

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Jerusa Botelho Souza

**INVESTIGAÇÃO DE *Dengue virus* CIRCULANTES EM JUIZ DE FORA
- MG**

Juiz de Fora

2014

JERUSA BOTELHO SOUZA

**INVESTIGAÇÃO DE *Dengue virus* CIRCULANTES EM JUIZ DE
FORA- MG**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração:
Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Betânia Paiva Drumond

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Cortes Fernandes

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Jerusa Botelho.
Investigação de Dengue virus circulantes em Juiz de Fora - MG / Jerusa Botelho Souza. -- 2014.
79 p. : il.

Orientadora: Betânia Paiva Drumond
Coorientadora: Guilherme Cortes Fernandes
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Dengue. 2. Dengue virus. 3. Aedes aegypti. 4. Detecção molecular. I. Drumond, Betânia Paiva, orient. II. Fernandes, Guilherme Cortes, coorient. III. Título.

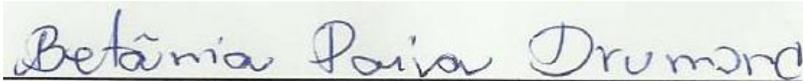
JERUSA BOTELHO SOUZA

INVESTIGAÇÃO DE *Dengue virus* CIRCULANTES EM JUIZ DE FORA - MG

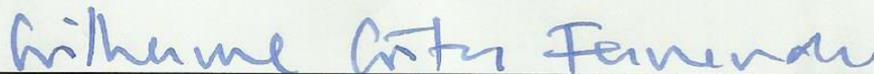
Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2014.

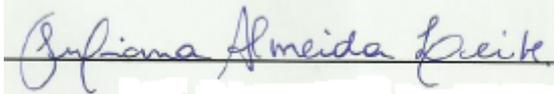
BANCA EXAMINADORA:



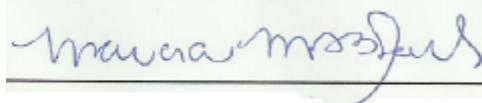
Prof^a. Dr^a. Betânia Paiva Drumond
Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora – MG



Prof. Dr. Guilherme Cortes Fernandes
Co-orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora – MG



Dr^a. Juliana de Almeida Leite
Fundação Oswaldo Cruz – RJ



Prof^a. Dr^a. Márcia Mercês Aparecida Bianchi dos Santos
Universidade Federal de Juiz de Fora – MG

Aos meus pais, Aécio Flávio e Laura Maria;

Ao meu irmão Juliano e família;

Ao meu marido Vanner;

A todos os familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e proteção que me concedeu nos momentos difíceis da execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de Juiz de Fora (PROPESQ/UFJF) pelo apoio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação e seu corpo docente pelo aprendizado e oportunidade de utilização dos recursos.

À minha orientadora, Betânia, por acreditar no meu trabalho, paciência, dedicação, por todos os ensinamentos que muito contribuíram para minha formação científica e, principalmente, pela oportunidade desta conquista.

Ao meu co-orientador, Guilherme, pelos esclarecimentos e participação na análise dos resultados.

Às professoras Maria Luzia Rosa e Silva e Márcia Bianchi e à pesquisadora Juliana Leite pelas orientações e disponibilidade em participar na avaliação deste trabalho, contribuindo ainda mais para os meus conhecimentos.

Aos companheiros do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia e do Laboratório de Virologia, em especial à Andrêssa, Izabela, Lívia, Camila e Tatiane que se tornaram a minha família no ambiente de trabalho. A amizade e a convivência com vocês foi um presente.

A todos os colaboradores da pesquisa, Laboratório Lawall, Santa Casa de Misericórdia, Hospital Universitário e Laboratório de Entomologia do Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental / Prefeitura de Juiz de Fora. A participação de todos foi essencial para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, que sempre respeitaram a minha decisão, agradeço os conselhos, o carinho e o acolhimento durante o mestrado.

Ao meu marido Vanner, pelo companheirismo e incentivo. Seu apoio foi muito importante na concretização deste trabalho. Obrigado pela sua compreensão e presença na minha vida.

Às amigas Fernanda e Luciana que foram grandes companheiras durante esta fase. Agradeço o auxílio nos momentos de dificuldade e insegurança.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A dengue é a arbovirose de maior importância para a saúde pública no Brasil. A cidade de Juiz de Fora vem passando por diversas epidemias de dengue nos últimos anos, com o registro de casos graves e óbitos. Diante deste contexto, este trabalho visou investigar a circulação de *Dengue virus* (DENV) em *Aedes aegypti* coletados do ambiente e em amostras clínicas de pacientes com suspeita de dengue por meio de técnicas moleculares e sorológicas. Amostras de *Aedes aegypti* (larvas e mosquitos) e soro de pacientes passaram pelo processo de extração de RNA total e este material foi utilizado para detecção de DENV por RT-PCR. Amostras clínicas de pacientes que apresentavam até seis dias de febre foram testadas para a proteína NS1 para *Dengue virus*. Além disso, foi realizada a análise das fichas dos pacientes nas quais foi possível verificar o dia de início da febre, os dados hematológicos (hematócrito, leucometria global e contagem de plaquetas) e sorológicos (IgM e/ou IgG). *Aedes aegypti* foi coletado em todas as regiões da cidade e dos 163 *pools* de larvas analisados, o DENV foi detectado em seis (cinco *pools* positivos para DENV-1 e um *pool* positivo para DENV-2). Estes *pools* haviam sido coletados nas regiões Norte, Centro e Sul. Das 166 amostras clínicas analisadas na detecção molecular, seis foram positivas (uma amostra positiva para DENV-1 e cinco amostras positivas para DENV-2). Sessenta amostras clínicas foram testadas para NS1 e 11 (18,33%) foram positivas. A partir da análise das fichas dos pacientes foi possível observar que 132 apresentavam resultados de sorologia. Destes, 39/132 (29,54%) apresentaram IgM, 9/132 (6,81%) apresentaram IgG e 15/132 (11,36%) apresentaram IgM e IgG. Além disso, 109 pacientes mostraram dados hematológicos. Entre estes, 18 (16,51%) pacientes apresentaram hematócrito inferior ao valor de referência, 32 (29,35%) desenvolveram leucometria abaixo de 3.500/mm³ e 24 (22,02%) tiveram contagem de plaquetas inferior ao valor de referência. Este é o primeiro estudo de investigação molecular de DENV em Juiz de Fora e os resultados indicaram a cocirculação dos sorotipos 1 e 2 em Juiz de Fora e a ocorrência da transmissão transovariana de DENV no *Aedes aegypti*. A combinação dos testes moleculares e sorológicos permitiu a identificação de 50 pacientes na fase aguda da doença e 22 na fase de convalescença. O conhecimento dos tipos virais circulantes no município e o diagnóstico da dengue em pacientes por mais de um teste e/ou parâmetro laboratorial constituem informações valiosas do ponto de vista epidemiológico e na estruturação de políticas públicas que visem o controle da dengue.

