,4%) (Tabela 8). DENV-3 foi detectado em 12 (44,4%) das amostras sequenciadas, sendo o sorotipo predominante dessa epidemia em Contagem.

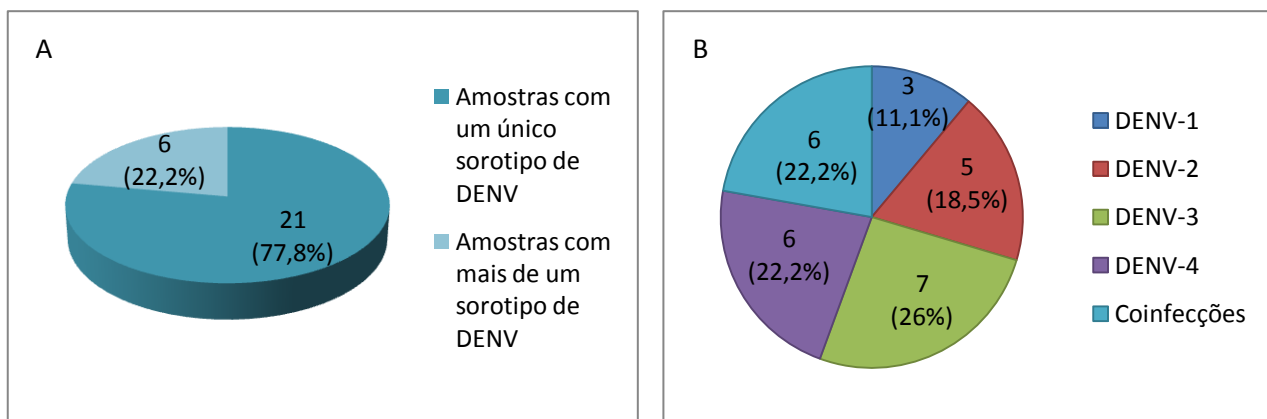


Figura 24- Distribuição das amostras clínicas de Contagem quanto à detecção de um ou mais sorotipo de DENV. A- Em 21 (77,8%) plasmas foi detectado um único sorotipo de DENV, enquanto que em seis (22,2%) foram detectados mais de um sorotipo; B- Distribuição das amostras sequenciadas identificadas com um único sorotipo de DENV de acordo com o sorotipo detectado. Das 21 amostras, 7 (26%) foram de DENV-3, 6 (22,2%) de DENV-4, 5 (18,5%) de DENV-2 e 3 (11,1%) de DENV-1. Em seis (22,2%) das 27 amostras foram detectadas coinfeções.

Tabela 8- Número e percentual de amostras clínicas sequenciadas identificadas com mais de um sorotipo de DENV (coinfeções).

Tipo de coinfeção	Número de amostras/ (%)
DENV-2 e DENV-3	2 (7,4)
DENV-2 e DENV-4	1 (3,7)
DENV-3 e DENV-4	1 (3,7)
DENV-2, DENV-3 e DENV-4	2 (7,4)
Total	6 (22,2)

A Figura 25 mostra a distribuição dos casos de dengue, de acordo com a data de início dos sintomas, considerando as SE's de 19 a 22, correspondentes ao mês de maio de 2013. Na SE 19, foram detectados um caso de DENV-1, um caso de DENV-2, dois casos de DENV-3, três casos de DENV-4, um caso de coinfeção por DENV-2 e DENV-3, o caso de coinfeção por DENV-3 e DENV-4 e um caso de coinfeção por DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Na SE 20, foram detectados um caso de DENV-1, dois caso de DENV-2, um caso de DENV-3, um caso de coinfeção por DENV-2 e DENV-3 e um caso de coinfeção por DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Na SE 21, foram detectados um caso de DENV-2, um caso de DENV-3, um caso de DENV-4 e um caso de coinfeção por DENV-2 e DENV-4. Na SE 22, foram detectados um caso de DENV-3 e um caso de DENV-4.

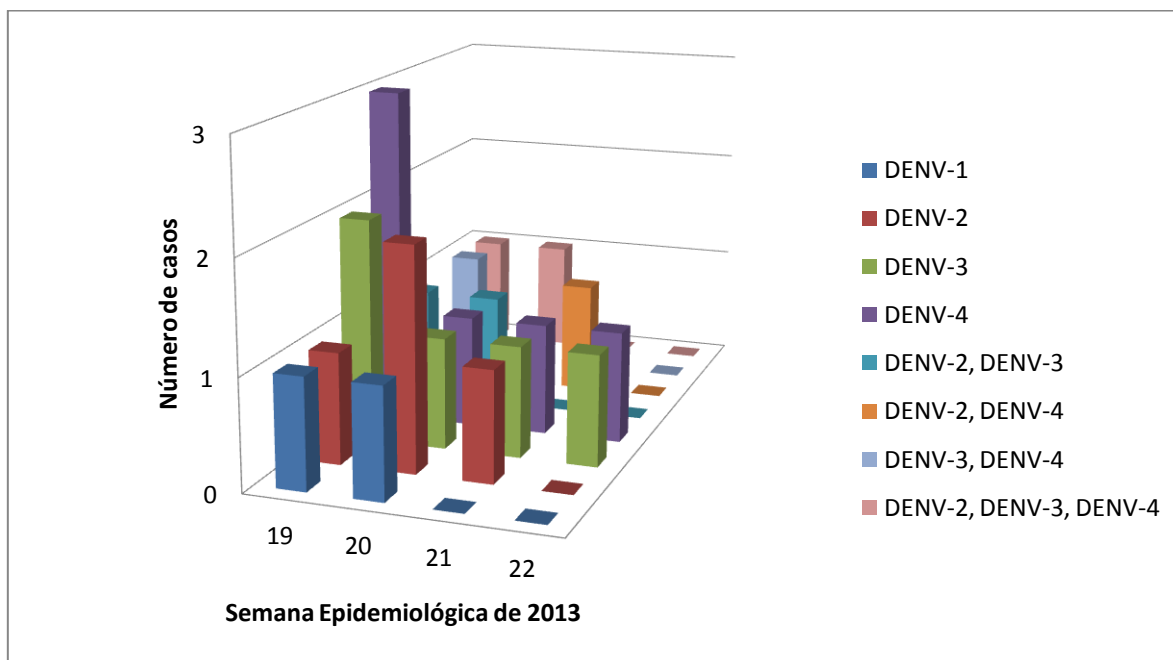


Figura 25- Distribuição de casos de dengue de acordo com a semana epidemiológica de início dos sintomas dos pacientes do estudo, Contagem, 2013.

5.2- Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes

A tabela 9 apresenta os dados de 23 pacientes positivos para DENV, dentre os 27 que tiveram amostras sequenciadas. Os dados de quatro pacientes que tiveram amostras clínicas coletadas e sequenciadas não foram encontrados no SINAN, representando possivelmente pacientes não notificados devido à sobrecarga do sistema de saúde por ocasião do grande número de casos de dengue em maio de 2013, em Contagem.

Tabela 9- Dados clínicos e epidemiológicos de pacientes positivos para DENV, Contagem, 2013

Identificação dos pacientes	Sorotipo de DENV	Idade (anos)/ sexo	Início de sintomas	SE/ 2013	Coleta de sangue para IgM	Resultado IgM	Contagem de plaquetas (/mm ³)	Diagnóstico clínico
MG2/2013	1	16/M	11/5/2013	19	17/5/2013	R	54.000	D
MG13/2013	1	37/F	14/5/2013	20	20/5/2013	R	89.000	D
34C	2	40/F	22/5/2013	21	27/5/2013	NR	210.000	D
28C	2	24/F	11/5/2013	19	16/5/2013	R	153.000	D
29C	2	45/F	12/5/2013	20	17/5/2013	R	140.000	D
14C	3	47/M	13/5/2013	20	17/5/2013	R	159.000	D
MG10/2013	3	52/M	20/5/2013	21	26/5/2013	NR	249.000	D
MG11/2013	3	40/F	27/5/2013	22	27/5/2013	R	226.000	D
MG23/2013	3	20/F	10/5/2013	19	16/5/2013	NR	NA	D
MG18/2013	3	53/M	10/5/2013	19	16/5/2013	R	NA	D
33BH	3	39/M	13/5/2013	20	18/5/2013	R	197.000	D
44C	3	15/M	10/5/2013	19	15/5/2013	NR	NA	D
MG49/2013	4	50/M	26/5/2013	22	27/5/2013	NR	186.000	D
7C	4	44/F	23/5/2013	21	31/5/2013	R	190.000	D
21BH	4	52/F	11/5/2013	19	16/5/2013	NR	NA	D
MG22/2013	4	21/M	10/5/2013	19	16/5/2013	NR	NA	D
31C	4	26/F	10/5/2013	19	16/5/2013	R	292.000	D
MG38/2013	2, 3	43/F	11/5/2013	19	17/5/2013	R	144.000	D
MG36/2013	2, 3	38/M	17/5/2013	20	23/5/2013	NR	223.000	D
40BH	2, 4	17/M	24/5/2013	21	03/6/2013	NR	161.000	D
MG39/2013	2, 3, 4	23/M	12/5/2013	20	NA	TNR	178.000	D
MG41/2013	2, 3, 4	66/F	11/5/2013	19	17/5/2013	R	209.000	D
47C	4	42/F	17/5/2013	20	20/5/2013	NR	350.000	D

NA- não avaliado; R- reagente; NR- não reagente; TNR- teste não realizado; D- dengue sem sinais de alarme

Considerando o sexo dos pacientes, 12 (52,2%) eram do sexo feminino e 11 (47,8%) do sexo masculino. Três pacientes estavam na faixa etária de 15 a 17 anos, um acima de 60 anos e os demais eram adultos. A data de início de sintomas dos casos variou de 10 a 27 de maio de 2013, período compreendido entre as semanas epidemiológicas 19 a 22 de 2013.

Vinte e dois pacientes foram submetidos à nova coleta de sangue para detecção de IgM. Desse total, nove (quatro reativos e cinco não reativos para IgM) tiveram a coleta procedida em até cinco dias após a data de início de sintomas, o que difere do período preconizado de, no mínimo, seis dias após a data de início dos sintomas para a realização do exame sorológico. Os outros 13 pacientes realizaram a coleta para a detecção de IgM a partir do sexto dia do início de sintomas e, dentre esses, cinco foram não reativos para IgM. Tendo em vista que o exame de IgM é considerado critério laboratorial para fechamento dos casos de dengue pela Secretaria de Saúde de Contagem, pode estar ocorrendo uma subestimação no número de pacientes positivos.

Os pacientes detectados com DENV-1 tiveram plaquetopenia mais acentuada ($< 100.000/\text{mm}^3$) em relação a pacientes detectados com outros sorotipos. Todos os pacientes tiveram como diagnóstico clínico dengue sem sinais de alarme, inclusive pacientes com quadro de coinfeção. Foram recuperadas oito fichas de notificação dos pacientes desse estudo, em que constavam as manifestações clínicas apresentadas, como mostra a Figura 26. Cabe salientar que o banco de dados que alimenta o SINAN não contempla as manifestações clínicas dos pacientes, de forma que, somente de posse das fichas de notificação impressas foi possível recuperar estes dados. As manifestações clínicas mais frequentes foram: febre e mialgia (100%), cefaléia e prostração (87,5%), artralgia e dor retro-orbitária (75%), náusea e vômito (50%), diarreia e prova do laço positiva (37,5%), exantema (25%) e inapetência (12,5%). Os três pacientes que tiveram prova do laço positiva foram detectados com DENV-4, DENV-3 e DENV-2 e DENV-3 (coinfeção).

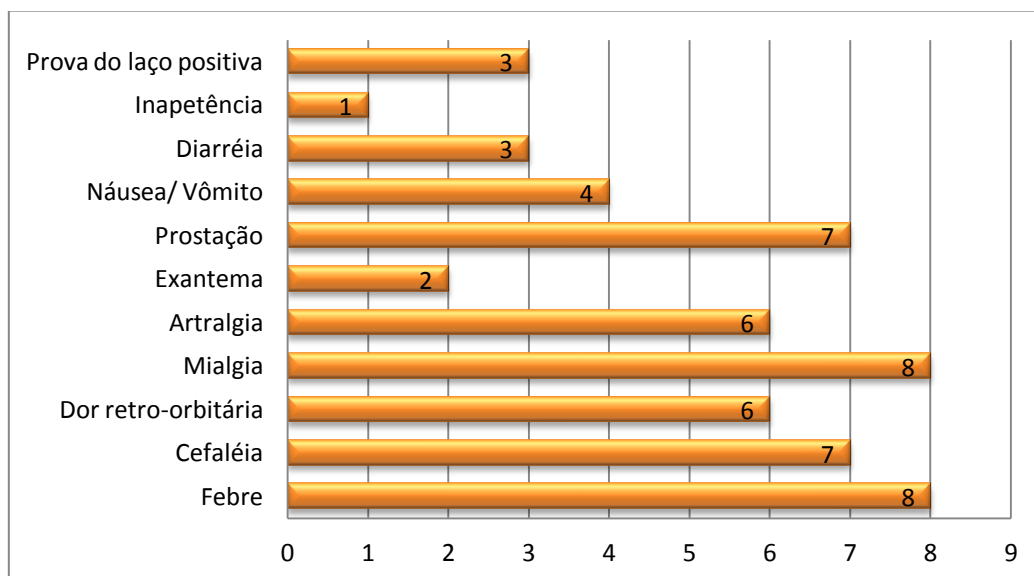


Figura 26- Número de ocorrência das principais manifestações clínicas presentes nas fichas de notificação de oito pacientes em fase aguda de dengue sem sinais de alerta.

5.3- Distribuição espacial dos endereços residenciais dos pacientes positivos para DENV

Os endereços residenciais contidos em fichas de notificação de vinte e três pacientes positivos para DENV foram plotados no mapa de Contagem (Figura 27). O ponto referente à residência de um paciente detectado com DENV-3, situado na regional leste de Belo Horizonte, não pôde ser visualizado na Figura 27, pois não está localizado em área de fronteira ou próximo ao município de Contagem.

Os casos positivos de residentes em Contagem estavam concentrados nos distritos sanitários Eldorado, Industrial e Sede, que são os mais urbanizados e populosos. A unidade de saúde em que as amostras foram coletadas (UPA GPV) localiza-se no distrito sanitário Eldorado, o que também pode explicar a detecção de casos próximos. No entanto, essa unidade de saúde é referência em todo o município, o que explica o recebimento de pacientes de distritos sanitários mais distantes e até mesmo de outros municípios. Pacientes com residência em outros municípios deram entrada nessa unidade de saúde por estarem exercendo atividades de trabalho em Contagem ou pela facilidade de acesso à unidade viabilizada por um meio de transporte direto, como metrô. Não foram detectados casos de dengue de pacientes residentes nos distritos sanitários Petrolândia, Nacional e Ressaca. Nos distritos Ressaca e Petrolândia, existem UPA's, que podem ter sido as unidades de saúde de escolha dos pacientes que residem nesses distritos. No caso do distrito sanitário Nacional, os pacientes provavelmente recorreram a UPA Ressaca, devido à proximidade.

No distrito sanitário Industrial, residem os dois pacientes detectados com coinfeção por DENV-2 e DENV-3, além de dois pacientes com DENV-4 e um com DENV-2. O Eldorado é o distrito de residência de um paciente detectado com DENV-1, três pacientes com DENV-3, um com DENV-4, um paciente coinfectado com DENV-3 e DENV-4 e um paciente coinfectado com DENV-2, DENV-3 e DENV-4, localizado na divisa com o distrito Sede. No distrito sanitário Sede, foram detectados um paciente com DENV-1, um com DENV-2 e um com DENV-4. No distrito sanitário Vargem das Flores, foram detectados dois casos, sendo um de DENV-2 e o outro de DENV-3, próximos entre si e à divisa com o município de Esmeraldas. Verifica-se a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV no distrito Eldorado em maio de 2013 e de pelo menos dois sorotipos nos outros distritos em que foram detectados pacientes positivos.

É possível observar dois casos de DENV-4 em Belo Horizonte: um deles na divisa com o distrito Eldorado e o outro próximo a essa divisa. Ainda nesse município, foi detectado um caso de DENV-

2, próximo a Ribeirão das Neves, um caso de DENV-3 (não visualizado, na regional leste) e uma coinfeção por DENV-2 e DENV-4. Betim é o município de residência de um paciente coinfectado por DENV-2, DENV-3 e DENV-4.



Figura 27- Distribuição espacial dos endereços residenciais dos pacientes positivos para DENV atendidos na UPA GPV nas semanas epidemiológicas 19, 20, 21 e 22 de 2013. O mapa foi confeccionado por meio do software QUANTUM GIS versão 2.0.1. A base de endereços de Contagem foi cedida pela Prefeitura Municipal de Contagem. Para endereços de outros municípios, foi utilizado o *Google Earth*. Sistema de Coordenadas: UTM; Datum: SIRGAS2000.

5.4- Detecção de DENV em larvas de *A. aegypti*

Para verificação da qualidade da extração do RNA dos *pools* de larvas de *A. aegypti*, as amostras foram submetidas ao qPCR para o gene normalizador *rpl32*, que codifica a proteína ribossomal L32. Todas as amostras apresentaram amplificação (Figura 28).

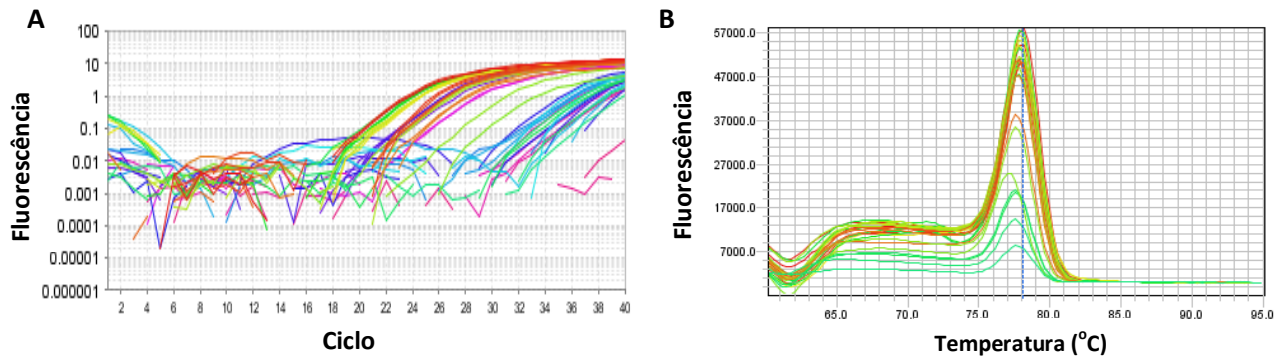


Figura 28- **Análise de *pools* de larvas de *A. aegypti* por qPCR empregando iniciadores para o gene normalizador *rpl32*.** *Pools* de larvas foram submetidos à extração de RNA total e, em seguida, síntese de cDNA utilizando iniciador randômico. A- Gráfico de amplificação de DNA representando os valores dos Cts. B- Gráfico da temperatura de “melting” (T_m) para DNA amplificado referente ao gene *rpl32* de alguns *pools*.

Em seguida, foi feito o qPCR utilizando iniciadores genéricos para a região 5'UTR de DENV-1-4. Foi observada a amplificação de DNA de controles positivos para DENV-1, 3 e 4 (Figura 29), enquanto o DNA de DENV-2 não foi amplificado.

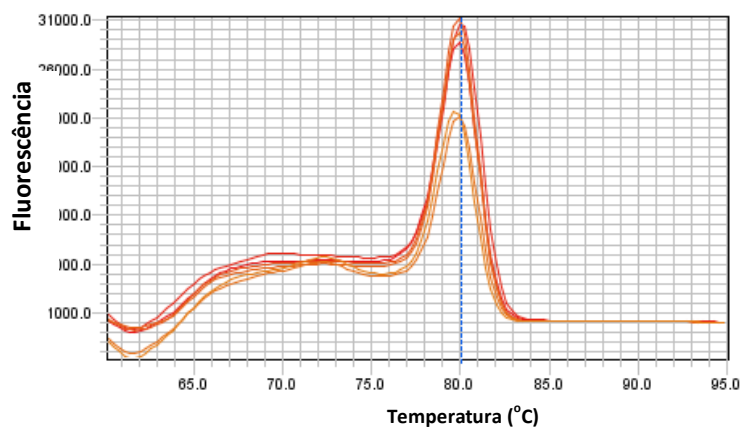


Figura 29- **Temperatura de “melting” (T_m) para DNA amplificado referente à região 5'UTR de controles positivos para DENV-1, 3 e 4.** Amostras de larvas sabidamente positivas para DENV-1, DENV-3 e DENV-4 foram submetidas à extração de RNA total e, em seguida, à síntese de cDNA utilizando iniciador randômico.

Oito *pools*, dos 28 analisados, apresentaram temperatura de *melting* bem próxima à dos controles positivos de DENV-1, 3 e 4, sendo considerados suspeitos. Os outros 20 *pools* foram submetidos à qPCR utilizando iniciador específico para a região 5'UTR de DENV-2. Houve a amplificação de cDNA do controle positivo para DENV-2 e dois *pools* apresentaram temperatura de *melting* bem próxima à do controle positivo (Figura 30).

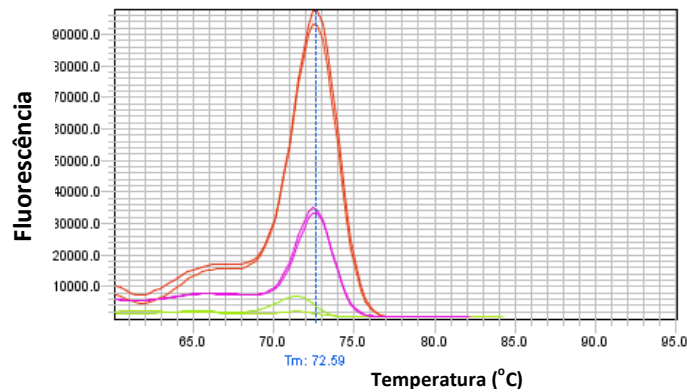


Figura 30- Temperatura de “melting” (Tm) para DNA amplificado referente à região 5'UTR de DENV-2. A curva vermelha refere-se ao controle positivo para DENV-2 e as curvas lilás e verde referem-se a amostras suspeitas. Essas amostras foram submetidas à extração de RNA total e, em seguida, síntese de cDNA utilizando iniciador randômico e qPCR.

As dez amostras consideradas suspeitas por qPCR foram submetidas ao PCR com iniciadores específicos para cada sorotipo de DENV para confirmação dos resultados. Dessas dez amostras, nove foram detectadas com algum sorotipo de DENV após realização do PCR convencional (Figura 31 e 32), o que representa 32,1% dos *pools* coletados (Figura 33).

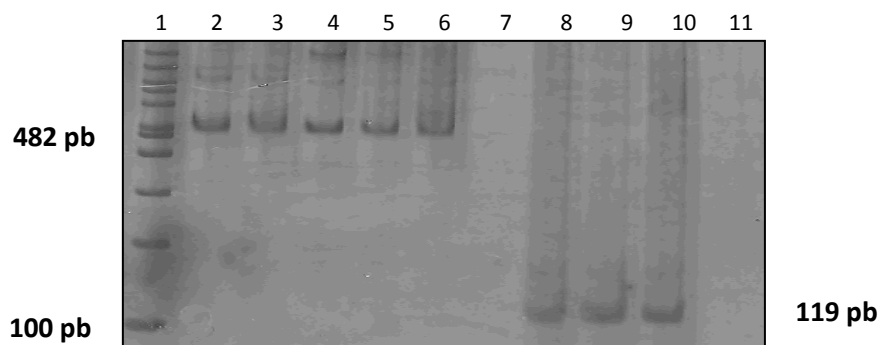


Figura 31- DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando iniciadores específicos para a região C-prM de DENV-1 e DENV-2. *Pools* de larvas foram submetidos à extração de RNA total e, em seguida, à síntese de cDNA utilizando iniciador randômico. O DNA amplificado foi fracionado em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. Canaletas da esquerda para a direita: 1. marcador de tamanho molecular 100 pb; 2- 5. amostras positivas para DENV-1; 6. controle positivo DENV-1; 7. controle negativo DENV-1; 8-9. amostras positivas para DENV-2; 10. controle positivo DENV-2; 11. controle negativo DENV-2.

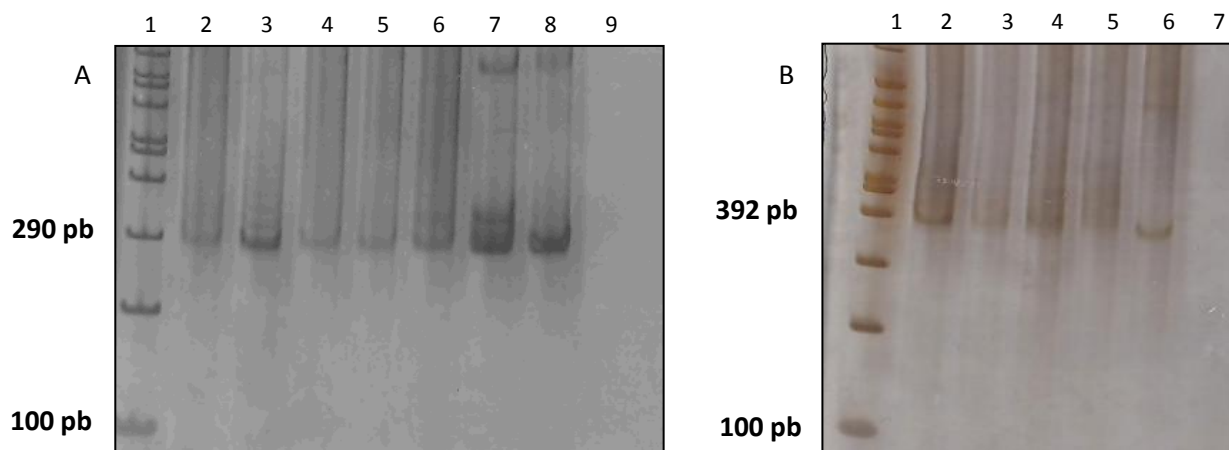


Figura 32- DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando iniciadores específicos para a região C-prM de DENV-3 e DENV-4. Pools de larvas de *A. aegypti* foram submetidos à extração de RNA total e, em seguida, à síntese de cDNA utilizando iniciador randômico. O DNA amplificado foi fracionado em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. A- DNA amplificado utilizando iniciadores específicos para DENV-3. Canaletas da esquerda para a direita: 1. marcador de tamanho molecular 100 pb; 2-7. amostras positivas para DENV-3; 8. controle positivo DENV-3; 9. controle negativo DENV-3. B- DNA amplificado utilizando iniciadores específicos para DENV-4. Canaletas da esquerda para a direita: 1. marcador de tamanho molecular 100 pb; 2-5. amostras positivas para DENV-4; 6. controle positivo DENV-4; 7. controle negativo DENV-4;

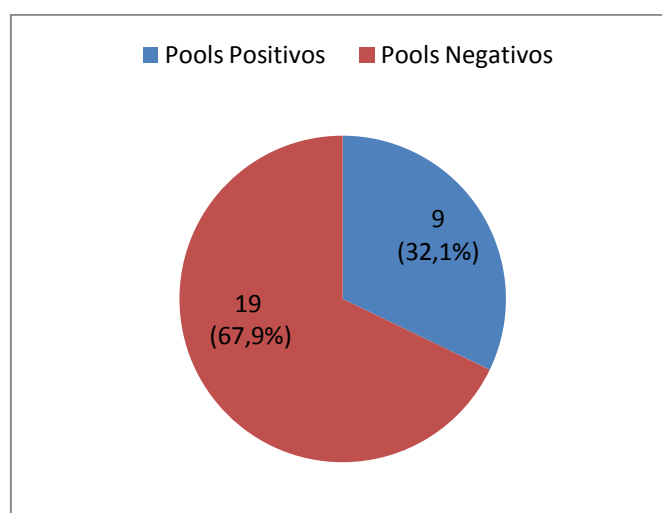


Figura 33- Distribuição dos pools de larvas de *A. aegypti* quanto à positividade para DENV. 28 pools de larvas foram coletados durante a realização do Levantamento de Índice Rápido de *Aedes aegypti* (LIRAA), nos meses de março e outubro de 2013 e janeiro de 2014 (semanas epidemiológicas 11 e 43 de 2013 e 02 de 2014), no distrito sanitário Eldorado, em Contagem. Após triagem com qPCR e confirmação com PCR, 9 pools (32,1%) foram positivos.

Todas as amostras positivas foram sequenciadas. Dos nove *pools* detectados com DENV, quatro (44,4%) estavam infectados por apenas um sorotipo (DENV-3), enquanto cinco (55,6%) estavam infectados por mais de um sorotipo, de acordo com a seguinte distribuição: um (11,1%) com DENV-1 e DENV-2; um (11,1%) com DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e três (33,4%) com DENV-3 e DENV-4 (Figura 34). DENV-3 foi o sorotipo mais frequente entre os *pools* coletados.

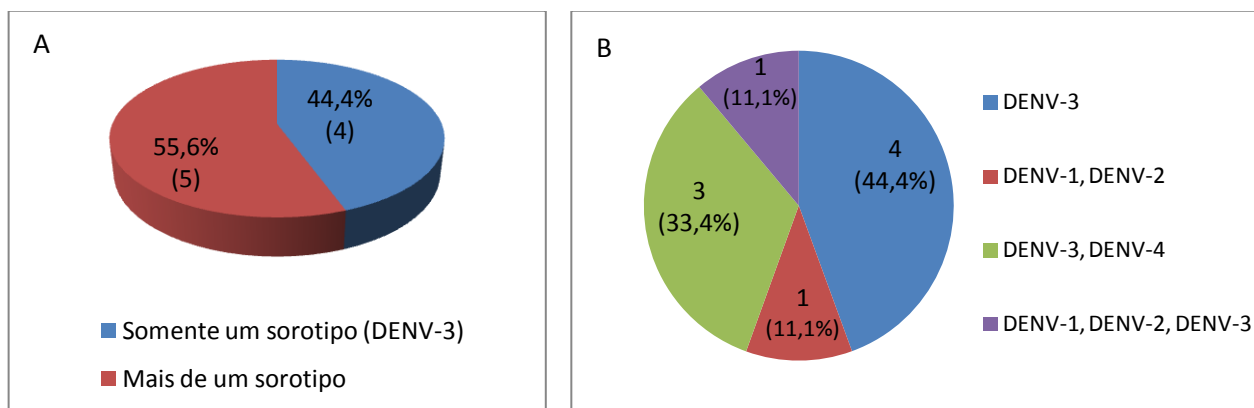


Figura 34- **Distribuição dos *pools* de larvas de *A. aegypti* positivos para DENV quanto à detecção de um ou mais sorotipo de DENV.** A- Em quatro (44,4%) *pools* foi detectado um único sorotipo de DENV (DENV-3), enquanto que em cinco (55,6%) foram detectados mais de um sorotipo; B- Distribuição dos *pools* detectados com um ou mais sorotipos de DENV: quatro (44,4%) somente com DENV-3; um (11,1%) com DENV-1 e DENV-2; um (11,1%) com DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e três (33,4%) com DENV-3 e DENV-4.

5.5- Distribuição espacial de pontos de coletas dos *pools* de larvas de *A. aegypti*

A figura 35 mostra a distribuição espacial dos pontos de coleta dos *pools* de larvas no distrito sanitário Eldorado, em três LIRAA's consecutivos, realizados em março e outubro de 2013 e janeiro de 2014. É possível observar que, em todos os três LIRAA's, foram detectados *pools* de larvas positivos para DENV, que estavam distribuídos em áreas distintas do distrito. A figura 36 apresenta os sorotipos de DENV detectados nos *pools* de larvas positivos. Um *pool* positivo coletado no LIRAA de março de 2013 detectado com DENV-1 e DENV-2 não está representado no mapa devido à falta de endereço do ponto de coleta. Dos cinco *pools* positivos para DENV coletados em março de 2013, em três foi detectado DENV-3 e em dois DENV-3 e DENV-4. Em outubro de 2013, apenas um *pool* foi positivo para DENV-3 e DENV-4. Dos dois *pools* positivos para DENV coletados em janeiro de 2014, um foi positivo para DENV-3 e o outro para DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

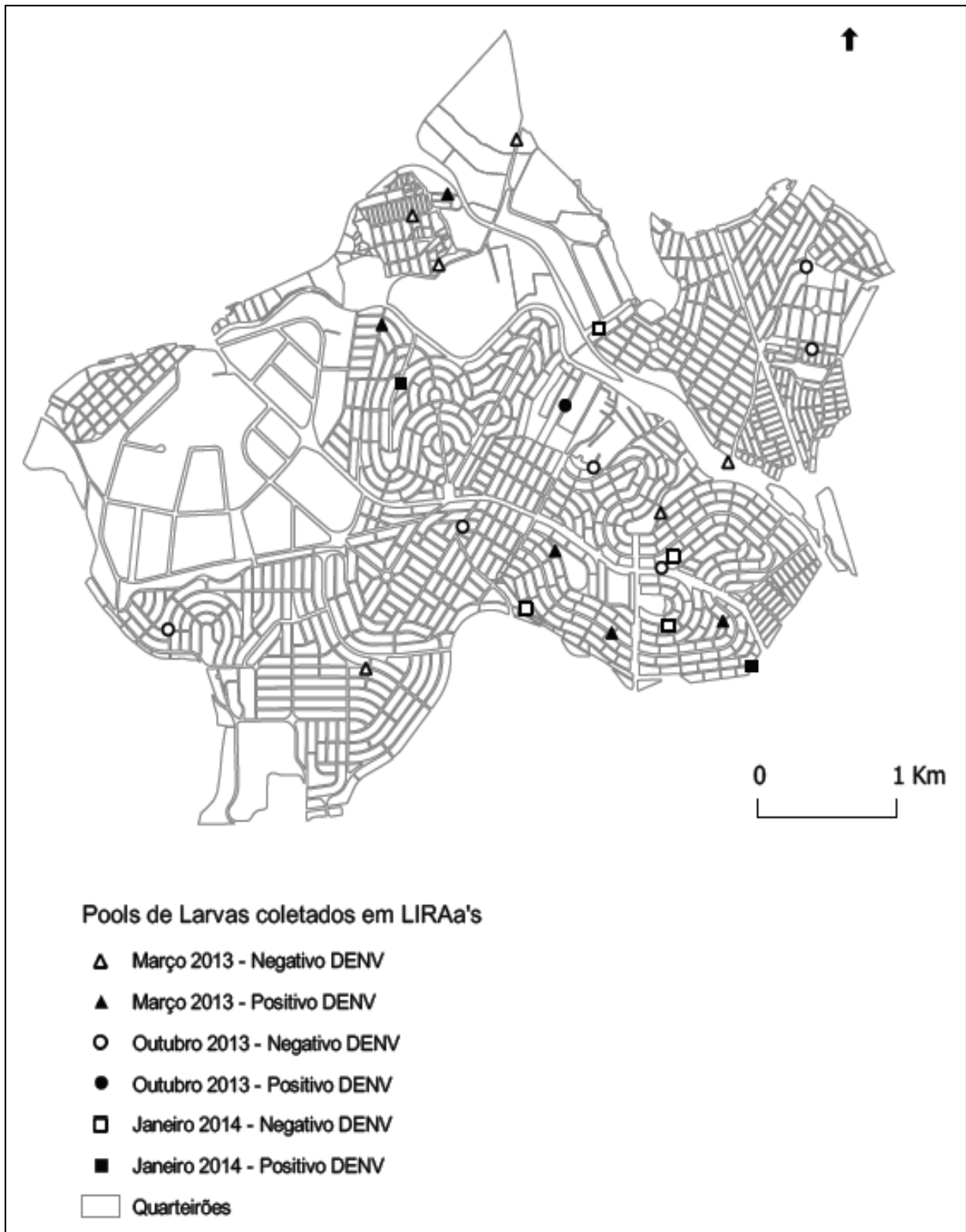


Figura 35- Distribuição espacial de pontos de coleta de *pools* de larvas de *A. aegypti* em LIRAA's no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG. O mapa foi confeccionado por meio do software QUANTUM GIS versão 2.0.1. A base de endereços de Contagem foi cedida pela Prefeitura Municipal de Contagem. UTM; Datum: SIRGAS2000.

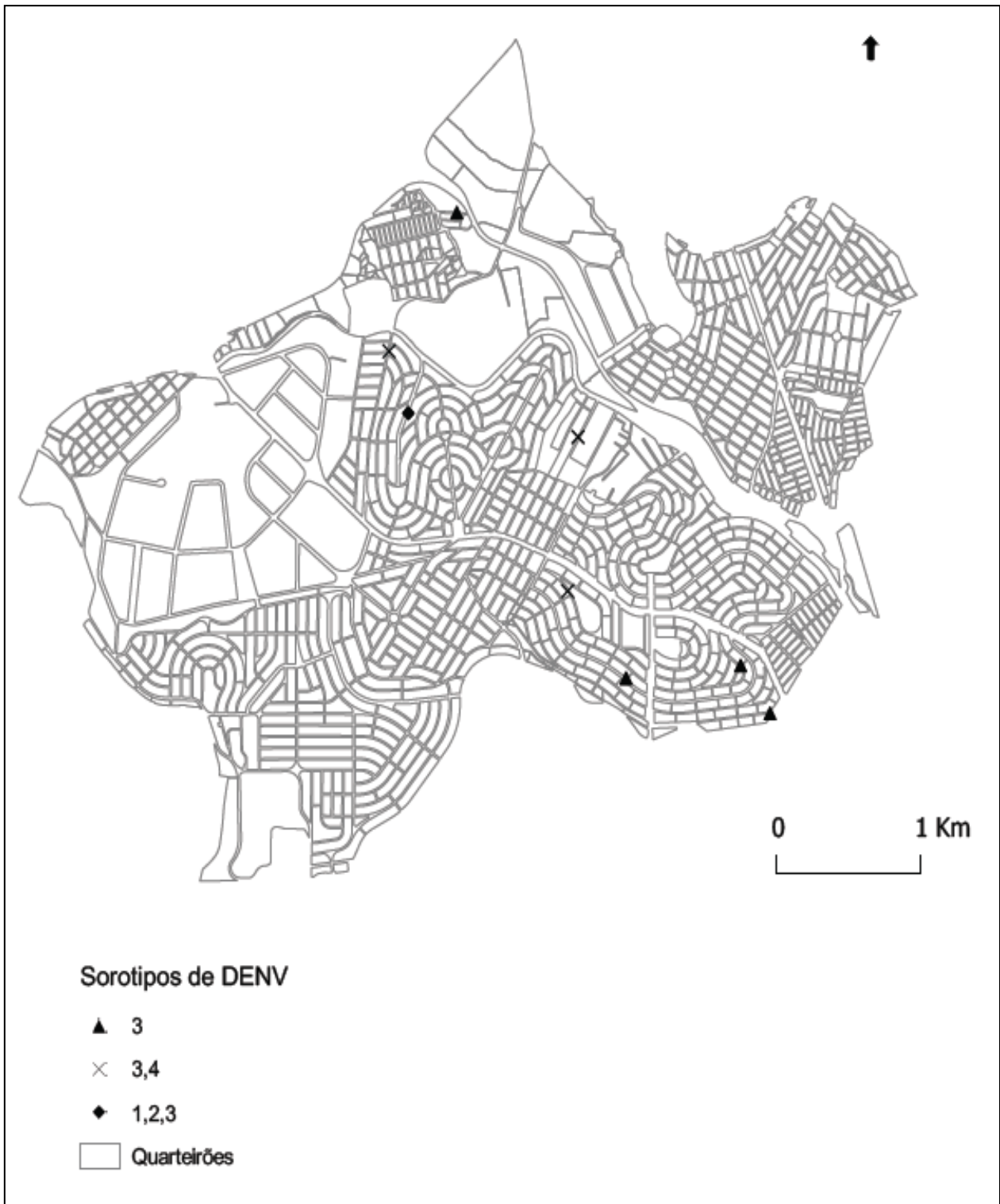


Figura 36- Distribuição espacial de pontos de coleta de *pools* de larvas de *A. aegypti* positivos para DENV em LIRAA's no Distrito Sanitário Eldorado, Contagem, MG. O mapa foi confeccionado por meio do software QUANTUM GIS versão 2.0.1. A base de endereços de Contagem foi cedida pela Prefeitura Municipal de Contagem. Sistema de Coordenadas: UTM; Datum: SIRGAS2000.

DENV-3 foi detectado em todos os *pools* mapeados nos três LIRAA's, sendo o mais disseminado na área geográfica do distrito e perpetuando ao longo do tempo em que as coletas foram realizadas. DENV-4 foi detectado nos LIRAA's de março e outubro de 2013, enquanto DENV-1 e DENV-2 foram detectados nos LIRAA's de março de 2013 e janeiro de 2014. Os depósitos em que os *pools* de larvas positivos para DENV foram coletados estão relacionados na tabela 10.

Tabela 10- Depósitos em que foram coletados *pools* de larvas de *A. aegypti* positivos para DENV em LIRAA's no distrito sanitário Eldorado, Contagem

Mês/ Ano de Coleta	Sorotipo de DENV detectado	Depósito
Março/ 2013	DENV-3, DENV-4	Prato de planta
Março/ 2013	DENV-3	Bebedouro infantil
Março/ 2013	DENV-3	Prato de planta
Março/ 2013	DENV-3	Caixa de passagem de água
Março/ 2013	DENV-3, DENV-4	Pneu
Outubro/ 2013	DENV-3, DENV-4	Sucata
Janeiro/ 2014	DENV-3	Pneu
Janeiro/ 2014	DENV-1, DENV-2, DENV-3	Carro

Dos nove depósitos apresentados na tabela 10, oito (88,9%) são considerados móveis, ou seja, passíveis de remoção. Apenas um depósito (caixa de passagem de água) é considerado fixo. Isso evidencia que é necessário maior conscientização da população, para que os próprios responsáveis pelos imóveis decidam por não fazer uso de determinados objetos, como prato de planta, e dêem destino ou acondicionamento adequado a outros, como pneu e sucata. Isso requer intensificação no trabalho de educação em saúde realizado, principalmente, pelos ACE's. Alguns depósitos se repetem dentro do mesmo LIRAA (prato de planta/ março de 2013) e em LIRAA's diferentes (pneu/ março de 2013 e janeiro de 2014).

5.6- Análise dos mosquitos capturados

As coletas de mosquitos foram realizadas nas semanas epidemiológicas 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17 e 25, correspondentes aos meses de janeiro, fevereiro, março, abril e junho de 2013, no distrito sanitário Eldorado em Contagem. Foram coletados ao todo 579 mosquitos (Tabela 11), sendo 324 machos de *A. aegypti*, 223 fêmeas de *A. aegypti*, 20 machos de *Culex* sp., 12 fêmeas de *Culex* sp.

Tabela 11- Número de mosquitos coletados no distrito sanitário Eldorado, de acordo com gênero/espécie e sexo nas semanas epidemiológicas 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17 e 25 de 2013

Pontos coleta	Descrição do imóvel	<i>A. aegypti</i> ♀	<i>A. aegypti</i> ♂	<i>Culex sp.</i> ♀	<i>Culex sp.</i> ♂	Total
1	Presença de mosquitos	1	-	1	-	2
2	Presença de larvas e pupas	3	2	-	-	5
3	Residência de caso confirmado de dengue	2	1	-	-	3
4	Presença de mosquitos	7	2	1	9	19
5	Residência caso confirmado de dengue	9	1	1	-	11
6	Presença de mosquitos (Ponto Estratégico)	125	257	-	-	382
7	Residência de caso confirmado de dengue	3	-	-	-	3
8	Presença de mosquitos	5	1	-	-	6
9	Presença de mosquitos	11	21	-	2	34
10	Residência de caso confirmado de dengue	1	-	1	-	2
11	Presença de mosquitos	1	10	-	-	11
12	Residência de caso suspeito de dengue	5	1	-	6	12
13	Residência de casos suspeitos e confirmado de dengue	3	5	-	1	9
14	Presença de mosquitos	15	8	-	-	23
15	Residência de casos suspeitos de dengue	1	-	1	-	2
16	Presença de mosquitos	3	6	-	-	9
17	Residência de caso suspeito de dengue	1	-	-	-	1
18	Residência de casos suspeitos de dengue	2	1	-	-	3
19	Presença de mosquitos	17	8	-	-	25
20	Presença de mosquitos (Ponto Estratégico)	4	-	-	-	4
21	Presença de mosquitos (Ponto Estratégico)	1	-	-	-	1
22	Presença de mosquitos (Ponto Estratégico)	3	-	7	2	12
Total		223	324	12	20	579

O maior número de mosquitos coletados foram machos, tanto de *A. aegypti* (324) quanto de *Culex* sp. Após a identificação, os mosquitos coletados foram agrupados por sexo, local de coleta e data (SE) e foram acondicionados em *freezer* a -70°C até o processamento.

Pode-se observar que houve captura de fêmeas de *A. aegypti* em todos os pontos em que foram colocadas armadilhas (Tabela 11). Dentre os pontos amostrados, destaca-se o ponto 6 pela grande quantidade de mosquitos *A. aegypti* capturados (382). Trata-se de uma borracharia, considerada Ponto Estratégico do distrito, por conter grande quantidade de material propício à desova de mosquitos.

5.6.1- Processamento e detecção de DENV em fêmeas de *A. aegypti*

Somente as fêmeas de *A. aegypti* foram processadas e submetidas à pesquisa de DENV. De um total de 223 fêmeas, 125 (56%) eram provenientes da borracharia e 98 (44%) dos demais pontos amostrados (Tabela 11 e Figura 37). Considerando as 125 fêmeas oriundas da borracharia, 20 foram processadas em *pools* de 10 indivíduos e 105 foram processadas individualmente. Em relação às 98 fêmeas coletadas nos demais pontos, 29 foram processadas em quatro *pools* de até 10 indivíduos, enquanto 69 foram processadas individualmente (Figura 38). O total de amostras processadas foi 180, das quais 174 oriundas de fêmeas individuais e seis de *pools*, que foram considerados como amostras individuais.

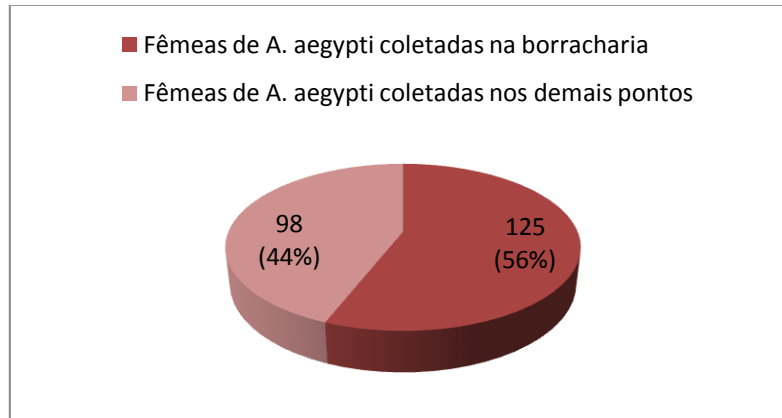


Figura 37- Distribuição das fêmeas de *A. aegypti* quanto ao local de coleta, Contagem, 2013. Considerando um total de 223 fêmeas de *A. aegypti* coletadas em imóveis selecionados do distrito sanitário Eldorado utilizando-se a armadilha BG-Sentinela, 125 (56%) eram provenientes de uma borracharia considerada ponto estratégico do distrito e 97 (44%) dos demais pontos amostrados.

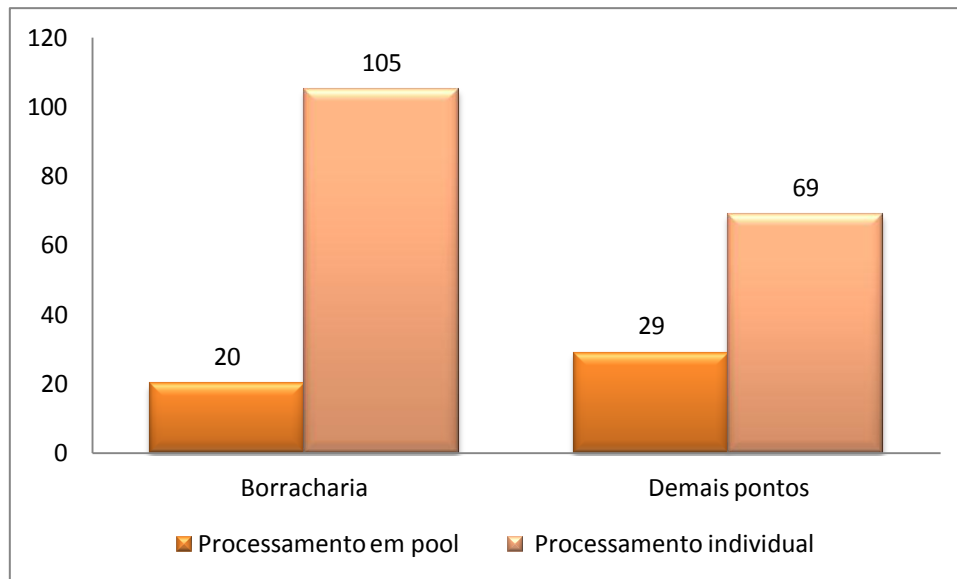


Figura 38- **Distribuição das fêmeas de *A. aegypti* coletadas na borracharia e nos demais pontos de coleta de acordo com o modo de processamento, em *pool* ou individual.** Considerando as 125 fêmeas da borracharia, 20 foram processadas em *pools* e 105 individualmente. Em relação às 98 fêmeas coletadas nos demais pontos, 29 foram processadas em *pools* e 69 individualmente.

Os mosquitos processados em *pools* foram submetidos à extração de RNA utilizando-se o kit comercial QIAmp® Viral RNA (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), enquanto que, para os mosquitos processados individualmente, foi empregado o método do Trizol. Em ambas as estratégias, utilizou-se iniciador randômico para a síntese de cDNA. Todas as amostras foram submetidas ao qPCR para o gene normalizador *rpl32*, que codifica a proteína ribossomal L32. Todas as 180 amostras analisadas apresentaram amplificação.

Em seguida, foi feito o qPCR utilizando iniciadores para a região do capsídeo de DENV1-4, utilizando-se cDNA diluído de 1:10. Foi observada a amplificação de DNA de controles positivos para DENV-1, 2, 3 e 4 (Figura 39A). Trinta amostras das 180 analisadas (16,7%) apresentaram temperatura de *melting* bem próxima à dos controles positivos de DENV-1, 2, 3 e 4, sendo consideradas suspeitas (Figura 39B). Dessas 30 amostras suspeitas, 27 são oriundas de fêmeas processadas individualmente (15 da borracharia e 12 dos demais pontos) e três de *pools* (2 da borracharia e 1 dos demais pontos).

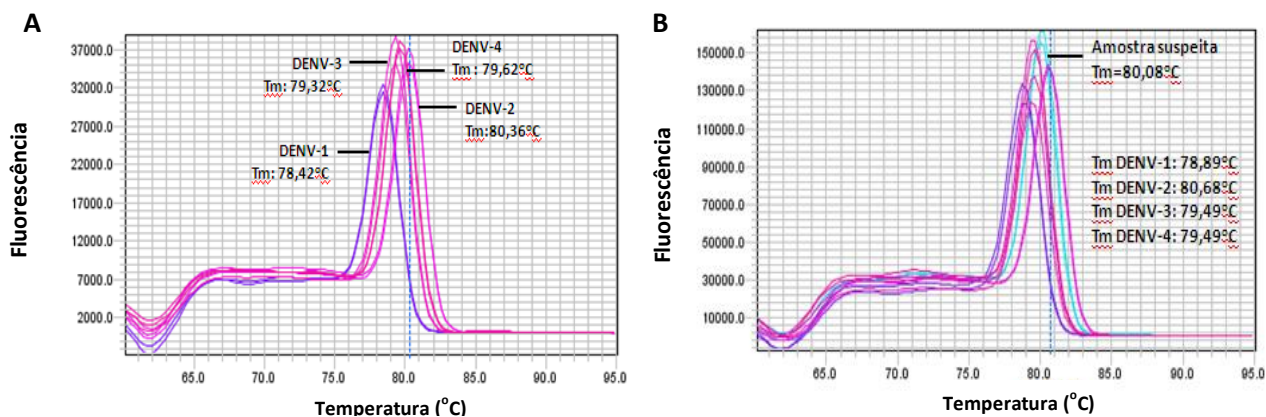


Figura 39- Temperatura de “melting” (Tm) para DNA amplificado referente à região do capsídeo de DENV-1, 2, 3 e 4. A- Amostras de mosquitos sabidamente positivas para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 foram submetidas à extração e RNA total e, em seguida, síntese de cDNA utilizando iniciador randômico. B- Amostras de mosquitos sabidamente positivas para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 estão representadas pelas cores lilás e roxo. A curva azul refere-se a uma amostra suspeita. A mesma foi submetida à extração de RNA total e, em seguida, síntese de cDNA utilizando iniciador randômico e diluída de 1:10 para realização da qPCR.

As 30 amostras consideradas suspeitas por qPCR foram submetidas ao PCR (semi-nested) com iniciadores específicos para cada sorotipo de DENV para confirmação dos resultados. Dessas 30 amostras, 16 foram detectadas com algum sorotipo de DENV após realização do PCR (Figura 40), o que representa 9%, considerando o total de 180 amostras analisadas (Figura 41).



Figura 40- DNA amplificado pela RT-semi-nested-PCR, utilizando iniciadores específicos para a região C-prM de DENV e de DENV-4. Fêmeas de *A. aegypti* foram submetidas à extração de RNA total e, em seguida, síntese de cDNA utilizando iniciador randômico, que foi utilizado como molde para a PCR. O DNA amplificado foi fracionado em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. A- DNA amplificado utilizando o iniciador D1.1. Canaletas da esquerda para a direita: 1. marcador de tamanho molecular 100 pb; 5-12. amostras positivas; 13. controle positivo; 14. controle negativo; B- DNA amplificado utilizando iniciadores específicos para DENV-4. Canaletas da esquerda para a direita: 1. marcador de tamanho molecular 100 pb; 2-4. amostras positivas para DENV-4; 5. controle positivo DENV-4; 6. controle negativo DENV-4;

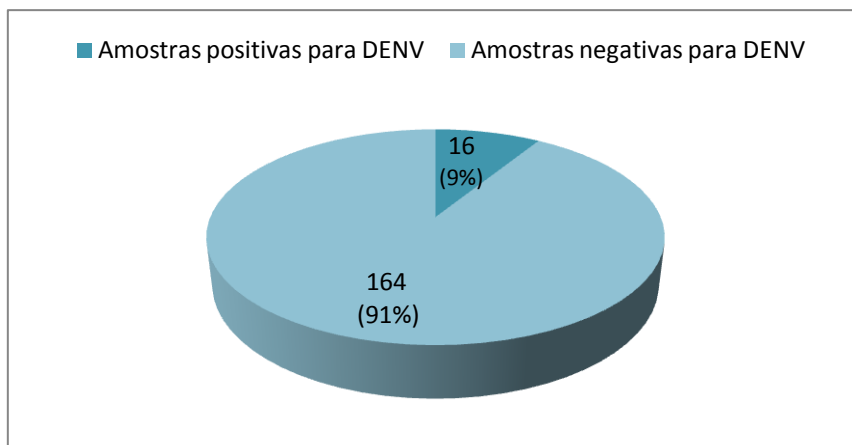


Figura 41- **Distribuição das amostras de fêmeas de *A. aegypti* quanto à positividade para DENV.** 180 amostras de mosquitos *A. aegypti* fêmea, coletados em 2013 por meio da armadilha BGS em imóveis selecionados do distrito sanitário Eldorado, em Contagem, foram triadas por qPCR e, para aquelas consideradas suspeitas, foi feito PCR. Das 180 amostras, 16 (9%) foram consideradas positivas.

Das 16 amostras positivas, oito (50%) eram oriundas da borracharia, das quais uma representa amostra de um *pool* de 10 fêmeas e as outras sete, de fêmeas individuais. Em todas as 16 amostras, foi detectado apenas um sorotipo de DENV, de acordo com a seguinte distribuição: quatro (25%) com DENV-1, duas (13%) com DENV-2, cinco (31%) com DENV-3 e cinco (31%) com DENV-4 (Figura 42). Todas as amostras positivas foram sequenciadas. DENV-3 e DENV-4 foram os sorotipos mais frequentes detectados.

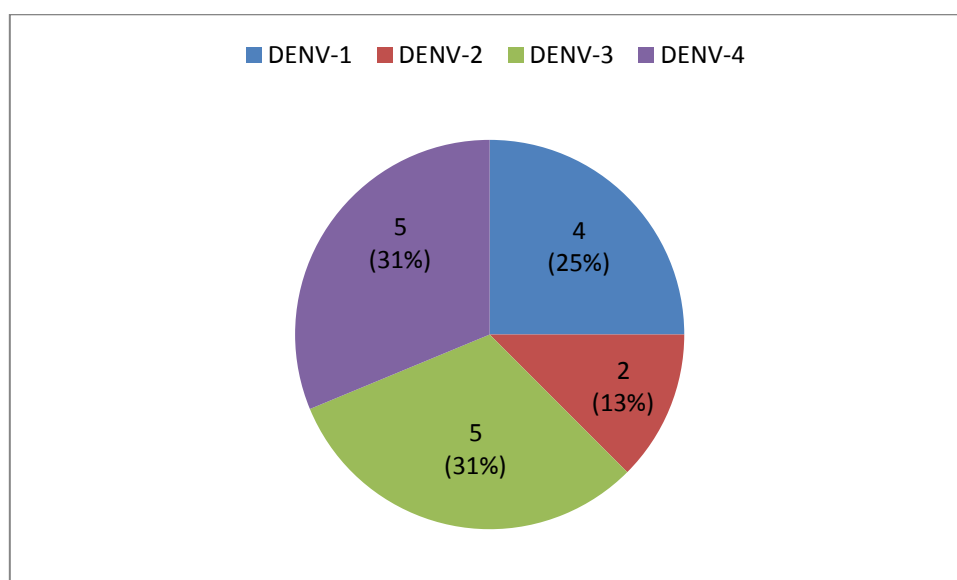


Figura 42- **Distribuição das amostras de fêmeas de *A. aegypti* positivas para DENV quanto ao sorotipo detectado.** Considerando as 16 amostras positivas, em quatro (25%) foi detectado DENV-1, em duas (13%) DENV-2, em cinco (31%) DENV-3 e cinco (31%) DENV-4.

Foram detectados os quatro sorotipos de DENV em oito amostras de fêmeas oriundas da borracharia, de acordo com a seguinte proporção: duas amostras com DENV-1, sendo uma de *pool* de 10 indivíduos e uma de fêmea individual; uma com DENV-2, 3 com DENV-3 e duas com DENV-4.

Considerando os pontos de coleta das 16 amostras positivas para DENV, dez (62,5%) eram oriundas de pontos estratégicos, quatro (25%) de residência de caso suspeito ou confirmado de dengue e duas (13%) de imóveis comuns (Figura 43), o que demonstra a importância do monitoramento de pontos estratégicos nos distritos sanitários. A figura 44 mostra a distribuição das coletas de fêmeas positivas para DENV de acordo com o mês. As 16 amostras de fêmeas positivas para DENV foram obtidas a partir de nove coletas, distribuídas em quatro meses de 2013, da seguinte forma: duas em fevereiro (SE 6), duas em março (SE's 10 e 13), três em abril (SE 15) e duas em junho (SE 25).

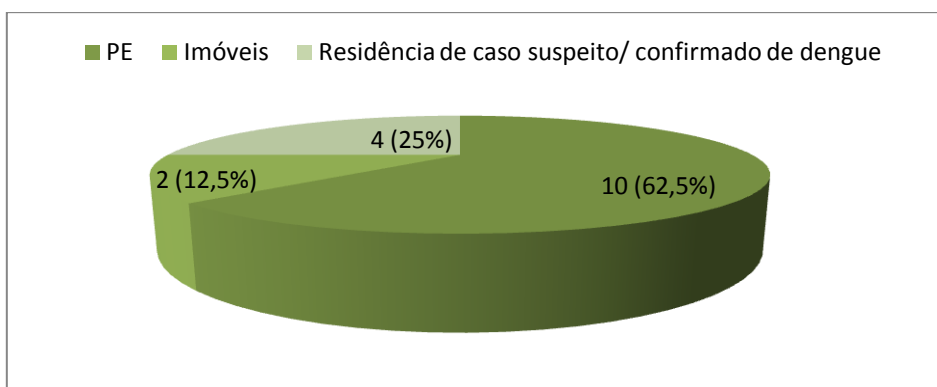


Figura 43- **Tipo de imóvel em que as amostras de fêmeas de *A. aegypti* positivas para DENV foram coletadas, Contagem, 2013.** Das 16 amostras positivas para DENV, dez (62,5%) eram oriundas de pontos estratégicos, quatro (25%) de residência de caso suspeito ou confirmado de dengue e dois (12,5%) de imóveis comuns.

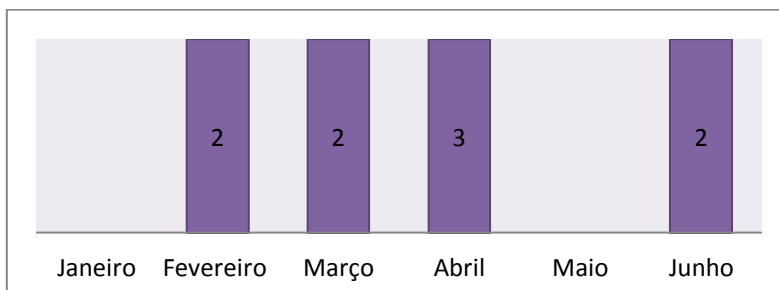


Figura 44- **Distribuição das coletas de fêmeas de *A. aegypti* positivas para DENV de acordo com o mês de 2013, Contagem.** As 16 amostras positivas foram obtidas a partir de nove coletas, distribuídas em quatro meses: duas em fevereiro (SE 6), duas em março (SE's 10 e 13), três em abril (SE 15) e duas em junho (SE 25).

5.6.2- Distribuição espacial de pontos de coletas de fêmeas de *A. aegypti*

A figura 45 mostra a distribuição espacial dos pontos de coletas de fêmeas de *A. aegypti* no distrito sanitário Eldorado de acordo com o mês de 2013. Por meio da observação do mapa, é possível perceber que houve captura de fêmeas de *A. aegypti* em pontos diversos do distrito sanitário Eldorado nos meses de janeiro, fevereiro, março, abril e junho de 2013. Esse achado evidencia a dispersão e adaptação do vetor em meio urbano, o que também foi corroborado pela distribuição espacial dos *pools* de larva coletados em três LIRAs distintas na área geográfica do distrito.

É possível observar que houve captura de fêmeas de *A. aegypti* positivas para DENV nos meses de fevereiro, março, abril e junho de 2013. Considerando esses locais, verifica-se que, apesar da instalação das armadilhas BGS não ter ocorrido simultaneamente, existe proximidade espacial entre quatro dos nove pontos em que foram detectadas fêmeas positivas para DENV, localizados no Conjunto Água Branca, referentes a duas coletas realizadas em fevereiro, uma em março e outra em junho. Pode-se também verificar proximidade espacial e temporal (mesma SE), entre dois pontos de coleta de fêmeas positivas para DENV realizadas em abril de 2013 no Conjunto Jardim Eldorado. Os outros três pontos encontram-se em áreas diferentes do distrito.

A figura 46 apresenta os sorotipos de DENV detectados nos pontos de coletas de fêmeas de *A. aegypti* positivas. Considerando os quatro pontos de coleta com proximidade espacial no bairro Conjunto Água Branca, foram detectados os quatro sorotipos de DENV na borracharia considerada PE em coleta realizada no mês de fevereiro, SE 6. Nessa mesma SE, foi detectado DENV-1, em imóvel de caso confirmado de dengue. Em uma residência localizada ao lado da borracharia, foi detectado DENV-4 no mês de março (SE 10). Em junho (SE 25), foi também detectado DENV-1 em um ponto estratégico do bairro (ferro-velho). Nos dois pontos de coleta no bairro Conjunto Jardim Eldorado, entre os quais foi verificada proximidade espacial e temporal (SE 15), foi detectado DENV-4 e tratava-se de imóveis de casos suspeitos de dengue. Em relação aos outros três pontos, em dois foram detectados DENV-3 e um, DENV-2. As coletas de fêmeas positivas para DENV-3 foram realizadas em março e junho de 2013, em residência de suspeitos de dengue e em uma borracharia considerada ponto estratégico, respectivamente. A fêmea de *A. aegypti* detectada com DENV-2 foi coletada em abril (SE 15) em uma empresa do distrito Eldorado.

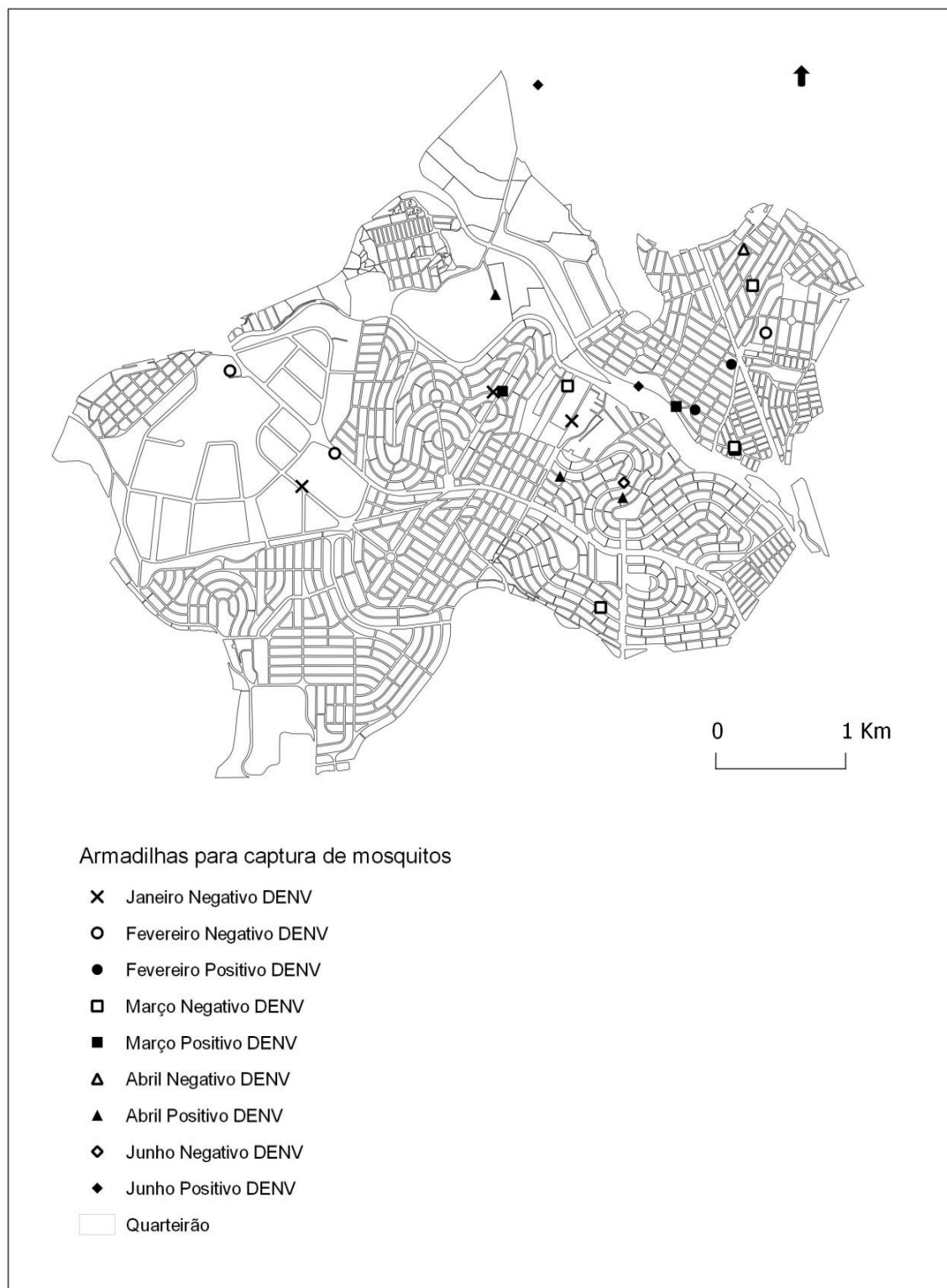


Figura 45- **Distribuição espacial de pontos de coleta de fêmeas de *A. aegypti* no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG, de acordo com o mês de coleta em 2013.** O mapa foi confeccionado por meio do software QUANTUM GIS versão 2.0.1. A base de endereços de Contagem foi cedida pela Prefeitura Municipal de Contagem. Sistema de Coordenadas: UTM; Datum: SIRGAS2000.

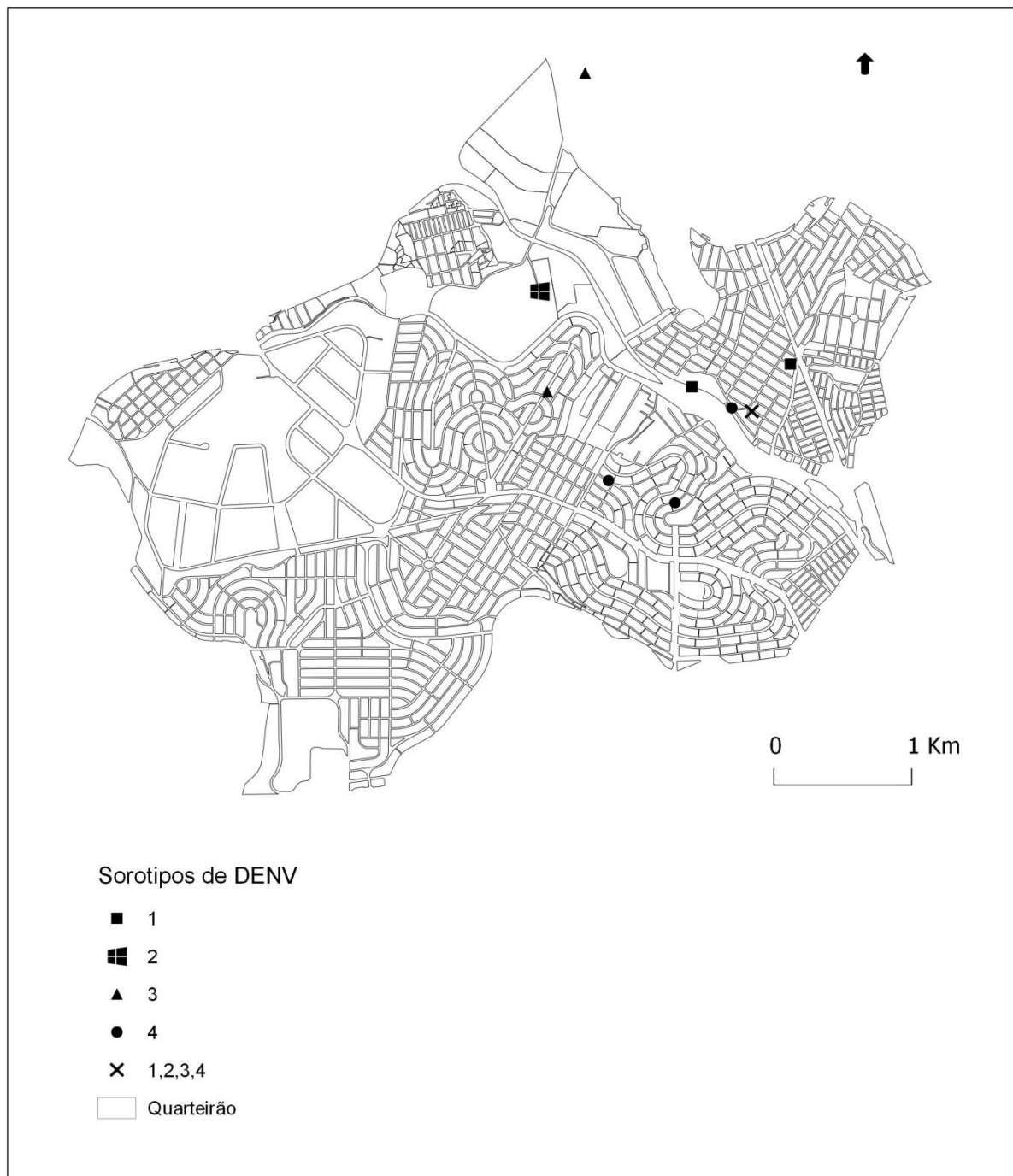


Figura 46- Distribuição espacial de pontos de coleta de fêmeas de *A. aegypti* positivas para DENV no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG. O mapa foi confeccionado por meio do software QUANTUM GIS versão 2.0.1. A base de endereços de Contagem foi cedida pela Prefeitura Municipal de Contagem. Sistema de Coordenadas: UTM; Datum: SIRGAS2000.

5.6.3- Identificação das espécies em que fêmeas de *A. aegypti* ingurgitadas com sangue realizaram repasto sanguíneo

Um total de 25 fêmeas de *A. aegypti*, coletadas e processadas individualmente, estavam ingurgitadas com sangue. Essa observação foi possível durante o processo de maceração dos mosquitos em Trizol. Quando fêmeas ingurgitadas com sangue são maceradas é possível visualizar alteração na cor do Trizol, de rosa claro para vermelho (Figura 47).

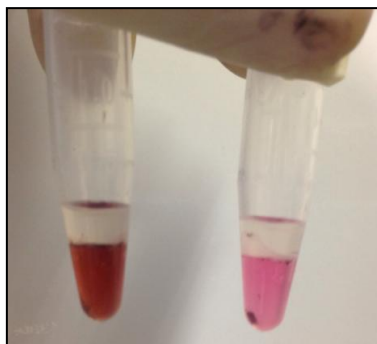


Figura 47- **Alteração de coloração do Reagente Trizol, de rosa claro para vermelho, quando fêmeas de *A. aegypti* ingurgitadas com sangue são maceradas.** Tubo da esquerda: fêmea macerada ingurgitada com sangue; Tubo da direita: fêmea macerada não ingurgitada com sangue.

Das 25 fêmeas de *A. aegypti* ingurgitadas com sangue, 18 (72%) foram coletadas na borracharia enquanto as outras sete (28%) foram coletadas em outros pontos. A distribuição de fêmeas processadas individualmente ingurgitadas com sangue e não ingurgitadas coletadas na borracharia e nos demais pontos pode ser visualizada na Figura 48.

Todas as 25 fêmeas identificadas com sangue foram submetidas à estratégia de PCR utilizando os iniciadores que amplificam as regiões 12S e 16S ribossomais. Desse total, apenas cinco amostras tiveram o DNA da região 12S amplificado e esses produtos de PCR foram sequenciados. Quatro fêmeas estavam ingurgitadas com sangue de *Homo sapiens* e uma com sangue de *Canis lupus familiaris* (cão doméstico). Uma das fêmeas ingurgitadas com sangue de *H. sapiens* foi coletada na borracharia no mês de fevereiro de 2013 (SE 6), as outras três eram provenientes de um mesmo imóvel, cujos residentes queixavam-se da presença de mosquitos e foram coletadas em abril de 2013 (SE 16).

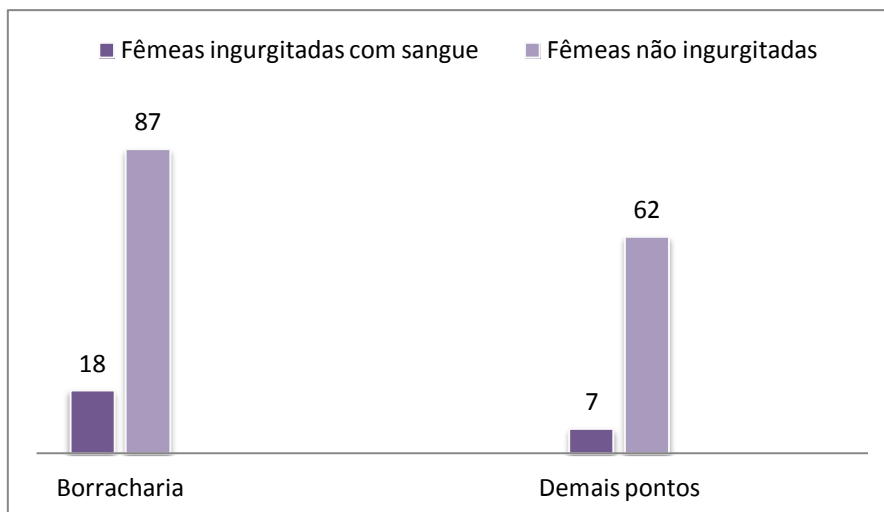


Figura 48- **Distribuição de fêmeas de *A. aegypti* processadas individualmente ingurgitadas com sangue e não ingurgitadas coletadas na borracharia e nos demais pontos.** Das 105 fêmeas coletadas na borracharia, 18 (17,14%) estavam ingurgitadas com sangue. Das 69 fêmeas coletadas nos demais pontos, 7 (10,1%) estavam ingurgitadas com sangue.

A fêmea ingurgitada com sangue de *Canis lupus familiaris* foi coletada em um imóvel localizado ao lado da borracharia no mês de março de 2013 (SE 10), cujos residentes também queixavam-se da presença de mosquitos em função da proximidade a esse local problema. Nenhuma dessas cinco amostras foi positiva para DENV, mas na borracharia e no imóvel localizado ao lado da mesma foram coletadas fêmeas positivas para DENV.

5.7- Distribuição espacial de residências de pacientes, larvas e mosquitos positivos para DENV

As figuras 49 e 50 apresentam a distribuição espacial de residências de pacientes e pontos de coleta de *pools* de larvas e fêmeas de *A. aegypti* positivos para DENV, de acordo com o mês/ ano e sorotipo detectado, respectivamente, no distrito sanitário Eldorado. É possível observar mosquitos positivos nos meses de fevereiro, março, abril e junho de 2013. *Pools* de larvas de *A. aegypti* coletados em março e outubro de 2013 e janeiro de 2014 foram positivos para DENV. Os pacientes desse estudo apresentaram início de sintomas no mês de maio de 2013. Verifica-se proximidade geográfica entre residências de alguns pacientes positivos para DENV e, em dois desses casos foi detectado DENV-3. Nas outras duas residências de casos humanos próximos, foram detectados DENV-1 e coinfeção por DENV-3 e DENV-4. As mesmas estão próximas a imóveis em que foram coletados *pools* de larvas em março de 2013, positivos para DENV-3 e DENV-3 e DENV-4, e em janeiro de 2014, positivo para DENV-3.

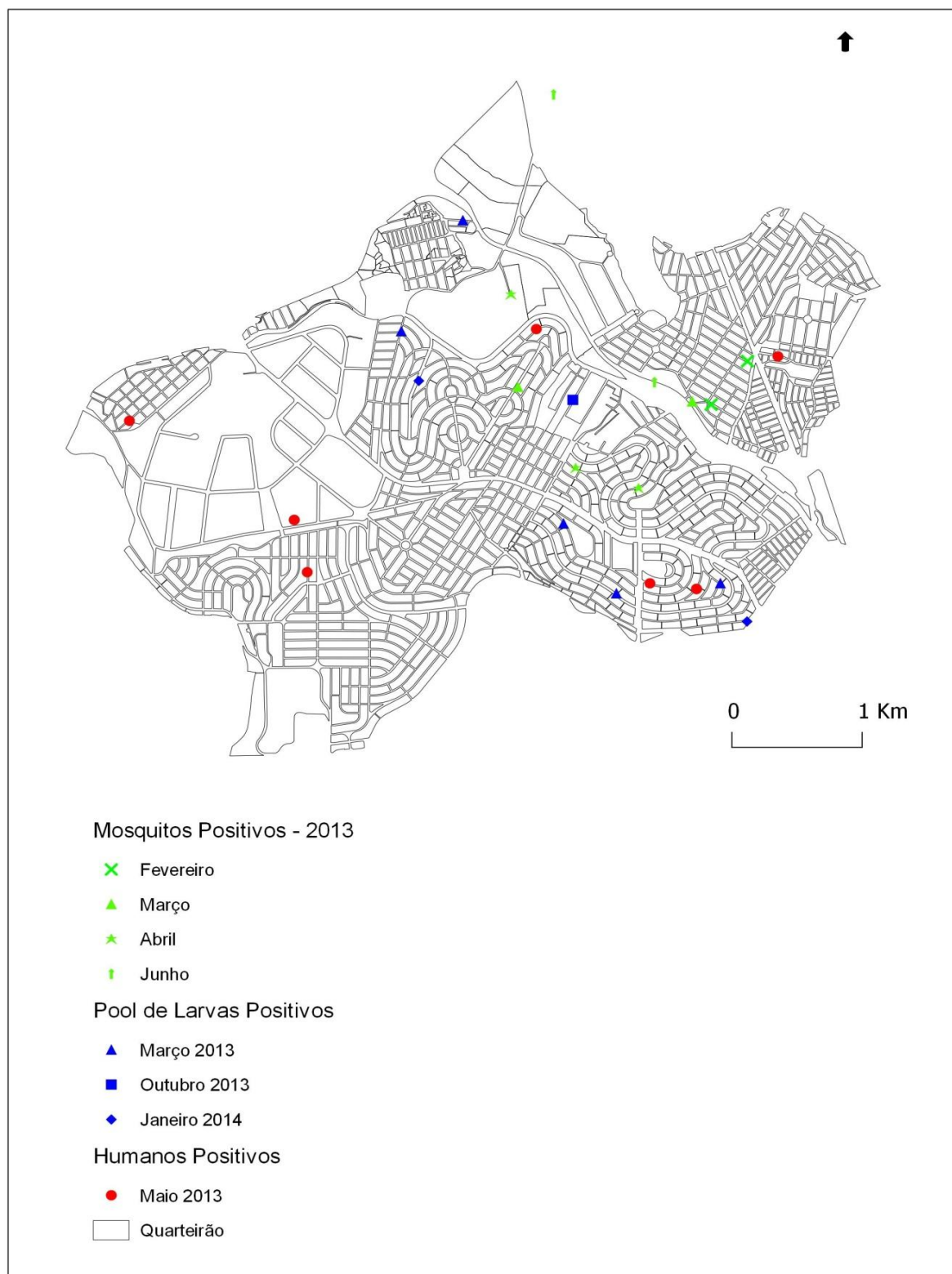


Figura 49- Distribuição espacial dos endereços residenciais dos pacientes e pontos de coleta de *pools* de larvas e fêmeas de *A. aegypti* positivos para DENV no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG, de acordo com o mês e ano. O mapa foi confeccionado por meio do software QUANTUM GIS versão 2.0.1. A base de endereços de Contagem foi cedida pela Prefeitura Municipal de Contagem. Sistema de Coordenadas: UTM; Datum: SIRGAS2000.

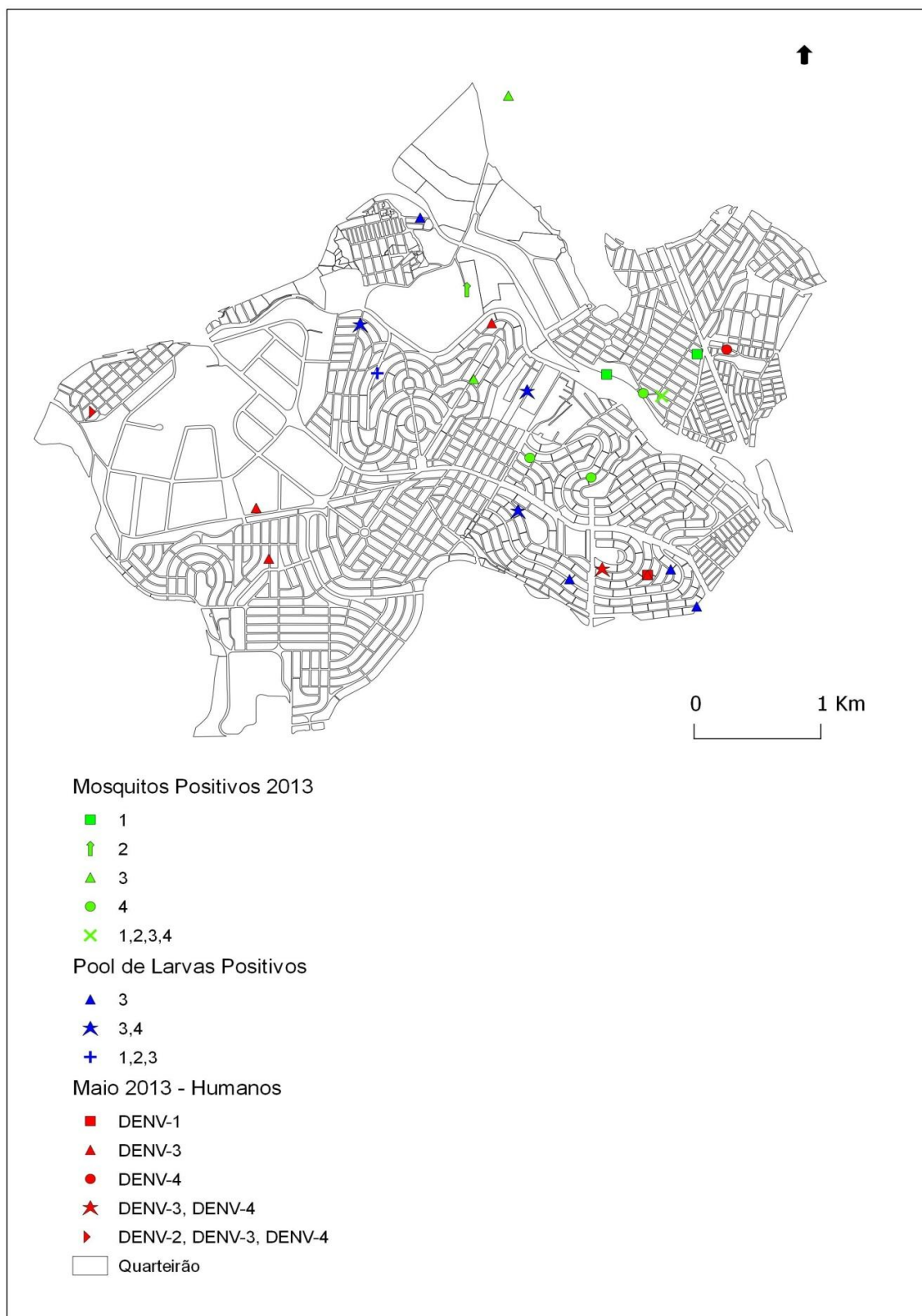


Figura 50- **Distribuição espacial dos endereços residenciais dos pacientes e pontos de coleta de pools de larvas e fêmeas de *A. aegypti* positivos para DENV no distrito sanitário Eldorado, Contagem, MG, de acordo com o sorotipo detectado.** O mapa foi confeccionado por meio do software QUANTUM GIS versão 2.0.1. A base de endereços de Contagem foi cedida pela Prefeitura Municipal de Contagem. Sistema de Coordenadas: UTM; Datum: SIRGAS2000.

O Conjunto Água Branca, onde existem quatro imóveis em que foram coletados mosquitos positivos para os quatro sorotipos nos meses de fevereiro, março e junho de 2013, é o bairro de residência de um paciente detectado com DENV-4. Também foi observada proximidade entre residência de um paciente positivo para DENV-3 e local em que foi coletado mosquito positivo para DENV-3, em março de 2013, no bairro Conjunto Jardim Eldorado.

Observa-se que os casos humanos, larvas e mosquitos positivos para DENV estão distribuídos na área geográfica do distrito Eldorado. No período de fevereiro de 2013 a janeiro de 2014, foram detectados todos os sorotipos de DENV nesse distrito, no entanto, DENV-3 foi o sorotipo predominante.

5.8- Análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas

Ao todo, foram analisadas 37 sequências consenso, distribuídas da seguinte forma: 22 sequências obtidas dos pacientes com dengue, sendo três de DENV-1, quatro de DENV-2, onze de DENV-3 e quatro de DENV-4; oito obtidas de larvas, sendo duas de DENV-1, quatro de DENV-3 e duas de DENV-4; e sete obtidas de mosquito, sendo três de DENV-1, uma de DENV-2, duas de DENV-3 e uma de DENV-4. As sequências obtidas de humanos foram depositadas no GenBank e seus respectivos números de acesso constam na tabela 12. As sequências de larvas e mosquitos estão identificadas na tabela 13.

Para todos os alinhamentos, foram calculadas as taxas de identidade de nucleotídeos (nt) e similaridade de aminoácidos (aa) entre as amostras de DENV de Contagem. Os valores de identidade de nt e similaridade de aa de DENV-1-4 estão expressos em porcentagem e apresentados nas tabelas 14, 15, 16 e 17.

Considerando as amostras de DENV-1 de Contagem (Tabela 14), a porcentagem de identidade de nt variou entre 96,3% a 100% e a similaridade entre todas as sequências de aa foi de 100%. As sequências LarvMG16/2013, LarvMG33/2014 e MosqMG55/2013, todas pertencentes ao genótipo V, foram idênticas. A amostra MG16/2013 apresentou menores valores de identidade de nt quando comparada às demais.

Em relação às amostras de DENV-2 de Contagem (Tabela 15), a porcentagem de identidade de nt variou entre 99,2% a 100% e a similaridade entre as sequências de aa variou de 98,8% a 100%. A

amostra MG38/2013 apresentou os menores valores de identidade de nt e similaridade de aa quando comparada às demais, que foram idênticas entre si (MG36/2013, MG39/2013, MG41/2013 e MosqMG161/2013). Todas pertencem ao genótipo Americano/ asiático.

Tabela 12- Números de acesso no GenBank, sorotipo e genótipo de DENV-1-4 detectados por RT-PCR em amostras clínicas dos pacientes com suspeita de dengue e sequenciados, Contagem, 2013

Identificação	Sorotipo de DENV	Genótipo	Números de acesso no GenBank.
MG2/2013	1	V	KM093798
MG13/2013	1	V	KM093799
MG16/2013	1	V	KM093800
MG36/2013	2	Americano/ Asiático	KM093802
MG38/2013	2	Americano/ Asiático	KM093804
MG39/2013	2	Americano/ Asiático	KM093801
MG41/2013	2	Americano/ Asiático	KM093803
MG10/2013	3	I	KM103087
MG11/2013	3	III	KM103089
MG18/2013	3	III	KM103088
MG19/2013	3	III	KM103090
MG23/2013	3	III	KM103092
MG25/2013	3	III	KM103093
MG36/2013	3	I	KM103094
MG38/2013	3	I	KM103095
MG39/2013	3	I	KM103097
MG41/2013	3	I	KM103096
MG50/2013	3	III	KM103091
MG22/2013	4	I	KM111511
MG39/2013	4	II	KM111509
MG41/2013	4	I	KM111510
MG49/2013	4	II	KM111508

Tabela 13- Identificação, sorotipo e genótipo de DENV-1-4 detectados em larvas e mosquitos por RT-PCR e sequenciados, Contagem, 2013-2014

Identificação	Sorotipo de DENV	Genótipo
LarvaAe.aegyptiMG16_2013	1	V
LarvaAe.aegyptiMG33_2014	1	V
MosqAe.aegyptiMGA11.1_2013	1	V
MosqAe.aegyptiMG16_2013	1	V
MosqAe.aegyptiMG55_2013	1	V
MosqAe.aegyptiMG161_2013	2	Americano/ Asiático
LarAe.aegyptiMG4_2013	3	I
LarAe.aegyptiMG33_2014	3	I
LarAe.aegyptiMG15_2013	3	III
LarAe.aegyptiMG22_2013	3	III
MosqAe.aegyptiMG159_2013	3	I
MosqAe.aegyptiMG162_2013	3	I
LarvaAe.aegyptiMG4_2013	4	I
LarvaAe.aegyptiMG22_2013	4	II
MosqAe.aegyptiMG118_2013	4	II

Tabela 14- Identidade de nucleotídeos (em azul) e similaridade de aa (em vermelho) entre a região C-prM de amostras de DENV-1 oriundas do município de Contagem, Minas Gerais

Amostras (genótipo)	MG2/2013(V)	MG16/2013(V)	MG13/2013(V)	LarvMG16/2013(V)	LarvMG33/2014(V)	MosqMG16/2013(V)	MosqMG55/2013(V)	MosqMG A11.1/2013(V)
MG2/2013 (V)		99,3%	96,6%	96,6%	96,6%	96,8%	96,6%	97,3%
MG16/2013 (V)	100%		96,3%	96,3%	96,3%	96,6%	96,3%	97,5%
MG13/2013 (V)	100%	100%		97%	97%	97,3%	97%	96,3%
LarvMG16/2013 (V)	100%	100%	100%		100%	99,8%	100%	97,8%
LarvMG33/2014 (V)	100%	100%	100%	100%		99,8%	100%	97,8%
MosqMG16/2013 (V)	100%	100%	100%	100%	100%		99,8%	97,8%
MosqMG55/2013 (V)	100%	100%	100%	100%	100%	100%		97,8%
MosqMGA11.1/2013(v)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

Tabela 15- Identidade de nucleotídeos (em azul) e similaridade de aa (em vermelho) entre a região C-prM de amostras de DENV-2 oriundas do município de Contagem, Minas Gerais

Amostras (genótipo)	MG36/2013 (A/A)	MG38/2013 (A/A)	MG39/2013 (A/A)	MG41/2013 (A/A)	MosqMG161/2013 (A/A)
MG36/2013(A/A)*		99,2%	100%	100%	100%
MG38/2013(A/A)	98,8%		99,2%	99,2%	99,2%
MG39/2013(A/A)	100%	98,8%		100%	100%
MG41/2013(A/A)	100%	98,8%	100%		100%
MosqMG161/2013(A/A)	100%	98,8%	100%	100%	

* Americano/asiático

Considerando as amostras de DENV-3 de Contagem (Tabela 16), a porcentagem de identidade de nt variou entre 93,9% a 100% e a similaridade entre as sequências de aa variou de 92,2% a 100%. As amostras do genótipo I, MG10/2013, MG36/2013, MG38/2013, MG39/2013, MG41/2013 e LarvMG4/2013, foram idênticas entre si, bem como as amostras do genótipo III, MG11/2013, MG18/2013, MG19/2013, MG23/2013, MG25/2013, MG50/2013, LarvMG15/2013 e LarvMG22/2013.

Em relação às amostras de DENV-4 de Contagem (Tabela 17), a porcentagem de identidade de nt variou entre 90,2% a 100% e a similaridade entre as sequências de aa variou de 98,5% a 100%. As amostras do genótipo I MG22/2013, MG41/2013 e LarvMG4/2013 foram idênticas entre si.

Tabela 16- Identidade de nucleotídeos (em azul) e similaridade de aa (em vermelho) entre a região C-prM de amostras de DENV-3 oriundas do município de Contagem, Minas Gerais

Amostras (genótipo)	MG10/ 2013(I)	MG36/ 2013(I)	MG38/ 2013(I)	MG39/ 2013(I)	MG41/ 2013(I)	LarvMG33/ 2014(I)	LarvMG4/ 2013(I)	MosqMG159/ 2013(I)	MosqMG162/ 2013(I)	MG11/ 2013 (III)	MG18/ 2013 (III)	MG19/ 2013 (III)	MG23/ 2013 (III)	MG25/ 2013 (III)	MG50/ 2013 (III)	LarvMG15/ 2013 (III)	LarvMG22/ 2013 (III)
MG10/2013 (I)		100%	100%	100%	100%	97,8%	100%	98,9%	98,6%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%
MG36/2013(I)	100%		100%	100%	100%	97,8%	100%	98,9%	98,6%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%
MG38/2013(I)	100%	100%		100%	100%	97,8%	100%	98,9%	98,6%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%
MG39/2013(I)	100%	100%	100%		100%	97,8%	100%	98,9%	98,6%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%
MG41/2013(I)	100%	100%	100%	100%		97,8%	100%	98,9%	98,6%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%
LarvMG33/ 2014(I)	97,8%	97,8%	97,8%	97,8%	97,8%		97,8%	96,8%	96,4%	96,8%	96,8%	96,8%	96,8%	96,8%	96,8%	96,8%	96,8%
LarvMG4/ 2013(I)	100%	100%	100%	100%	100%	97,8%		98,9%	98,6%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%
MosqMG159/ 2013(I)	98,9%	98,9%	98,9%	98,9%	98,9%	96,7%	98,9%		98,2%	94,3%	94,3%	94,3%	94,3%	94,3%	94,3%	94,3%	94,3%
MosqMG162/ 2013(I)	96,6%	96,6%	96,6%	96,6%	96,6%	94,4%	96,6%	97,8%		93,9%	93,9%	93,9%	93,9%	93,9%	93,9%	93,9%	93,9%
MG11/2013(III)	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	95,6%	93,3%	92,2%	90%		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
MG18/2013 (III)	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	95,6%	93,3%	92,2%	90%	100%		100%	100%	100%	100%	100%	100%
MG19/2013 (III)	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	95,6%	93,3%	92,2%	90%	100%	100%		100%	100%	100%	100%	100%
MG23/2013(III)	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	95,6%	93,3%	92,2%	90%	100%	100%	100%		100%	100%	100%	100%
MG25/2013(III)	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	95,6%	93,3%	92,2%	90%	100%	100%	100%	100%		100%	100%	100%
MG50/2013(III)	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	95,6%	93,3%	92,2%	90%	100%	100%	100%	100%	100%		100%	100%
LarvMG15/ 2013 (III)	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	95,6%	93,3%	92,2%	90%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		100%
LarvMG22/ 2013 (III)	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	93,3%	95,6%	93,3%	92,2%	90%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

Tabela 17- Identidade de nucleotídeos (em azul) e similaridade de aa (em vermelho) entre a região C-prM de amostras de DENV-4 oriundas do município de Contagem, Minas Gerais

Amostras (genótipos)	LarvMG4/2013 (I)	LarvMG22/2013 (II)	MosqMG118/2013 (II)	MG39/2013(II)	MG49/2013(II)	MG22/2013 (I)	MG41/2013(I)
LarvMG4/2013 (I)		97,4%	96%	97,5%	97%	100%	100%
LarvMG22/2013(II)	98%		98,7%	99%	98,5%	98,5%	98,5%
MosqMG118/2013(II)	99%	100%		92,5%	93%	90,2%	90,2%
MG39/2013 (II)	98,5%	100%	100%		99,5%	97,5%	97,5%
MG49/2013 (II)	98,5%	100%	100%	100%		97%	97%
MG22/2013 (I)	100%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%		100%
MG41/2013 (I)	100%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	100%	

O alinhamento de nt e aa das amostras de DENV-1-4 de Contagem estão apresentados nas Figuras 51 e 52, respectivamente. As posições dos nt e aa estão exibidas em relação às sequências brasileiras BIDV2401_2008 (FJ850093) e BR_90 para DENV-1, Rio de Janeiro/1998 (AF489932) para DENV-2, Piauí 64/2006 (GU568698), pertencente ao genótipo III, e Minas Gerais 20/2004 (EF4228572), pertencente ao genótipo I, para DENV-3 e Amazonas/2008 (EU127899), pertencente ao genótipo I, para DENV-4, respectivamente.

60

D1BR_BIDV2401_2008	AGA AAC CGC GTG TCA ACT GGT TCA CAG TTG GCG AAG AGA TTC TCA AAA GGA TTG CTT TCA
D1BR90AF226685	...
D1_BRMG-13_FD_2013	...
D1BR_MG-2_FD_2013	...
D1_LARVAe_MG332014	..G
D1MosqAeMG55_2013	..G
D1_LAR_Ae_MG16_2013	..G
D1MosqAe_MGA11.1_2013	..G
D1MosqAe_MG16_2013	...
D1_BR_MG-16_FD_2013	...

120

D1BR_BIDV2401_2008	GGC CAA GGA CCC ATG AAA TTG GTG ATG GCT TTC ATA GCA TTT CTA AGA TTT CTA GCC ATA
D1_BR_90226685	...
D1BR_MG-13_FD_2013C
D1BR_MG-2_FD_2013	...
D1_LAR_Ae_MG332014	...
D1MosqAeMG55_2013	...
D1_LAR_Ae_MG16_2013	...
D1MosqAe_MGA11.1_2013	...
D1MosqAe_MG16_2013	...
D1_BR_MG-16_FD_2013T

180

D1BR_BIDV2401_2008 CCC CCA ACA GCA GGA ATT TTG GCT AGA TGG AGC TCA TTC AAG AAG AAT GGA GCG ATC AAA
D1_BR_90226685A
D1BR_MG-13_FD_2013
D1BR_MG-2_FD_2013
D1_LAR_Ae_MG332014 ..T .. .
D1MosqAeMG55_2013 ..T .. .
D1_LAR_Ae_MG16_2013 ..T .. .
D1MosqAe_MGA11.1_2013..T .. .
D1MosqAe_MG16_2013 ..T .. .
D1_BR_MG-16_FD_2013

240

D1BR_BIDV2401_2008 GTG TTA CGG GGT TTC AAA AAA GAG ATC TCA AGC ATG TTG AAC ATA ATG AAC AGG AGG AAA
D1_BR_90226685C..
D1BR_MG-13_FD_2013
D1BR_MG-2_FD_2013G .. .A .. .
D1_LAR_Ae_MG332014
D1MosqAeMG55_2013
D1_LAR_Ae_MG16_2013
D1MosqAe_MGA11.1_2013... .. .A .. .G .. .A .. .
D1MosqAe_MG16_2013
D1_BR_MG-16_FD_2013G .. .A .. .

300

D1BR_BIDV2401_2008 AGA TCC GTG ACC ATG CTC CTC ATG CTG CTG CCC ACA GCC CTG GCG TTC CAT TTG ACC ACA
D1_BR_90226685
D1BR_MG-13_FD_2013T .. .
D1BR_MG-2_FD_2013C .. .T .. .
D1_LAR_Ae_MG332014
D1MosqAeMG55_2013
D1_LAR_Ae_MG16_2013A .. .
D1MosqAe_MGA11.1_2013... .. .
D1MosqAe_MG16_2013A .. .
D1_BR_MG-16_FD_2013C .. .T .. .

360

D1BR_BIDV2401_2008 CGA GGG GGA GAG CCA CAC ATG ATA GTT AGT AAG CAG GAA AGA GGA AAG TCA CTC TTG TTT
D1_BR_90226685
D1BR_MG-13_FD_2013
D1BR_MG-2_FD_2013T .. .C .. .C .. .
D1_LAR_Ae_MG332014G .. .C .. .
D1MosqAeMG55_2013G .. .C .. .
D1_LAR_Ae_MG16_2013G .. .C .. .
D1MosqAe_MGA11.1_2013... .. .C .. .C .. .
D1MosqAe_MG16_2013G .. .C .. .
D1_BR_MG-16_FD_2013C .. .C .. .

D1BR_BIDV2401_2008 AAG ACC TCT GCA GGT GTC AAT ATG TGC ACT CTC ATT GCG ATG GAC T
D1_BR_90226685GT .
D1BR_MG-13_FD_2013G ..CC
D1BR_MG-2_FD_2013TT
D1_LAR_Ae_MG332014TT
D1MosqAeMG55_2013TT
D1_LAR_Ae_MG16_2013TT
D1MosqAe_MGA11.1_2013CT
D1MosqAe_MG16_2013TT
D1_BR_MG-16_FD_2013TCT

D2BR_RJ1998_AF489932 AGA AAC CGC GTG TCA ACT GTG CAA CAG CTG ACA AAG AGA TTC TCA CTT GGA ATG CTG CAA
D2BRMG39_2013
D2MosqAeMG161_2013
D2BRMG36_2013
D2BRMG41_2013
D2BRMG38_2013

D2BR_RJ1998_AF489932 GGA CGA GGA CCA TTA AAA CTG TTC ATG GCC CTT GTG GCG TTC CTT CGT TTC CTA ACA ATC
D2BRMG39_2013C
D2MosqAeMG161_2013C
D2BRMG36_2013C
D2BRMG41_2013C
D2BRMG38_2013C

D2BR_RJ1998_AF489932 CCA CCA ACA GCA GGG ATA CTG AAA AGA TGG GGA ACG ATC AAA AAA TCA AAA GCT ATC AAT
D2BRMG39_2013AG
D2MosqAeMG161_2013AG
D2BRMG36_2013AG
D2BRMG41_2013AG
D2BRMG38_2013AG

D2BR_RJ1998_AF489932 GTT TTG AGA GGG TTC AGG AAA GAG ATT GGA AGG ATG CTG AAC ATC TTG AAC AGG AGA CGC
D2BRMG39_2013T
D2MosqAeMG161_2013T
D2BRMG36_2013T
D2BRMG41_2013T
D2BRMG38_2013T

D2BR_RJ1998_AF489932 AGG ACA GCA GGC GTG ATT ATT ATG TTG ATT CCA ACA GCA ATG GCG TTC CAT TTA ACC ACA
D2BRMG39_2013GG
D2MosqAeMG161_2013GG
D2BRMG36_2013GG
D2BRMG41_2013GG
D2BRMG38_2013GG

360

D2BR_RJ1998_AF489932 CGT AAT GGA GAA CCA CAC ATG ATC GTT GGT AGG CAA GAG AAA GGG AAA AGT CTT CTG TTT
D2BRMG39_2013 ..CGC
D2MosqAeMG161_2013 ..CGC
D2BRMG36_2013 ..CGC
D2BRMG41_2013 ..CGC
D2BRMG38_2013 ..CGC

420

D2BR_RJ1998_AF489932 AAA ACA GAG GAT GGT GTT AAC ATG TGC ACC CTC ATG GCC ATA GAC CTT GGT GAA TTG TGT
D2BRMG39_2013TG ...
D2MosqAeMG161_2013TG ...
D2BRMG36_2013TG ...
D2BRMG41_2013TG ...
D2BRMG38_2013TG ...

480

D2BR_RJ1998_AF489932 GAA GAT ACA ATC ACG TAC AAG TGT CCC CTC CTC AGG CAA AAT GAA CCA GAA GAC ATA GAT
D2BRMG39_2013ATT ..C
D2MosqAeMG161_2013ATT ..C
D2BRMG36_2013ATT ..C
D2BRMG41_2013ATT ..C
D2BRMG38_2013ATT ...

491

D2BR_RJ1998_AF489932 TGT TGG TGC AA
D2BRMG39_2013
D2MosqAeMG161_2013
D2BRMG36_2013
D2BRMG41_2013
D2BRMG38_2013 GT. G.. ..

60

D3BR_PI_PI64_2006GU568698 CGC GCG AGA AAC CGT GTG TCA ACT GGA TCA CAG TTG GCG AAG AGA TTC TCA AAA GGA CTG
D3BRMG20_2004EF4228572G. ... T..
D3BR_MG10_2013G. ... T..
D3BR_MG18_2013
D3BR_MG11_2013
D3BR_MG19_2013
D3BR_MG50_2013
D3BR_MG41_2013G. ... T..
D3BR_MG39_2013G. ... T..
D3BR_MG23_2013
D3BR_MG38_2013G. ... T..
D3BR_MG25_2013
D3BR_MG36_2013G. ... T..
D3LarAeMG4_2013G. ... T..
D3LarAeMG15_2013
D3LarAeMG22_2013
D3LarAe.aegyptiMG33_2014G. ... T..
D3MosqAe.MG159_2013C. ... G. ... T..
D3MosqAeiMG162_2013C. ... G. ... T..

D4BR_AM_2008EU127899	GTA TCA ACC CCT CAA GGG TTG GTG AAG AGA TTC TCA ACC GGA CTT TTT
D4MOSQAeM118_2013
D4LARAe_MG4_2013
D4LARAe_MG22_2013
D4MG22_2013
D4MG49_2013
D4MG41_2013
D4MG39_2013

D4BR_AM_2008 EU127899	TCC GGG AAA GGA CCC TTG CGG ATG GTG CTA GCA TTC ATC ACG TTT TTG
D4MOSQAeM118_2013	. T A C
D4LARAe_MG4_2013 A
D4LARAe_MG22_2013	. T A
D4MG22_2013 A
D4MG49_2013	. T A C
D4MG41_2013 A
D4MG39_2013	. T A

D4BR_AM_2008EU127899	CGA GTC CTT TCC ATC CCA CCA ACA GCA GGG ATT CTG AAA AGA TGG GGA
D4MOSQAeM118_2013 G
D4LARAe_MG4_2013
D4LARAe_MG22_2013 G
D4MG22_2013
D4MG49_2013 G
D4MG41_2013
D4MG39_2013 G

D4BR_AM_2008EU127899	CAG TTG AAG AAA AAC AAG GCC ATC AAA ATA CTG ACT GGA TTC AGG AAG GAG ATA G
D4MOSQAeM118_2013 T G T
D4LARAe_MG4_2013
D4LARAe_MG22_2013 T
D4MG22_2013
D4MG49_2013 T G T
D4MG41_2013
D4MG39_2013 T G T

Figura 51- Alinhamento da sequência de nt da região C-prM das amostras de DENV-1-4 obtidas em Contagem. As amostras de referência estão destacadas em vermelho e as amostras de Contagem estão em preto. (.) indica identidade de nt. As mutações verificadas nas amostras de Contagem estão em amarelo.

D1BR_BIDV2401_2008 RNRVSTGSQL AKRFSKGLLS GQGPMKLVMA FIAFLRFLAI PPTAGILARW SSFKKNGAIK
D1_BR_90226685
D1BR_MG-13_FD_2013
D1BR_MG-2_FD_2013
D1_LAR_Ae_MG332014
D1MosqAeMG55_2013
D1_LAR_Ae_MG16_2013
D1MosqAe_MGA11.1_2013
D1MosqAe_MG16_2013
D1_BR_MG-16_FD_2013

D1BR_BIDV2401_2008 VLRGFKKEIS SMLNIMNRRK RSVTMLLMLL PTALAFHLTT RGGEPMIIVS KQER GKSLLF
D1_BR_90226685
D1BR_MG-13_FD_2013
D1BR_MG-2_FD_2013 I
D1_LAR_Ae_MG332014
D1MosqAeMG55_2013
D1_LAR_Ae_MG16_2013
D1MosqAe_MGA11.1_2013 I K
D1MosqAe_MG16_2013
D1_BR_MG-16_FD_2013 I

D1BR_BIDV2401_2008 KTSAGVNMCT LIAMD
D1_BR_90226685
D1BR_MG-13_FD_2013
D1BR_MG-2_FD_2013 V
D1_LAR_Ae_MG332014
D1MosqAeMG55_2013
D1_LAR_Ae_MG16_2013
D1MosqAe_MGA11.1_2013
D1MosqAe_MG16_2013
D1_BR_MG-16_FD_2013 V

D2BR_RJ1998_AF489932 RNRVSTVQQL TKRFSLGMLQ GRGPLKLFMA LVAF LRFLTI PPTAGILKRW GTIKKSKAIN
D2BRMG39_2013
D2MosqAeMG161_2013
D2BRMG36_2013
D2BRMG41_2013
D2BRMG38_2013

D2BR_RJ1998_AF489932 VLRGFRKEIG RMLNILNRRR RTAGVIIMLI PTAMAFHLTT RNGEPHMIVG RQEKGKSLLF
D2BRMG39_2013 V
D2MosqAeMG161_2013 V
D2BRMG36_2013 V
D2BRMG41_2013 V
D2BRMG38_2013 V

D2BR_RJ1998_AF489932 KTEDGVNMCT LMAIDLGELC EDTITYKCPL LRQNEPEDID CWC
D2BRMG39_2013
D2MosqAeMG161_2013
D2BRMG36_2013
D2BRMG41_2013
D2BRMG38_2013 VG

D3BR_PI_PI64_2006GU568698 RARNRVSTGS QLAKRFSKGL LNGQGPMKLV MAFIAFLRFL AIPPTAGVLA RWGTFKKSGA
D3BRMG20_2004EF4228572 R
D3BR_MG10_2013 R
D3BR_MG18_2013
D3BR_MG11_2013
D3BR_MG19_2013
D3BR_MG50_2013
D3BR_MG41_2013 R
D3BR_MG39_2013 R
D3BR_MG23_2013
D3BR_MG38_2013 R
D3BR_MG25_2013
D3BR_MG36_2013 R
D3LarAeMG4_2013 R
D3LarAeMG15_2013
D3LarAeMG22_2013
D3LarAe.aegyptiMG33_2014 R
D3MosqAe.MG159_2013 R
D3MosqAeiMG162_2013 R


```

D3BR_PI_PI64_2006GU568698   IKVLKGFKKE ISNMLSIINK RKKTSLCLMMI
D3BRMG20_2004EF4228572     .....M
D3BR_MG10_2013              .....M
D3BR_MG18_2013              .....M
D3BR_MG11_2013              .....M
D3BR_MG19_2013              .....M
D3BR_MG50_2013              .....M
D3BR_MG41_2013              .....M
D3BR_MG39_2013              .....M
D3BR_MG23_2013              .....M
D3BR_MG38_2013              .....M
D3BR_MG25_2013              .....M
D3BR_MG36_2013              .....M
D3LarAeMG4_2013             .....M
D3LarAeMG15_2013            .....M
D3LarAeMG22_2013            .....M
D3LarAe.aegyptiMG33_2014    .....M
D3MosqAe.MG159_2013         .....M
D3MosqAeiMG162_2013        .....V.....M

```

```

D4BR_AM_2008EU127899 VSTPQGLVKR FSTGLFSGKG PLRMVLAFIT FLRVLSIPPT AGILKRWGQL KKNKAIKILT GFRKEI
D4MOSQAeMG1182013     .....I.....I.....
D4LARAe_MG4_2013      .....I.....I.....
D4LARAe_MG22_2013     .....I.....I.....
D4MG22_2013           .....I.....I.....
D4MG49_2013           .....I.....I.....
D4MG41_2013           .....I.....I.....
D4MG39_2013           .....I.....I.....

```

Figura 52- Alinhamento da sequência de aa da região C-prM das amostras de DENV-1-4 obtidas em Contagem. As amostras de referência estão destacadas em vermelho e as amostras de Contagem estão em preto. (.) indica identidade de aa. As alterações de aa verificadas nas amostras de Contagem estão em azul.

A análise das sequências nucleotídicas das amostras de DENV-1 revelou 24 pontos de mutações quando comparadas à amostra de referência BR_BID2401_2008, sendo 22 transições e duas transversões. Todas essas substituições de nucleotídeos foram silenciosas, exceto em quatro posições onde ocorreram substituição de aminoácidos, duas delas na sequência de mosquito *A. aegypti* MosqMGA11.1/2013 (F por L; R por K) e as outras duas (M por I e A por V) nas sequências MG2_FD_2013 e MG16_FD_2013 (Figuras 51 e 52). No entanto, as sequências de aa permaneceram similares entre si (Tabela 14).

A análise das sequências nucleotídicas das amostras de DENV-2 revelou 18 pontos de mutações quando comparadas à amostra de referência RJ1998, sendo 12 transições e seis transversões. Todas essas substituições de nucleotídeos foram silenciosas, exceto em três posições onde ocorreram substituições de aminoácidos: I por V em todas as sequências de Contagem; W por G e C por V apenas na sequência MG38/2013 (Figuras 51 e 52). Isso explica a similaridade de 98,8% encontrada quando a sequência de aa dessa amostra foi comparada com as demais (Tabela 15).

A análise das sequências nucleotídicas das amostras de DENV-3 revelou 22 pontos de mutações quando comparadas à amostra de referência PI64_2006, pertencente ao genótipo III, sendo 15 transições e sete transversões. A maioria dessas substituições de nucleotídeos foi silenciosa, de forma que apenas em três posições ocorreram substituições de aminoácidos: K por R, somente nas sequências do genótipo I MG10_2013, MG38_2013, MG41_2013, MG39_2013, MG36_2013 LarAeMG4_2013, LarAeMG33_2014, D3MosqAe.MG159_2013, D3MosqAe.MG162_2013; L por V, somente na amostra de mosquito D3MosqAe.MG162_2013 e I por M, em todas as amostras de Contagem. As amostras de Contagem do genótipo I ficaram mais proximamente relacionadas à amostra de referência MG20_2004, também pertencente ao genótipo I (Figuras 51 e 52), enquanto as amostras de Contagem do genótipo III ficaram mais proximamente relacionadas à amostra de referência PI64_2006, pertencente ao genótipo III. Isso explica os menores percentuais de identidade de nt e similaridade de aa encontrados quando sequências de aa de amostras de diferentes genótipos foram comparadas entre si (Tabela 16).

A análise das sequências nucleotídicas das amostras de DENV-4 revelou sete pontos de mutações quando comparadas à amostra de referência AM_2008, pertencente ao genótipo I, sendo todas transições. Todas essas substituições de nucleotídeos foram silenciosas, exceto em duas posições onde ocorreram duas substituições de aminoácidos, F por L e T por I nas sequências MosqMGAe118/2013 e MG49/2013 e apenas T por I nas sequências MG39/2013 e LarAeMG22/2013 (Figuras 51 e 52), todas pertencentes ao genótipo II. As amostras LarAeMG4/2013, MG22/2013 e MG41/2013 pertencentes ao genótipo I foram idênticas entre si e também à amostra de referência, o que não foi observado para as amostras do genótipo II (Tabela 17).

5.9- Análises filogenéticas de DENV oriundo de amostras de humanos, larvas e mosquitos

Dentre as sequências de nucleotídeo consenso obtidas, foram utilizadas aquelas de melhor qualidade para a construção das árvores filogenéticas. Ao todo, foram analisadas 37 sequências obtidas dos pacientes com dengue, de larvas e de mosquitos, que estão identificadas nas tabelas 12 e 13. A sequência consenso obtida para DENV-2 oriunda de larvas apresentou tamanho menor do que aquelas obtidas a partir de amostras de humanos e mosquitos, por isso não pôde ser utilizada nas análises filogenéticas.

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências foram analisadas no programa JModelTest, que seleciona o melhor modelo de substituição de nucleotídeos que se ajusta aos dados analisados. Os melhores modelos de substituição foram: TIM1 com correção gama (TIM1+G) para DENV-1, TIM1 com sítio invariável estimado (TIM3+I) para DENV-2, TIM1 com sítio invariável estimado (TIM2+I) para DENV-3 e TPM2+G com TIM1 com correção gama (TIM3+I) para DENV-4. As árvores filogenéticas de DENV1-4 foram construídas pelo método de Máxima Verossimilhança.

Amostras de DENV-1 oriundas de humanos, larvas e mosquitos pertencem ao genótipo V (Figura 53). As amostras MG2/2013 e MG16/2013, oriundas de humanos, agruparam com amostras brasileiras do Rio de Janeiro (2010), Espírito Santo (2010) e São Paulo (2008) pertencentes à linhagem 6. No mesmo clado dessas amostras, encontra-se uma amostra oriunda de mosquito de Contagem (MGA11.1/2013), além de outras amostras brasileiras e uma do Caribe (1985). A amostra MG13/2013, oriunda de humano, apresentou-se mais divergente, agrupando-se com amostras do Brasil, do Rio de Janeiro (2011) e Mato Grosso do Sul (2010) e no mesmo clado de amostras da Venezuela (1997, 2007) pertencentes à linhagem 1 sublinhagem b. Nesse mesmo clado, encontram-se outras amostras brasileiras: Rio de Janeiro (2011), Alagoas (2010) e Pernambuco (2010). A amostra de mosquito MG55/2013 agrupou com as amostras de larva MG16/2013 e MG33/2014 e no mesmo clado desse grupo encontra-se a amostra de mosquito MG16/2013, amostras brasileiras do Paraná (2000), de Pernambuco (1997) e do Nordeste (2001), bem como uma amostra da Argentina (2000), pertencentes à linhagem 3 (Drumond *et al.*, 2012).

Amostras de DENV-2 oriundas de humanos e mosquito pertencem ao genótipo Americano-asiático (Figura 54), linhagem 2, que inclui amostras brasileiras mais recentes, de 2007 a 2010 (Figueiredo *et al.*, 2014). A amostra de mosquito MG161/2013 agrupou com as amostras de humanos de

Contagem, e esse agrupamento ficou no mesmo clado de amostras brasileiras da Bahia e do Espírito Santo (2010), da República Dominicana (2003), Guatemala (2009) e Guiana Francesa (2006).

As amostras de DENV-3 MG 38/2013, MG36/2013, MG41/2013, MG39/2013, MG10/2013 (oriundas de humanos), MG4/2013, MG33/2014 (oriundas de larvas), MG159/2013 e MG162/2013 (oriundas de mosquitos) pertencem ao genótipo I. As amostras MG23/2013, MG25/2013, MG50/2013, MG19/2013, MG18/2013, MG11/2013 (oriundas de humanos), MG15/2013 e MG22/2013 (oriundas de larvas), pertencem ao genótipo III (Figura 55), linhagem 1 (Araújo *et al.*, 2012). Em relação às amostras do genótipo I, todas as amostras de humanos ficaram no mesmo grupo, juntamente com a amostra de larva MG4/2013 e amostras brasileiras de Minas Gerais (2003, 2004). No mesmo clado desse agrupamento, encontram-se as duas amostras de mosquitos de Contagem e as amostras RO1 (2002), China (1956) e Filipinas (1980). A amostra de larva MG33/2014 apresentou-se mais divergente, mas ainda dentro do genótipo I. Considerando as amostras pertencentes ao genótipo III, todas as amostras de Contagem (humanos e larvas) ficaram no mesmo grupo. No mesmo clado desse agrupamento estão amostras do Piauí (2006), Argentina (2007), Porto Rico (2006) e Paraguai (2003).

As amostras de DENV-4 MG41/2013, MG22/2013 (oriundas de humanos) e MG4/2013 (oriunda de larvas) pertencem ao genótipo I (Figura 56). As amostras MG39/2013, MG49/2013 (oriundas de humanos), MG22/2013 (oriunda de larvas) e MG118/2013 (oriunda de mosquito) pertencem ao genótipo II (Figura 56). Em relação ao genótipo I, as amostras de humanos ficaram agrupadas entre si, no mesmo clado de amostras brasileiras do Amazonas (2008), da Índia (1961) e Filipinas (1956). Considerando o genótipo II, a amostra oriunda de humano MG49/2013 agrupou com amostra de mosquito MG118/2013 e outras amostras brasileiras de Roraima (2010), do Amazonas (2011) e de São Paulo (2011). As amostras MG39/2013 (oriunda de humanos) e MG22/2013 (oriunda de larvas) apresentaram-se mais divergentes, mas ainda dentro do genótipo II.

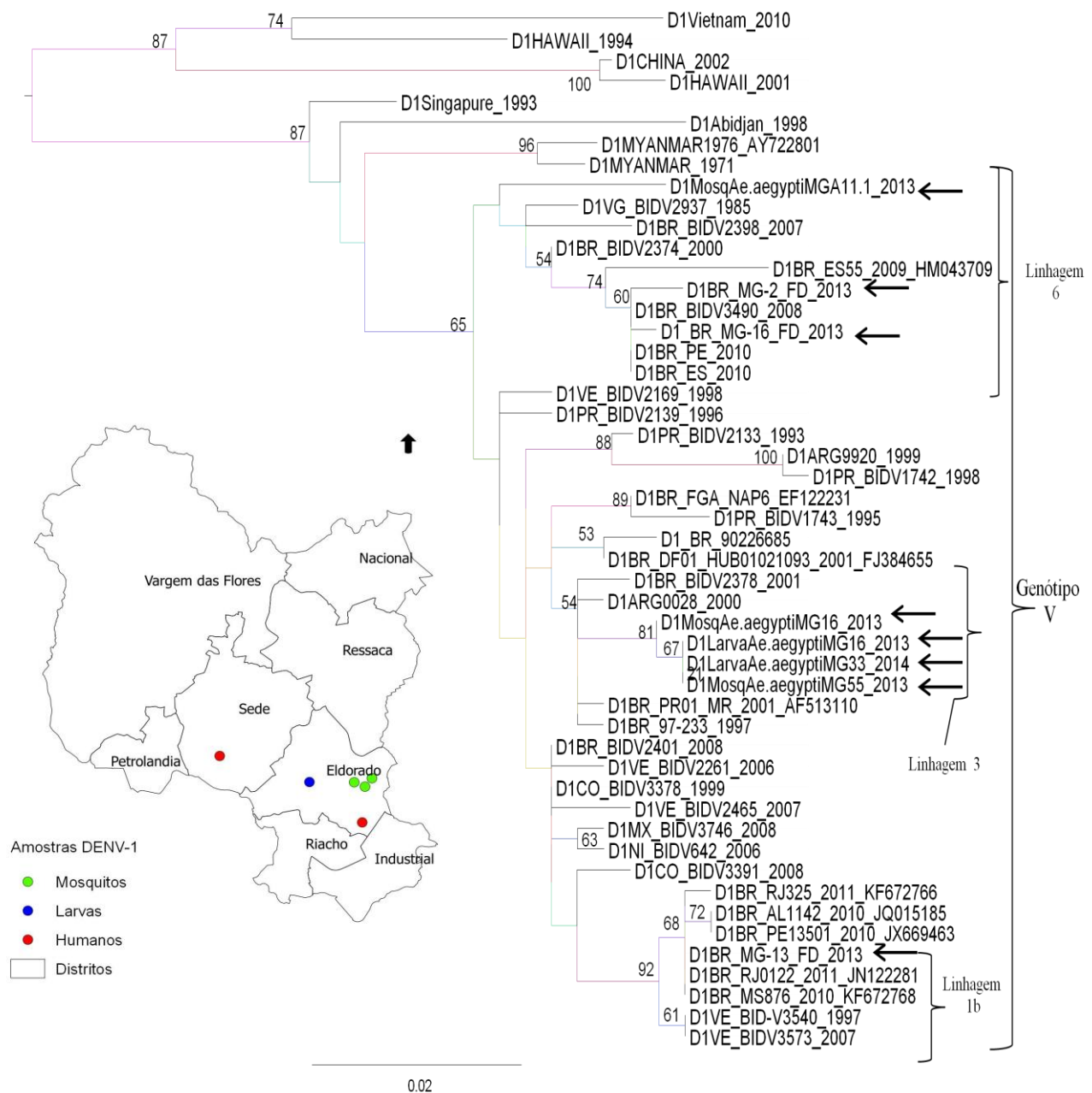


Figura 53 - Árvore filogenética baseada na região C-prM de DENV-1 construída pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa PhyML. Valores de *bootstrap* maiores que 50 são exibidos nos ramos. As amostras de Contagem, MG, estão indicadas por setas.

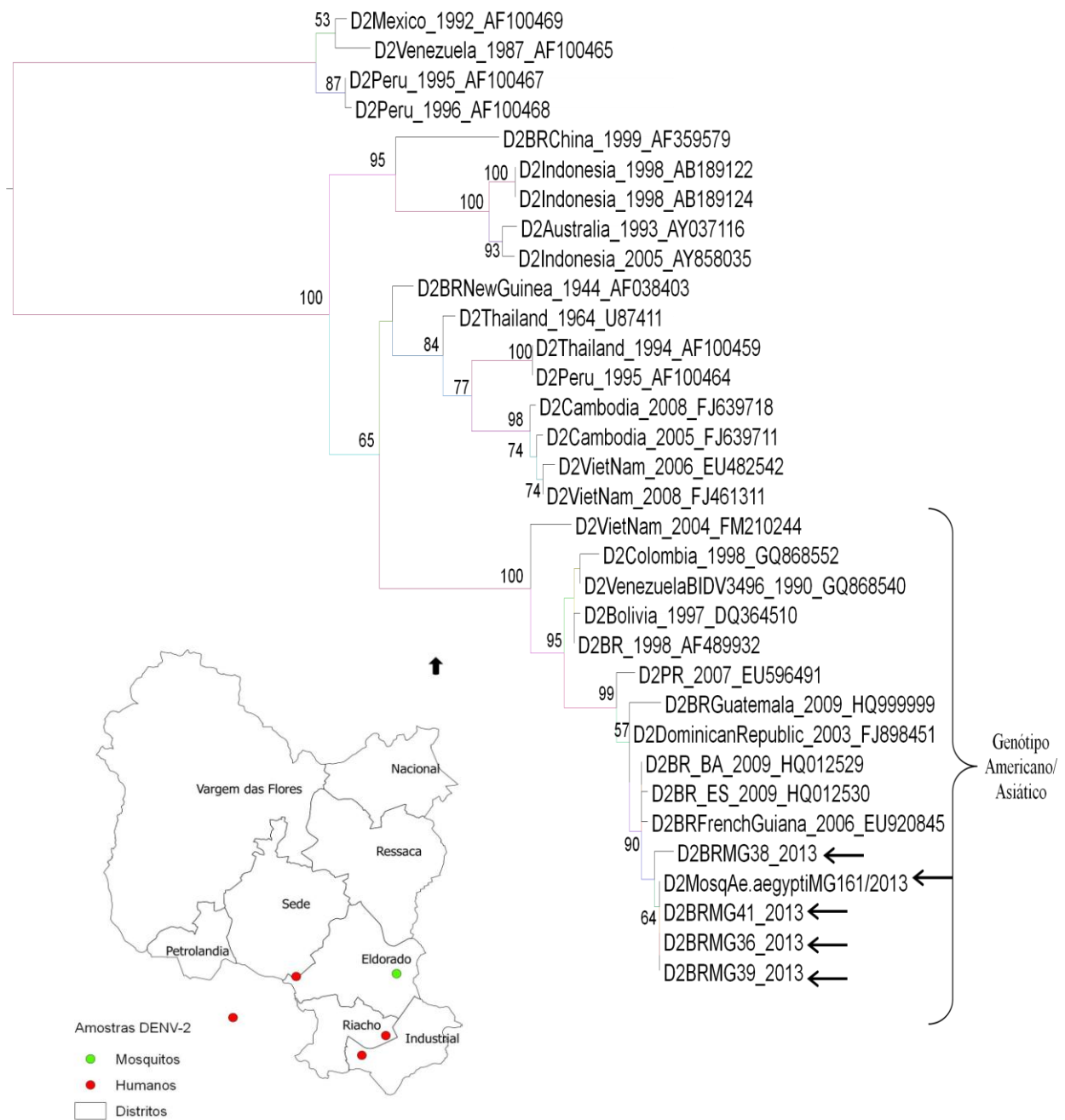


Figura 54- **Árvore filogenética baseada na região C-prM de DENV-2 construída pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa PhyML.** Valores de *bootstrap* maiores que 50 são exibidos nos ramos. As amostras de Contagem, MG, estão indicadas por setas.

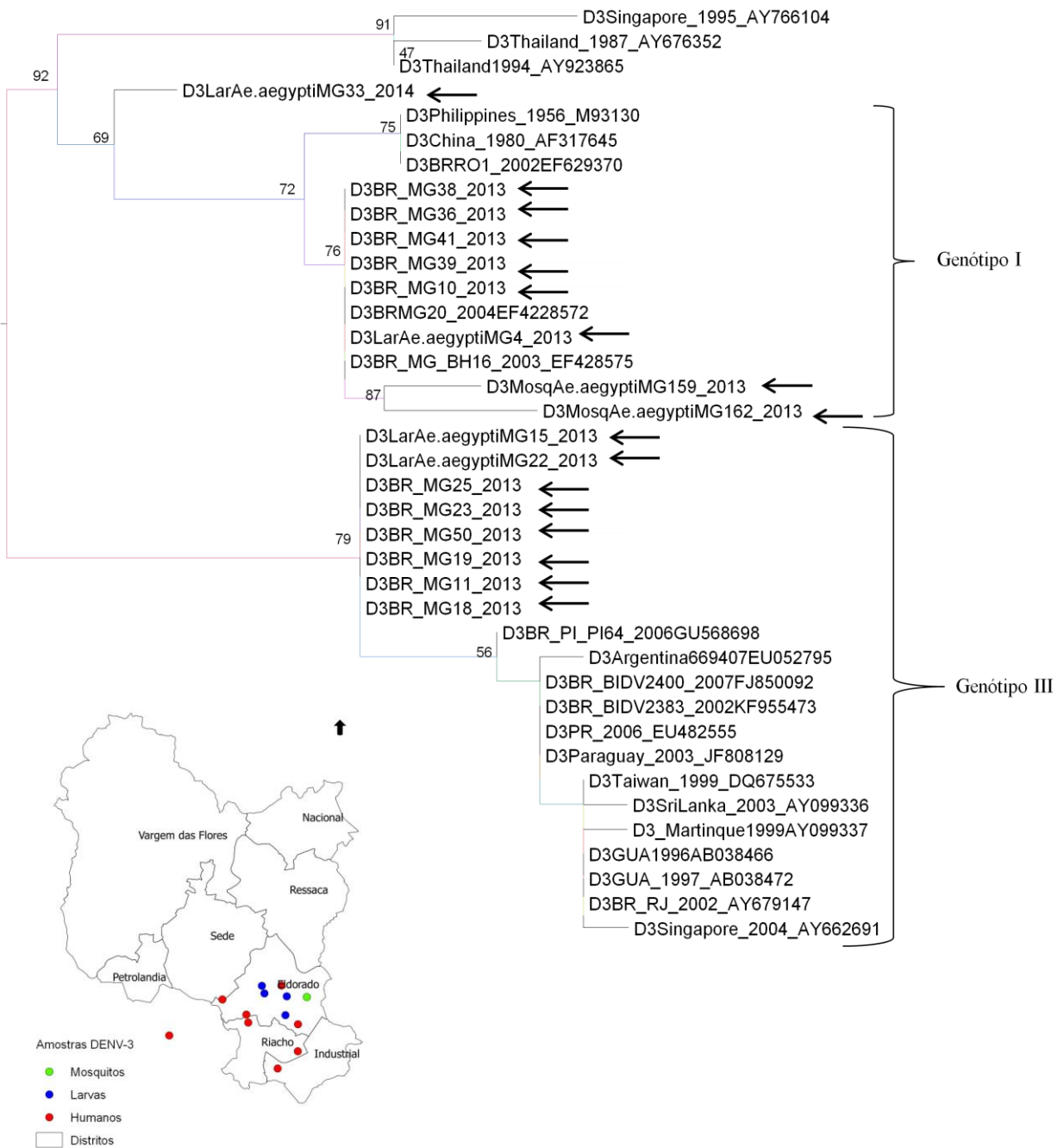


Figura 55- **Árvore filogenética baseada na região C-prM de DENV-3 construída pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa PhyML. Valores de *bootstrap* maiores que 45 são exibidos nos ramos. Números romanos indicam os diferentes genótipos. As amostras de Contagem, MG, estão indicadas por setas.**

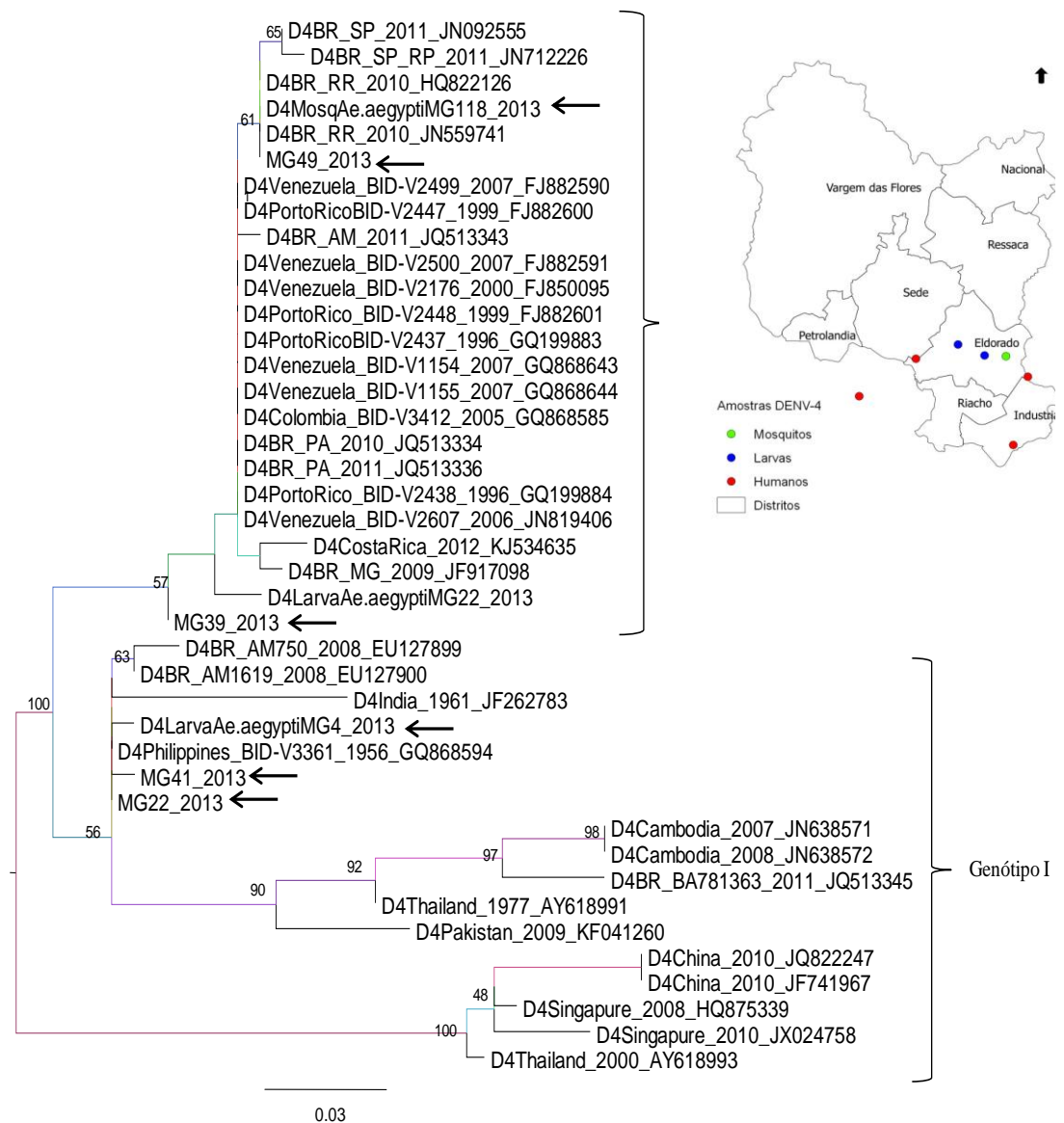


Figura 56- **Árvore filogenética baseada na região C-prM de DENV-4 construída pelo método de Máxima Verossimilhança por meio do programa PhyML.** Valores de *bootstrap* maiores que 47 são exibidos nos ramos. Números romanos indicam os diferentes genótipos. As amostras de humanos de Contagem, MG, estão indicadas por setas.

6- DISCUSSÃO

Todas as amostras clínicas coletadas para esse estudo foram obtidas de pacientes que tiveram como diagnóstico dengue sem sinais de alarme, inclusive pacientes com coinfeção por mais de um sorotipo de DENV e aqueles em que foi detectado DENV-3 genótipo I, associado a sinais neurológicos. Atualmente, o SINAN não contempla as manifestações clínicas de pacientes notificados com dengue, de tal forma que esse dado fica restrito apenas às fichas de notificação de dengue impressas, que devem ser preenchidas pela equipe que atende o paciente suspeito. É importante destacar que as manifestações clínicas constituem informação essencial para o estudo dos DENV e melhor entendimento da doença. Para a realização desse trabalho, foram recuperadas poucas fichas de notificação impressas, que, muitas vezes, encontravam-se incompletas e mal preenchidas. Quatro pacientes cujas amostras foram sequenciadas não constavam nem mesmo no banco que alimenta o SINAN, de forma que os únicos dados referentes aos mesmos eram nome e data de coleta da amostra clínica. Acredita-se que os mesmos não chegaram a ser notificados devido à sobrecarga do sistema de saúde por ocasião do grande número de casos de dengue em Contagem. Essas observações apontam para a necessidade de uma metodologia de notificação de dengue menos morosa para ser implantada na ponta, o que agilizaria o processo e evitaria subnotificações por perdas ou não preenchimento de fichas, principalmente na ocorrência de epidemias.

A taxa de positividade para DENV em plasmas de pacientes com manifestações clínicas foi de 71% (Figura 21). É importante destacar que os casos humanos que chegam ao conhecimento do sistema de saúde, de pacientes sintomáticos, não correspondem ao número das pessoas infectadas por DENV, uma vez que a maioria dessas pessoas é assintomática (Bhatt *et al.*, 2013). Em 2013, o número provável de pessoas infectadas por algum sorotipo de DENV pode ter sido pelo menos cinco vezes maior do que o número de casos notificados de dengue em Contagem (22.881). Foram detectadas coinfeções por dois ou três sorotipos de DENV em alguns pacientes desse estudo (Figura 24 e Tabela 8). A taxa de coinfeções foi de 22,2%. DENV-3 foi o sorotipo predominante encontrado em amostras de humanos.

Em áreas onde ocorre a circulação dos quatro sorotipos de DENV, os casos clínicos causados por mais de um sorotipo podem ser comuns (Loroño-Pino *et al.*, 1999). Coinfeção por mais de um sorotipo de DENV em humanos já foi reportada em alguns países. O primeiro relato de coinfeção por dois sorotipos (DENV-1/DENV-4) foi em 1982, em Porto Rico. Desde então, infecção

envolvendo dois sorotipos tem sido reportada em locais como Nova Caledônia, Taiwan, China, Singapura e Índia. Em 1999, infecção com os três sorotipos (DENV-1/DENV-3/DENV-4) foi detectada em dois pacientes da Indonésia e um do México (Loroño-Pino *et al.*, 1999; Chinnawirotpisan *et al.*, 2008).

O Sudeste Asiático é considerado área de hiperendemicidade, onde a co-circulação de DENV-1-4 e coinfeções são observadas. Vinodkumar e colaboradores (2013) detectaram a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV na Índia por meio de RT-PCR em amostras de pacientes em fase aguda de dengue, dos quais 42,9% apresentavam coinfeção, percentual mais elevado que o encontrado no presente trabalho. Bharaj e colaboradores (2008) também verificaram a co-circulação do quatro sorotipos de DENV na Índia em uma epidemia ocorrida em 2006 por meio de RT-PCR em amostras de pacientes em fase aguda de dengue. O percentual de coinfeções foi de 19%, semelhante ao encontrado nesse trabalho.

No Brasil, casos de coinfeção também já foram descritos. Coinfeções por DENV-1 e DENV-2 em pacientes que residiam no Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná foram detectadas em 1996, 2001 e 2010, respectivamente (Rocco *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2003; Bona *et al.*, 2012). Um caso de coinfeção por DENV-2 e DENV-3 foi confirmado durante uma epidemia de dengue no Ceará, em 2003 (Araújo *et al.*, 2006). Nesse mesmo ano, um caso de coinfeção por DENV-1 e DENV-3 foi descrito em São Paulo (Rocco *et al.*, 2004). Quatro casos de coinfeção por DENV-3 e DENV-4 foram detectados entre 674 pacientes febris do Centro de Referência de Medicina Tropical de Manaus, Amazonas, entre 2005 e 2010 (Figueiredo *et al.*, 2011). Coinfeção por DENV-1 e DENV-4 foi detectada em um paciente de São José do Rio Preto, São Paulo, em 2012 (Colombo *et al.*, 2013).

Nesse trabalho, não foi verificada associação da ocorrência de dengue com o sexo e a idade dos pacientes (Tabela 9). Outro desafio para o sistema de saúde é fazer com que o paciente com suspeita de dengue retorne à unidade de saúde a partir do sexto dia de início dos sintomas para realizar nova coleta de sangue para o exame confirmatório, atualmente baseado na detecção de IgM. Observa-se que grande parte dos pacientes não retorna ao sistema ou o fazem antes do sexto dia de início de sintomas, o que pode acarretar em um resultado falso negativo. Além disso, em uma infecção secundária por DENV, os títulos de IgG aumentam rapidamente e este anticorpo é detectado em altos níveis, mesmo na fase aguda. Nessa situação, os níveis de IgM estão significativamente diminuídos em comparação com os casos de infecção primária e podem não ser detectados por

alguns kits de diagnóstico (WHO, 2009; Guzman *et al.*, 2010). Sugere-se que os pacientes desse estudo, positivos para dengue por RT-PCR, que realizaram coleta de sangue para detecção de IgM a partir do sexto dia de início de sintomas cujos resultados foram negativos já tiveram contato prévio com DENV. Portanto, a detecção de IgM, atualmente considerada critério laboratorial para confirmação de casos pode ocasionar subestimação do número de pacientes que realmente apresentaram dengue, o que aponta para a necessidade de revisão desse critério.

Em relação à distribuição espacial dos casos de dengue em humanos (Figura 27), verifica-se a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV no distrito Eldorado e de pelo menos dois sorotipos nos distritos sanitários Sede, Vargem das Flores e Industrial, em maio de 2013. É possível observar pacientes positivos residentes em outros municípios que exerciam atividade de trabalho em Contagem, o que demonstra a importância de deslocamentos, mesmo de pequenas distâncias, na disseminação dos DENV. Esses pacientes podem ter se infectado por DENV no município de Contagem, onde trabalhavam, no entanto, ao retornarem para o município de residência, representam fontes de infecção para mosquitos do gênero *Aedes*, que podem então disseminar o vírus para outros humanos. Esse fenômeno também pode ocorrer em menor escala, no caso de pacientes que residem em um determinado distrito sanitário de Contagem, mas trabalham em outro. Esses deslocamentos contribuem para a propagação de DENV em diferentes áreas geográficas.

A detecção dos quatro sorotipos de DENV em *pools* de larvas de *A. aegypti* indica, pela primeira vez em Contagem, a ocorrência de transmissão vertical para todos os sorotipos. Esses achados reforçam a importância da transmissão vertical de DENV em mosquitos do gênero *Aedes* como mecanismo de manutenção do vírus na natureza (Martins *et al.*, 2012). A taxa de positividade para DENV em *pools* de larvas de *A. aegypti* foi de 32,1% (Figura 33). DENV-3 foi o sorotipo predominante entre os *pools* coletados. Alguns *pools* de larvas também estavam infectados por dois ou três sorotipos, mas como o processamento foi em *pool* não se pode afirmar que diferentes sorotipos estavam infectando um mesmo indivíduo ou indivíduos diferentes processados juntos (Figura 34).

Com relação à distribuição espacial dos pontos de coleta dos *pools* de larvas no distrito sanitário Eldorado (Figuras 35 e 36), verifica-se que, em três LIRAA's consecutivos, realizados em março e outubro de 2013 e janeiro de 2014, foi possível encontrar *pools* de larvas positivos para DENV, o que evidencia dispersão do mosquito e do vírus em área de intensa urbanização e comprova a adaptação do vetor a esse ambiente. Outro achado interessante foi que a maioria dos depósitos em

que foram encontrados *pools* de larvas positivos para DENV eram considerados móveis, ou seja passíveis de remoção (Tabela 10), o que requer intensificação do trabalho de educação em saúde realizado pelos ACE's e até mesmo reforço e ampla divulgação de campanhas educativas promovidas pelo governo com o intuito de conscientizar a população.

Vilela e colaboradores (2010) detectaram DENV-3 em ovos de *A. aegypti* coletados no período de 2000 a 2004, em Belo Horizonte, resultados que também comprovam a transmissão vertical de DENV. Também em Belo Horizonte, em um trabalho realizado por Pessanha e colaboradores (2011), em que foi feita a pesquisa de DENV em larvas de *A. aegypti* no ano de 2007, 37,4% das amostras analisadas foram positivas, percentual semelhante ao encontrado para a positividade de larvas neste trabalho, e foi detectada a circulação de DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

Nas capturas de mosquitos em pontos selecionados do distrito sanitário Eldorado, realizadas com o auxílio da armadilha BGS, foi observada uma maior proporção de machos, tanto de *A. aegypti* quanto de *Culex* sp. em relação às fêmeas (Tabela 11). Williams e colaboradores (2006), utilizando essa mesma armadilha, realizaram coletas de mosquitos na Austrália e observaram maior número de machos em relação a fêmeas de *A. aegypti* capturados. Ázara (2009) também encontrou resultados semelhantes em algumas áreas em que armadilhas BGS foram instaladas em Manaus, Amazonas. Sabe-se que machos são encontrados ao redor de humanos à procura de fêmeas para cópula (Maciel-de-Freitas *et al.*, 2006) e, de acordo com Gadelha e Toda (1985), eles são indicativo seguro da presença de criadouro próximo. Desta forma, especula-se que a captura de machos pela BGS esteja relacionada à estrutura e composição da armadilha, que simulam um hospedeiro humano (Kröckel *et al* 2006, Maciel-de-Freitas *et al.*, 2006), a proximidade destas a um criadouro ou mesmo algum tipo de feromônio sexual que atraia os machos para o local onde as fêmeas estejam (Ázara, 2009). Dentre os locais em que foram coletados mosquitos *A. aegypti* nesse trabalho, destaca-se uma borracharia localizada no bairro Água Branca, considerada PE e imóvel problema no distrito sanitário Eldorado. Nesse local foram coletados 382 mosquitos *A. aegypti*, dos quais 257 eram machos (Tabela 11).

Os quatro sorotipos de DENV foram detectados, pela primeira vez no município de Contagem, em mosquitos *A. aegypti* coletados no distrito sanitário Eldorado nos meses de fevereiro, março, abril e junho de 2013. A taxa de positividade para DENV em mosquitos foi de 9% (Figura 41) e DENV-3 e DENV-4 foram os sorotipos predominantes (Figura 42). Chen e colaboradores (2010) detectaram todos os sorotipos de DENV em mosquitos *A. aegypti* coletados em campo em Taiwan, de 2004 a

2007. Das e colaboradores (2013) detectaram DENV-2 e DENV-3 em mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* coletados em campo em 2010-2011, na Índia. DENV-1, DENV-3 e DENV-4 foram detectados em mosquitos *A. aegypti* coletados em campo, na Venezuela, de 2000 a 2001 (Urdaneta *et al.*, 2005). Nesses trabalhos, as taxas de positividade para DENV em mosquitos coletados em campo variam de 1 a 5%. No presente trabalho, a taxa de positividade para DENV em mosquitos pode ser reflexo da epidemia.

Das 16 amostras de fêmeas *A. aegypti* positivas para DENV, dez foram coletadas em PE's. Esses achados demonstram a importância dos pontos estratégicos dentro do contexto do combate à dengue. Atualmente, preconiza-se a vistoria desses pontos pelos ACE's a cada 15 dias, sendo que, nessas visitas é realizada pesquisa larvária e tratamento de depósitos não passíveis de remoção com larvicida. Com uma determinada periodicidade, também é realizada borrifação com inseticida de efeito residual, para combate dos mosquitos adultos, o que pode inclusive contribuir para a geração de resistência nos mosquitos às bases utilizadas, além do impacto ambiental que as mesmas causam. Esse trabalho evidencia o papel dos pontos estratégicos como foco de mosquitos do gênero *Aedes* e também de DENV. Por isso, é importante a alocação prioritária de recursos materiais e humanos para esses locais, constante trabalho de educação em saúde direcionado aos responsáveis ou proprietários desses imóveis e atuação da Vigilância Sanitária, quando necessário.

Houve captura de fêmeas de *A. aegypti* positivas para DENV nos meses de fevereiro, março, abril e junho de 2013 (Figura 45). Foi constatada proximidade espacial entre quatro dos nove pontos em que foram detectadas fêmeas positivas para DENV no distrito sanitário Eldorado, localizados no bairro Conjunto Água Branca (Figura 46). Esse bairro foi a segunda região do distrito com o maior número de casos notificados no ano de 2013. No primeiro semestre de 2013, foi necessário delimitar raios compreendendo quarteirões com concentração espacial e temporal de casos de dengue para realização de bloqueios de transmissão, empregando inseticidas direcionados ao combate da forma adulta do vetor como medida de controle da epidemia. Na borracharia considerada ponto estratégico e imóvel problema, situada nesse bairro, foram detectados os quatro sorotipos de DENV em oito amostras de mosquitos fêmea analisadas. Pode-se também verificar proximidade espacial e temporal considerando a data da coleta (mesma SE), entre dois pontos em que foram detectadas fêmeas positivas para DENV no bairro Conjunto Jardim Eldorado (Figura 45). Esse bairro foi o que apresentou o maior número de notificações de casos de dengue do distrito sanitário Eldorado em 2013. Esses dados sugerem que DENV circula na população de mosquitos principalmente nos períodos em que existem humanos infectados, conforme o modelo proposto para

o ciclo urbano, o que também foi observado em outros trabalhos (Das *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2012).

Outra informação importante obtida nesse trabalho foi a identificação de outra espécie, além de *H. sapiens*, na qual fêmeas de *A. aegypti* podem realizar o repasto sanguíneo: *Canis lupus familiaris*, o cão doméstico. O homem não é o único mamífero escolhido pelos mosquitos para repasto sanguíneo. Pequenos marsupiais e roedores já foram identificados como possíveis alvos para esse repasto (Thoisy *et al.*, 2009). Apesar de a fêmea de *A. aegypti* que realizou repasto sanguíneo em um cão doméstico não estar infectada por DENV, outra fêmea coletada no mesmo imóvel foi detectada com DENV-4. Esses resultados sugerem que as fêmeas de *A. aegypti* podem não estar restritas à alimentação com sangue humano mesmo em ambientes urbanos. Apesar de, nesse trabalho, nenhuma das cinco fêmeas ingurgitadas estarem positivas para DENV, esses achados remetem à possibilidade de hospedeiros não humanos desempenharem um papel na dinâmica de transmissão de DENV no ciclo urbano. Vilela (2013) identificou outras espécies de mamíferos em que fêmeas de *A. aegypti* se alimentaram, como *Mus musculus*, o camundongo doméstico, e *Bos taurus*, bovinos, na cidade de Caratinga, Minas Gerais.

Os quatro sorotipos de DENV foram detectados em amostras de pacientes com manifestações clínicas de dengue, com início de sintomas no mês de maio de 2013, *pools* de larvas coletados durante dois LIRAA's de 2013 e um de 2014 e mosquitos *A. aegypti* coletados nos meses de fevereiro, março, abril e junho de 2013 (Figura 49). Esse estudo demonstrou a co-circulação de DENV1-4 em humanos, larvas e mosquitos no distrito sanitário Eldorado, sendo que DENV-3 foi o sorotipo predominante (Figura 50). Interessante notar também que os quatro sorotipos de DENV foram detectados na borracharia problema do bairro Água Branca, o que evidencia a possibilidade da presença simultânea desses vírus em um microambiente que oferece condições favoráveis à manutenção do ciclo de transmissão, como elevado número de possíveis criadouros e abrigos, além de hospedeiros humanos para repasto sanguíneo (funcionários do estabelecimento).

Com base em análises filogenéticas e considerando humanos, larvas e mosquitos de Contagem, as amostras de DENV-1 ficaram agrupadas com vírus pertencentes ao genótipo V (Figura 53), em três linhagens distintas. As amostras positivas para DENV-2 ficaram agrupadas com vírus pertencentes ao genótipo Americano-asiático (Figura 54). As amostras positivas para DENV-3 ficaram agrupadas com vírus pertencentes ao genótipo I e III (Figura 55) e as de DENV-4 com vírus pertencentes ao genótipo I e II (Figura 56).

Cabe destacar aqui circulação do genótipo I de DENV-3, detectado em amostras de humanos, larvas e mosquitos em Contagem. Figueiredo e colaboradores, 2008, detectaram a circulação de DENV-3 genótipo I em uma amostra de soro de um paciente de Contagem que apresentou dengue com complicações e veio a óbito, em 2004. Vilela e colaboradores (2010) detectaram DENV-3 genótipo I em mosquitos coletados em campo, em 2005 e 2006, em um distrito sanitário de Belo Horizonte que é fronteira com Contagem. Esse trabalho demonstra que DENV-3 genótipo I permanece circulando em Contagem e pode ter sido o principal responsável pela epidemia ocorrida em 2013 nesse município, tendo em vista seu potencial de causar doença grave (Souza *et al.*, 2013).

A co-circulação de DENV distintos geneticamente, detectados em Contagem em 2013 e 2014 e a ocorrência de coinfeções podem gerar eventos de recombinação e levar a emergência de isolados mais virulentos (Vinodkumar *et al.*, 2013). Coinfeções por diferentes amostras de DENV em humanos e mosquitos favorecem a ocorrência de recombinação, considerada importante mecanismo gerador de diversidade em DENV. Portanto, o intercâmbio genético entre amostras de DENV bem como a ocorrência de mutações, são importantes fatores envolvidos na variação genética (Santos *et al.*, 2003). Outra forma de aumentar a variabilidade genética é a possibilidade de entrada de novos vírus por migração. Existem inúmeras evidências de que DENV seja transportado por grandes distâncias por hospedeiros e vetores. Com isso, sorotipos e genótipos podem ter ampla distribuição geográfica (Figueiredo, 2006).

A presença de um sorotipo contra o qual a população não está imunizada é condição que contribui para o aumento acentuado no número de infecções por DENV, incluindo casos graves (Nunes *et al.*, 2012). DENV-3 genótipo I, detectado em cinco pacientes desse estudo, apresenta potencial para causar doença grave com sinais neurológicos (Souza *et al.*, 2013), no entanto esses pacientes foram selecionados baseados em sintomas clássicos de dengue. As altas taxas de ataque verificadas durante epidemias também representam oportunidades para mosquitos se tornarem infectados com dois ou mais sorotipos (Loroño-Pino *et al.*, 1999).

A vigilância epidemiológica contínua e o sequenciamento de amostras virais circulantes em determinada região são importantes para a detecção precoce de linhagens de DENV emergentes, para melhor compreensão dos padrões de disseminação virais entre regiões e para nortear ações do programa de controle da dengue no Brasil (Araújo *et al.*, 2012). Portanto, a associação da vigilância virológica à vigilância entomológica é de suma importância, para controle mais efetivo, baseado também na detecção da diversidade do vírus.

Esse é o primeiro relato que demonstra a presença dos quatro sorotipos de DENV, três diferentes linhagens dentro do genótipo V de DENV-1 e mais dois genótipos de DENV-3 e DENV-4, o que totaliza oito vírus diferentes, além da ocorrência de coinfeções por dois ou três sorotipos no período de fevereiro de 2013 a janeiro de 2014, em Contagem. Nesse período, o município pode ser considerado área de hiperendemicidade. No contexto do combate à dengue, esse cenário representa um desafio para o controle da doença e para a confecção de uma vacina tetravalente.

7- CONCLUSÕES

- A co-circulação de DENV-1-4 foi detectada em amostras clínicas de humanos, *pools* de larvas e mosquitos do mês de fevereiro de 2013 a janeiro de 2014, no município de Contagem, Minas Gerais;
- As taxas de positividade para DENV em plasma de pacientes com manifestações clínicas, larvas e mosquitos foram: 71%, 32,1% e 9%, respectivamente.
- A taxa de coinfeções com dois e três sorotipos de DENV em humanos desse estudo foi de 22,2%;
- DENV-3 foi o sorotipo predominante detectado durante o período analisado, em Contagem, Minas Gerais;
- Foi detectada a circulação de amostras de DENV-1 pertencentes a três linhagens distintas do genótipo V;
- Foi detectada a circulação de dois genótipos de DENV-3 e de DENV-4;
- Os pacientes que apresentaram quadros de coinfeção e/ou foram detectados com DENV-3 genótipo I apresentaram dengue sem sinais de alarme;
- As residências de pacientes positivos para DENV estavam mais concentrados nos distritos sanitários mais populosos e urbanizados de Contagem;
- As manifestações clínicas de pacientes com suspeita de dengue atualmente não são contempladas pelo SINAN. Sugere-se a inclusão desse dado no SINAN, por ser informação de relevância para estudo dos DENV e melhor entendimento da doença.
- A maioria dos depósitos em que foram coletados *pools* de larva positivos para DENV é passível de remoção.
- 63% dos imóveis em que foram coletadas fêmeas de *A. aegypti* positivas para DENV eram pontos estratégicos.
- Foi observada uma concentração espacial dos pontos em que foram coletadas fêmeas de *A. aegypti* positivas para DENV na região do Conjunto Água Branca e Conjunto Jardim Eldorado, no distrito sanitário Eldorado.
- Quatro fêmeas de *A. aegypti* estavam ingurgitadas com sangue de *Homo sapiens* e uma com sangue de *Canis lupus familiaris*.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, D. E.; EZCURRA, A. L. L.; FUCITO, S.; GAMARNIK, A. V. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis and viral replication. *Virology*, v.339, p.200-212, 2005.

ARAÚJO, F. M. C.; NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; RAMALHO, I. L. C.; RORIZ, M. L. F. S.; MELO, M. E. L. de.; COELHO, I. C. B. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.925-928, 2006.

ARAÚJO, J. M. G.; BELLO, G.; ROMERO, H.; NOGUEIRA, R. M. R. Origin and Evolution of Dengue Virus Type 3 in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.6, p.1-10, 2012.

ARAÚJO, J. M. G.; BELLO, G.; SCHATZMAYR, H. G.; SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R. Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, p.526-29, 2009.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, v.215, p.403-10, 1990.

AVIRUTNAN, P.; ZHANG, L.; PUNYADEE, N.; MANUYAKORN, A.; PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; MALASIT, P., et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS pathogens*, v.3, p.1798-1811, 2007.

AYRES, C. F. J.; MELO-SANTOS, M. A. V.; SOLÉ-CAVA, A. M. FURTADO, A. F. Genetic Differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the Major Dengue Vector in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.

ÁZARA, T. M. F. *Captura de culicídeos com ênfase em Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) e Aedes albopictus (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) em área urbana de Manaus (AM)*. 2009. 102f.

Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais/ Belo Horizonte.

BARATA, E. A. M. F.; COSTA, A. I. P.; NETO, F. C. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Revista de saúde Pública*, v. 35, 237-42, 2001.

BARBOSA, M. G. V.; FÉ, N. F.; MARCIÃO, A. H. R.; SILVA, A. P. T.; MONTEIRO, W. N.; GUERRA, M. V. F.; GUERRA, J. A. O. Registro de Culicidae de importância epidemiológica na área rural de Manaus, Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, p.658-663, 2008.

BARBOSA, O. C.; TEODORO, U.; LOZOVEI, A. L.; SALVIA FILHO, V. F.; SPINOSA, R. P.; LIMA, E. M.; FERREIRA, M. E. M. C. Nota sobre culicídeos adultos coletados na região sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 27, p.214-216, 1993.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados*, v.22, p.53-72, 2008.

BASTOS, M. S.; FIGUEIREDO, R. M. P.; RAMASAWMY, R.; ITAPIREMA, E.; GIMAQUE, J. B. L.; SANTOS, L. O. et al. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45, p.393-4, 2012.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, p. 115-37, 2000.

BENNET, S. N.; HOLMES, E. C.; CHIRIVELLA, M.; RODRIGUEZ, D.M.; BELTRAN, M.; VORNDAM V.; GUBLER, D. J.; MCMILLAN, W. O. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Molecular Biology and Evolution*, v.20, p.1650-58, 2003.

BHARAJ, P.; CHAHAR, H. S.; PANDEY, A.; DIDDI, K.; DAR, L.; GULERIA, R.; KABRA, S. K.; BROOR, S. Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. *Virology Journal*, v.5, p.1-5, 2008.

BHATT, S.; GETHING, P. W., BRADY, O. J., MESSINA, J. P., FARLOW, A. W., MOYES, C. L., DRAKE, J. M. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v.496, p.504-7, 2013.

BIOGENTS. Manual for the BG-Sentinel®: An innovative trapping system for mosquitoes & other blood-sucking insects. Biogents GmbH, 13 p, 2006. Disponível em: <http://www.biogents.com>. Acesso em 16/01/2014.

BONA, A. C. D.; TWERDOCHLIB, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45, p.297-300, 2012.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, p.113-18, 2007.

CAMPOS, R. M.; VEIGA, C. S. B.; MENESES, M. D. F.; SOUZA, L. M.; MALIRAT, V.; ALBUQUERQUE, J. P.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; FERREIRA, D. F. Emergence of Dengue virus 4 genotypes II b and I in the city of Rio de Janeiro. *Journal of Clinical Virology*, v.56, p.86-88, 2013.

CAO-LORMEAU, V. M. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology Journal*, v.6, n.35, p.1-4, 2009.

CECÍLIO, A. B.; CAMPANELLI, E. S.; SOUZA, K. P. R.; FIGUEIREDO, L. B.; RESENDE, M. C. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v.69, p. 123-27, 2009.

CHATURVEDI, U.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS immunology and medical microbiology*, v.47, p.155–166, 2006.

CHEN, C.-F.; SHU, P.-Y.; TENG, H.-J.; SU, C.-L.; WU, J.-W.; WANG, J.-H.; LIN, T.-H. Screening of dengue virus in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by one-step SYBR green-based reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay during 2004-2007 in Southern Taiwan. *Vector borne and zoonotic diseases* Larchmont, v.10, p. 1017–25, 2006.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue — Quo tu et quo vadis?. *Viroses*, v.3, p.1562–1608, 2011.

CHINNAWIROTPISAN, P.; MAMMEN JR, M. P.; NISALAK, A.; THAISOMBOONSUK, B.; NARUPITI, S.; THIRAWUTH, V.; PUTNAK, R.; ZHANG, C. Detection of concurrent infection with multiple dengue virus serotypes in Thai children by ELISA and nested RT-PCR assay. *Archives of Virology*, v.153, p.2225–2232, 2008.

CLARK, K. B.; HSIAO, H. M.; NOISAKRAN, S. Role of Microparticles in *Dengue virus* Infection and its Impact on Medical Intervention Strategies. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v.85, p.3-18, 2012.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in Deciphering Viral and Host Determinants of *Dengue virus* Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

COLOMBO, T. E.; VEDOVELLO, D.; MONDINI, A.; REIS, A. F. N.; CURY, A. A. F.; OLIVEIRA, F.H.; CRUZ, L. E. A. A.; BRONZONI, R.V.M.; NOGUEIRA, M. L. Co-infection of dengue virus by serotypes 1 and 4 in patient from medium sized city from Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55, p.275-81, 2013.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, Rio de Janeiro: Fiocruz, 228p, 1994.

COOK, S.; MOUREAU, G.; KITCHEN, A.; GOULD, E. A.; DE LAMBALLERIE, X.; HOLMES, E. C.; HARBACH, R. E. Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *The Journal of general virology*, v.93, p.223–34. 2012.

CRUZ-OLIVEIRA, C.; FREIRE, J. M.; CONCEIÇÃO, T. M.; HIGA, L. M.; CASTANHO, M. A. R. B.; DA POIAN, A. T. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, v.39, p.155-170, 2015.

DAS, B., DAS, M.; DWIBEDI, B.; KAR, S. K.; HAZRA, R. K. Molecular investigations of dengue virus during outbreaks in Orissa state, Eastern India from 2010 to 2011. *Infection, Genetics and Evolution*, v.16, p.401–410, 2013.

DEFOLIART, G. R. Advances In Mosquito-Borne Arbovirus/Vector Research. *Annual Review of Entomology*, v.32, p.479-505, 1987.

DOMINGO, C.; PATEL, P.; LINKE, S.; ACHAZI, K.; NIEDRIG, M. Molecular Diagnosis of Flaviviruses. *Future Virology*, v.6, p.1059-74, 2011.

DRUMOND, P. B.; MONDINI, A.; SCHMIDT, D. J.; BOSCH, I.; NOGUEIRA, M. L. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Archives of Virology*, v.157, p.2061–73, 2012.

DRUMOND, P. B.; MONDINI, A.; SCHMIDT, D. J.; BRONZONI, R. V. M.; BOSCH, I.; NOGUEIRA, M. L. Circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2, Genotype American/Asian in Brazil: Dynamics and Molecular and Phylogenetic Characterization. *Plos One*, v.8, p.1-10, 2013.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v.32, p.1792–97, 2004.

EVANGELISTA, K. S. *Estudo da transmissão vertical de Dengue virus em mosquitos do gênero Aedes no município de Belo Horizonte*. 2003. 69f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais/ Belo Horizonte.

FERREIRA, B. J.; SOUZA, M. F. M.; FILHO, A. M. S.; CARVALHO, A. A. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, v.14, p.961-72, 2009.

FIGUEIREDO, L. B. *Isolamento, identificação e caracterização de amostras isoladas de Dengue virus 3 circulantes em Minas gerais no período de 2002 a 2004*. 2006. 173f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais/ Belo Horizonte.

FIGUEIREDO, L. B.; CECÍLIO, A. B.; FERREIRA, G. P.; DRUMOND, B. P.; OLIVEIRA, J. G.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Dengue virus 3 Genotype 1 Associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, p.314-16, 2008.

FIGUEIREDO, L. B.; SAKAMOTO, T.; COELHO, L. F. L.; ROCHA, O. E. S.; COTA, M. M. G.; FERREIRA, G. P.; OLIVEIRA, J. G.; KROON, E. G. Dengue Virus 2 American-Asian Genotype Identified during the 2006/2007 Outbreak in Piauí, Brazil Reveals a Caribbean Route of Introduction and Dissemination of Dengue Virus in Brasil. *Plos One*, v.9, p.1-11, 2014.

FIGUEIREDO, M. L. G.; ALFONSO, H. L.; AMARILLA, A. A.; FIGUEIREDO, L. T. M.; AQUINO, V. H.; COSTA, C. A.; LUZ, S. L. B. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil. *Virology Journal*, v.10, p.1-4, 2013.

FIGUEIREDO, M. L. G. *Identificação de flavivírus infectando culicídeos de 1990 a 2007 no Brasil*. 2010. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo/São Paulo.

FIGUEIREDO, R. M. P.; NAVECA, F. G.; BASTOS, M. S.; MELO, M. N.; VIANA, S. S.; MOURÃO, M. P. G.; COSTA, C. A.; FARIAS, I. P. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, n.4, p.667-669, 2008.

FIGUEIREDO, R. M. P.; NAVECA, F. G.; OLIVEIRA, C. M.; BASTOS, M. S.; MOURÃO, M. P. G.; VIANA, S. S.; MELO, M. N.; ITAPIREMA, E. F.; SAATKAMP, C. J.; FARIAS, I. P. Co-infection of dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v.53, p.321-323, 2011.

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.20, p.244-245, 1986.

FORRATINI, O. P. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*, São Paulo: EDUSP, 549p., 2002.

FREITAS, R. M.; RODRIGUES, C. S.; ALMEIDA, M. C. M. Estratégia Intersetorial para o Controle da Dengue em Belo Horizonte (Minas Gerais), Brasil. *Saúde e Sociedade São Paulo*, v.20, p.773-85, 2011.

FUCHS, A.; LIN, T.-Y.; BEASLEY, D. W.; STOVER, C. M.; SCHWAEBLE, W. J.; PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Direct complement restriction of flavivirus infection requires glycan recognition by mannose-binding lectin. *Cell host & microbe*, v.8, p.186–195, 2010.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Dengue – Instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde. 84p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>. 2001.

GADELHA, D.J.; TODA, A.T. Biologia e Comportamento do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 37, p. 29-36, 1985.

GEIER, M.; BOSCH, O. J.; BOECKH, J. Ammonia as an attractant of host odour for the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Chemical Senses*, v. 24, p. 647- 653, 1999.

GONÇALVEZ, A. P.; ESCALANTE, A. A.; PUJOL, F. H.; LUDERT, J. E.; TOVAR, D.; SALAS, R. A.; LIPRANDI, F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*, v.303, p.110–19, 2002.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flavivirus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Virology*. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.1155-1252, 2007.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M., HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. v.59, p.307–321, 2010.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C; YOKSAN, S; PEELING, R. W. Dengue: a continuing world threat. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, s.12, p. S7-S16, 2010.

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

HALSEY, E. S.; MARKS, M. A.; GOTUZZO, E.; FIESTAS, V.; SUAREZ, L.; et al. Correlation of Serotype-Specific Dengue Virus Infection with Clinical Manifestations. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v.6, p.1-10, 2012.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in Virus Research*, v.60, p.421–67, 2003.

HIDARI, K. I. P. J.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. *Tropical medicine and health*, v. 39, n. 4, p.37-43, 2011.

INTERNACIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Disponível em <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>>. Acesso em 28/05/2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em 11/05/2014.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FIOCRUZ, 2009. Disponível em <<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=fiocruz-traca-mapa-migracao-mundial-dengue-tipo-3>>. Acesso em 21/05/2014.

- JIANG T.; YU X-D.; HONG, W-X.; ZHOU, W-Z.; YU, M.; DENG, Y-Q., et al. Co-circulation of two genotypes of dengue virus serotype 3 in Guangzhou, China, 2009. *Virology Journal*, v.9, p.1-8, 2012.
- JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, p. 158-61, 2002.
- KAO, C.-L.; KING, C.-C.; CHAO, D.-Y.; WU, H.-L.; CHANG, G.-J. J. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *Journal of Microbiology, immunology and infection*, v.38, p.5-16, 2005.
- KITANO, T.; UMETSU, K.; TIAN, W.; OSAWA, M. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *International journal of legal medicine*, v.121, p.423–27, 2007.
- KRÖECKEL, U., ROSE, A., EIRAS, A.E., GEIER, M. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: Comparison of trap catches with human landing rates in a urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v.22, p.229-38, 2006.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v.5, p. 150-63, 2004.
- KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n.4, p. 608-637, 2005.
- KUROSU, T.; CHAICHANA, P.; YAMATE, M.; ANANTAPREECHA, S.; IKUTA, K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochemical and biophysical research communications*, v.362, p.1051–1056, 2007.
- KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. *Annual review of microbiology*, v. 62, p. 71-92, 2008.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n.5, p.1-9, 2010.

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*, v.30, p.545-51, 1992.

LANCIOTTI, R. S.; LEWIS, J. G.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *Journal of General Virology*, v.75, p.65-75, 1994.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *The Journal of general virology*, v.78, p.2279-84, 1997.

LEYSEN, P.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clinical microbiology reviews*, v.13, p.67-82, 2000.

LINDENBACH, B.D; THIEL, H.J; RICE, C.M. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p 1101- 1152

LOPES, J.; SILVA, M. A. N.; BORSATO, A. M.; OLIVEIRA, V. D. R. B.; OLIVEIRA, F. J. A. *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. e a culicídeofauna associada em área urbana da região sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.27, p.326-33, 1993.

LOROÑO-PINO, M. A.; CROPP, C. B.; FARFÁN, J. A.; VORNDAM, A. V.; RODRÍGUEZ-ÂNGULO, E. M.; ROSADO-PAREDES, E. P. et al.; Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *American Journal of Tropical Medical Hygiene*, v.61, p.725-30, 1999.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; EIRAS, A. E.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, p.321-25, 2006.

MAIRUHU, A. T; WAGENAAR, J.; BRANDJES, D. P. M.; GORP, E. C. M. Dengue: an

arthropod-borne disease of global importance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v. 23, p. 425-33, 2004.

MARTINS, V. E. P.; ALENCAR, C. H.; KAMIMURA, M. T.; DE CARVALHO ARAÚJO, F. M.; DE SIMONE, S. G.; DUTRA, R. F.; GUEDES, M. I. F. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS ONE*, v.7, p.1-9, 2012.

MELINO, S.; PACI, M. Progress for *Dengue virus* diseases. Towards the NS2B–NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, v. 274, p. 2986-3002, 2007.

MELLOR, P. S. Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of Comparative Pathology*, v.123, p.231-247, 2000.

MELO, D. P. O. *Análise espacial e temporal da distribuição de casos de dengue e do monitoramento de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) em duas regiões de Belo Horizonte (MG): influências das variáveis climáticas e das intervenções para controle do vetor*. 2009. 208f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais/ Belo Horizonte.

MERCADO-CURIEL, R. F.; ESQUINCA-AVILÉZ, H. A.; TOVAR, R.; DÍAZ-BADILLO, A.; CAMACHO-NUEZ, M.; MUÑOZ, M. L. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *A. albopictus* cells. *BioMed Central Microbiology*, v.6, p.1-10, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Brasília: Ministério da Saúde, 2009, 157p.

MONCAYO, A. C.; FERNANDEZ, Z.; ORTIZ, D. DIALLO, M.; SALL, A.; HARTMAN, S.; DAVIS, C. T.; COFFEY, L.; MATHIOT, C. C.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Dengue Emergence and Adaptation to Peridomestic Mosquitoes. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n.10, p. 1790-1796, 2004.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 1, p.13-22, 2005.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annual Review of Immunology*, v.29, p.587-619, 2011.

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature reviews Microbiology*, v.6, p.699–708, 2008.

NISALAK, A.; ENDY, T. P.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANAROOJ, S., THISAYAKORN, U., SCOTT, R. M.; BURKE, D. S.; HOKE, C. H.; INNIS, B. L.; VAUGHN, D. W. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v.68, p.191–202, 2003.

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, H. B.; MEDEIROS, D. B. A.; LIMA, C. P. S.; CARVALHO, V. L. et al. Phylogeography of Dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. *Emerging Infectious Disease*, v.18, p.1858-1864, 2012.

OISHI, K.; SAITO, M.; MAPUA, C. A.; NATIVIDAD, F. F. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *Journal of Infectious Chemother*, v. 13, p. 125-33, 2007.

OLIVEIRA, J. C.; LIMA, S. C. Mobilização comunitária e vigilância em saúde no controle dos *Aedes* e prevenção do dengue no distrito de Martinésia, Uberlândia (MG). *Boletim Campineiro de Geografia*, v. 2, p. 121-36, 2012.

PESARO, A. E.; D'AMICO, E.; ARANHA, L. F. C. Dengue: Manifestações Cardíacas e Implicações na Terapêutica Antitrombótica. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v.89, p. 12-15, 2007.

PESSANHA, J. E. M.; CAIAFFA, W. T.; CECÍLIO, A. B.; IANI, F. C. M.; ARAUJO, S. C.; NASCIMENTO, J. C.; KROON, E. G.; PROIETTI, F. A.; ARIAS, J. R. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, p.103-105, 2011.

PESSOA, M. V. E.; SILVEIRA, D. A.; CAVALCANTE, I. L.; FLORINDO, M. I. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. *Entomotropica*, v.28, p.75-86, 2013.

POERSCH, C. O.; PAVONI, D. P.; QUEIROZ, M. H.; BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; SANTOS, C. N. D.; KRIEGER, M. A. *Dengue virus* infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *Journal of Clinical Virology*, v.32, p. 272-77, 2005.

POSADA, D. jMODELTEST: phylogenetic model averaging Disponível em: <<https://code.google.com/p/jmodeltest2/>>. Acesso em 02 de janeiro de 2014.

RAMBAUT, A. Tree Figure Drawing Tool Version 1.3.1 2007. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em 28 de março de 2014.

REY, F. A. Two hosts, two structures. *Nature*, v.497, p.443-444, 2013.

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

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Advances in Virus Research*, v.59, p. 315-41, 2003.

ROCCO, I. M.; BARBOSA, M. L.; KANOMATA, E. H. N. Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a brazilian patient. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 40, n. 3, p.151-154, 1998.

ROCCO, I. M.; OSHIRO, F. M.; SANTOS, C. L. S. Infecção simultânea por Dengue 1 e 3 em Itapevi, SP, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.63, n.1, p. 97-99, 2004.

RODRIGUEZ-ROCHE, R.; GOULD, E. A. Understanding the Dengue Viruses and Progress towards their control. *BioMed Research International*, v.2013, p.1-20, 2013.

ROSENTHAL, A.; COUTLLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing template by microlitre format PCR. *Nucleic Acid Research*, v.21, p.173-74, 1993.

SANCHEZ, C. C. Dengue en el Perú: aportes para su diagnóstico y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, v.22, n.3, p. 212-228, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S. COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the Nacional Academic of Science of the United States of America*, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

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*, v. 45, p. 11-6, 2003.

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO E CULTURA DE CONTAGEM. Atlas Escolar Histórico, Geográfico e Cultural. Contagem, 80p. 2009.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE. Combate a dengue 2013. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=34838&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0>. Acesso em 02 de agosto de 2014.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE. Combate a dengue 2011. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=19502&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0>. Acesso em 02 de agosto de 2014.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Balanço Dengue, Semana Epidemiológica 1-53 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at---SE-53.pdf>>. Acesso em 31 de janeiro de 2015.

SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Linha Guia de Atenção à Saúde. Dengue. Belo Horizonte: Secretaria do Estado de Saúde, 2009, 104 p.

SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Informe epidemiológico da dengue 30/01/2015. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/story/6771-informe-epidemiologico-da-dengue-30-01-2015>>. Acesso em 07 de fevereiro de 2015.

SEKARAN S.D.; RATHAKRISHNAN, A.; YEO, A S L. Dengue: an overview. *Journal of the University of Malaya Medical Centre*, v.17, p.23-32, 2014.

SILVA, J.R. *Pesquisa de infecções por Flavivírus da encefalite de Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral*. 2010. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SIPS, G. J.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Neuroinvasive flavivirus infections. *Reviews in Medical Virology*, v.22, p.69-87, 2012.

SMIT, D. R. An update on mosquito cell expressed dengue virus receptor proteins. *Insect Molecular Biology*, v.21, p.1-7, 2012.

SMIT, J. M.; MOESKER, B.; RODENHUIS-ZYBERT, I.; WILSCHUT, J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*, v.3, p. 160-171, 2011.

SOMNUKE, P.; HAUHART, R. E.; ATKINSON, J. P.; DIAMOND, M. S.; AVIRUTNAN, P. N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. *Virology*, v.413, p.253-264. 1990.

SOUZA, K. P. R.; SILVA, E. G.; ROCHA, E. S. O.; FIGUEIREDO, L. B.; ALMEIDA-LEITE, C. M.; ARANTES, R. M. E. et al. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement. *Virology Journal*, v.10, p1-10, 2013.

SOUZA, R. P.; ROCCO, I. M.; MAEDA, A. Y.; SPENASSATTO, C.; BISORDI, I.; SUZUKI, A. et al. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v.5, p.1-7, 2011.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology*, v.87, p. 2755–66, 2006.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*, v.8, p.5-33. 1999.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; BARRETO, M. L. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences. *Cadernos de Saúde Pública*, v.21, p.1307-15, 2005.

TEMPORÃO, J. G.; PENNA, G. O.; CARMO, E. H.; COELHO, G. E.; AZEVEDO, R. S. S.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerging Infectious Disease*, v.17, p.938-40, 2011.

THOISY, B.; LACOSTE, V.; GERMAIN, A.; MUÑOZ-JORDAN, V.; COLON, C.; MAUFFREY, J. F. et al. Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 9, p. 157-169, 2009.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p.4673-4680, 1994.

TISSOT, A. C.; SILVA, M. A. N. Lista das espécies de Culicidae (Diptera) depositadas na Coleção de Entomologia Pe. J. S. Moure. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 52, p.263-68, 2008.

URDANETA, L.; HERRERA, F.; PERNALETE, M.; ZOGHBI, N.; RUBIO-PALIS, Y.; BARRIOS, R.; RIVERO, J.; et al. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infection, Genetics and Evolution*, v.5, p.177-184, 2005.

VILELA, A. P. P. *Circulação espaço-temporal de Dengue virus em mosquitos e humanos: situação de Caratinga, MG, Brasil, 2010-2011*. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

VILELA, A. P. P.; FIGUEIREDO, L. B.; SANTOS, J. R.; EIRAS, A. E.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. *Dengue virus 3 genotype I in Aedes aegypti Mosquitoes and Eggs, Brazil, 2005–2006. Emerging Infectious Diseases*, v. 16, p. 989-92, 2010.

VINODKUMAR, C.S.; KALAPANNAVAR, N. K.; BASAVARAJAPPA, K. G.; SANJAY, D.; GOWLI, C.; NADIG, N. G. et al.; Episode of coexisting infections with multiple dengue virus serotypes in central Karnataka, India. *Journal of Infectious Public Health*, v.6, p.302-6, 2013.

WEAVER, S. C.; BARRET, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, p.789-801, 2004.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p.523-540, 2009.

WELSCH, S.; MILLER, S.; ROMERO-BREY, I.; MERZ, A.; BLECK, C. K. E.; WALTHER, P.; FULLER, S. D.; ANTONY, C.; KRIJNSE-LOCKER, J.; BARTENSCHLAGER, R. Composition and three-dimensional architecture of the *Dengue virus* replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe*, v.5, p.365-375, 2009.

WESTAWAY, E. G.; BRINTON, M. A.; GAIDAMOVICH, S. Ya.; HORZINEK, M. C.; IGARASHI, A.; KÄÄRIÄINEN, L.; LVOV, D. K.; PORTERFIELD, J. S.; RUSSEL, P. K.; TRENT, D. W. Flaviviridae. *Intervirology*, v.24, p.183-192, 1985.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature reviews Microbiology*, v. 5, p.518-28, 2007.

WHITEHORN, J.; FARRAR, J. Dengue. *British Medical Bulletin*, v.95, p.161–73, 2010.

WILLIAMS, C. G.; LONG, S. A.; RUSSEL, R. C.; RITCHIE, S. A. Field efficacy of the BG-Sentinel compared with CDC backpack aspirators and CO₂-baited EVS traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v.22, p.296-300, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Edição 2009. World Health Organization; 2009. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf > Acesso em: 18 de junho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2013. Disponível em: < http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png . > Acesso em: 17 de junho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2014. Dengue and severe dengue. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 18 de junho de 2014.

WOODRING, J. L.; HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. *Biology of disease vectors*. p.51-76, 1996.

9- ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Dengue virus CIRCULANTE NO MUNICÍPIO DE CONTAGEM, MINAS GERAIS

Pesquisador: Erna Geessien Kroon

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 09273012.9.0000.5149

Instituição Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais ((UFMG))

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 206.890

Data da Relatoria: 28/02/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental a ser desenvolvido no Município de Contagem-MG e no Laboratório de Virologia do ICB-UFMG. O projeto é dividido em duas fases. A primeira envolve a instalação de 400 armadilhas para a captura dos mosquitos, em imóveis onde há grande concentração de depósitos preferenciais para a desova do *Aedes aegypti*, denominados Pontos Estratégicos, e imóveis de pessoas notificadas como caso suspeito de dengue em distritos sanitários no município de Contagem. O tempo de permanência das armadilhas nos imóveis será de 24 horas. Serão realizadas coletas de mosquitos durante o intervalo de um ano. Após cada coleta, esses exemplares serão encaminhados para o Laboratório de Virologia do ICB/ UFMG, onde será realizada triagem para identificação de espécimes de *Aedes spp.*, e processamento dos mesmos. A segunda etapa envolve a obtenção de amostras clínicas de 600 participantes. Serão utilizadas amostras de soro ou sangue total de pacientes que forem identificados como suspeitos de dengue ao serem atendidos em Unidades de Pronto Atendimento do município de Contagem. A própria equipe da unidade de saúde será responsável pela coleta dessas amostras. Os espécimes clínicos serão obtidos durante o ano de 2013 e 2014 e serão destinados ao isolamento viral e analisados por meio de Biologia Molecular.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar os sorotipos de Dengue vírus que circulam em mosquitos adultos de *Aedes spp.* e em

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

humanos em distritos sanitários no município de Contagem, Minas Gerais.

Objetivo Secundário:

- Verificar a distribuição geográfica de mosquitos adultos de *Aedes spp* e dos sorotipos de Dengue vírus em distritos sanitários de Contagem e fazer georreferenciamento;
- Isolar e detectar Dengue vírus em mosquitos e em amostras clínicas de humanos em períodos não epidêmicos bem como em períodos com altas taxas de incidência de dengue em Contagem, MG; -
- Determinar o genotipo de Dengue vírus que infecta mosquitos e humanos em Contagem, MG;
- Estabelecer a relação filogenética das amostras de vírus detectadas em Contagem, MG, com as demais amostras de Dengue vírus, cujas sequências estão disponíveis em bancos de dados;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto é claro quanto aos riscos e benefícios para os sujeitos. O compromisso do pesquisador quanto à publicação dos resultados, ao uso/destino do material e/ou dados coletados está bem explicitado. Os critérios para a interrupção/suspensão da pesquisa são claros. O projeto tem um orçamento de R\$ 88.500,00 e será custeado por entidade de fomento à pesquisa (CNPq).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto visa basicamente investigar os tipos de vírus da Dengue encontrados em um município de Minas Gerais. O projeto está bem descrito, tem relevância para o avanço científico na área de Ciências da Saúde e Saúde Pública.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

DOCUMENTAÇÃO APRESENTADA CORRETAMENTE: Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do CONEP; Protocolo de Pesquisa da Plataforma Brasil; Parecer consubstanciado do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG; Termo de Compromisso dos Pesquisadores, concordando em cumprir a Resolução 196 do CNS; Carta de Anuência da Coordenação de Educação em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Contagem-MG.

Recomendações:

O projeto "Dengue virus CIRCULANTE NO MUNICÍPIO DE CONTAGEM, MINAS GERAIS" respondeu adequadamente a pendência de discriminar a faixa etária dos sujeitos a resposta teve como base o próprio desenho da pesquisa quando afirma que "Não serão observados faixa etária, sexo, cor, classe ou grupo social como critério para coleta do material clínico do indivíduo, desde que o mesmo esteja manifestando sintomas típicos de dengue; no entanto, as informações contidas no prontuário serão levadas em conta para a condução do estudo, como manifestações clínicas apresentadas pelo paciente, sexo e idade."

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

foi retirada do TCLE a frase "Esse estudo foi aprovado pelo".

Foram incluídos os TCLE modificados de acordo com as faixas etárias, conforme recomendação. recomenda-se a aprovação do projeto Dengue vírus CIRCULANTE NO MUNICÍPIO DE CONTAGEM, MINAS GERAIS da pesquisadora responsável Erna Geessien Kroon.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 27 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br