Palavras-chaves: Dengue. *Dengue virus*. *Aedes aegypti*. Detecção molecular.

ABSTRACT

Dengue is the most important arboviral disease to public health in Brazil. The city of Juiz de Fora has undergone several dengue epidemics in recent years, with the record of severe cases and deaths. Given that, this work aimed to investigate the circulation of dengue virus (DENV) in *Aedes aegypti* collected from the natural environment and in clinical samples from patients with clinical symptoms of dengue, using molecular and serological approaches. Samples of *Aedes aegypti* (larvae and mosquitoes) and serum of patients were used for total RNA extraction, and the total RNA was used for detection of DENV by RT-PCR. Clinical samples from patients who had fever for up to six days were tested for *Dengue virus* NS1 protein. Furthermore, analysis of patient records was performed in which we could check the day the fever began the hematological data (hematocrit, total leukocyte count, and platelet count) and serologic response (IgM and/or IgG). *Aedes aegypti* was collected in all regions of the city and from the 163 larvae pools that were analyzed, DENV was detected in six (five pools DENV-1 positive and one pool DENV-2 positive). These pools were collected in the North, Centre and South regions. A total of 166 serum samples were analyzed for molecular detection, being six DENV positive (one serum sample was DENV-1 positive and five serum samples were DENV-2 positive). Sixty clinical samples were tested for NS1 and 11 (18.33%) were positive. From the analysis of patient records was possible to observe that 132 had serology results. Of these, 39/132 (29.54%) were IgM positive, 9/132 (6.81%) were IgG positive and 15/132 (11.36%) were IgM and IgG positive. In addition, from 109 patients hematological data were available. Among these, 18 (16.51%) patients had less than the reference value, 32 (29.35%) developed leukocyte hematocrit below $3.500/\text{mm}^3$ and 24 (22.02%) had platelet counts below the reference value. This is the first study of molecular investigation of DENV in Juiz de Fora, and the results indicated the co-circulation of serotypes 1 and 2 in Juiz de Fora and the occurrence of DENV transovarial transmission in *Aedes aegypti*. The combination of molecular and serological tests allowed the identification of 50 patients in the acute phase of the disease and 22 in the convalescent phase. The knowledge of viral types circulating in the municipality and the diagnosis of dengue in patients using different techniques constitute valuable information from an epidemiological point of view and help to structure public policies aiming the control of dengue.

Key words: Dengue. *Dengue virus*. *Aedes aegypti*. Molecular detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral dos <i>Flavivirus</i>	13
Figura 2 - Representação esquemática do genoma do <i>Dengue virus</i>	14
Figura 3 - Diagrama esquemático do ciclo de replicação do DENV.....	19
Figura 4 - Diagrama representando os ciclos selvagem e urbano de transmissão do DENV, incluindo os principais vetores envolvidos.....	21
Figura 5 - Curso de uma infecção primária de dengue e opções de diagnóstico laboratorial de acordo com a fase da doença.....	27
Figura 6 - Mapa da distribuição mundial dos países ou áreas onde a dengue tem sido reportada.....	28
Figura 7 - Distribuição dos sorotipos virais no Brasil de janeiro a março de 2013.....	30
Figura 8 - Fluxograma da estratégia de estudo.....	35
Figura 9 - Distribuição dos <i>pools</i> de larvas e de mosquitos analisados nas principais regiões de Juiz de Fora, de 2011 a 2013, Juiz de Fora, Minas Gerais...	46
Figura 10 - Diagrama esquemático apresentando os resultados dos testes moleculares e sorológicos realizados com as amostras de soros de pacientes e dados hematológicos.....	48
Figura 11 - Organização esquemática dos pacientes que apresentaram a infecção pelo DENV de acordo com a detecção molecular e sorológica.....	49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Descrição dos genótipos e da localização das cepas pertencentes aos DENV 1-4.....	16
Tabela 1 - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net) no Brasil, em Minas Gerais e em Juiz de Fora de 2007 a 2012.....	31
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na detecção do tipo de DENV que tem como alvo as regiões C e prM do genoma.....	39
Tabela 3 - Combinação dos iniciadores e tamanhos dos fragmentos esperados da reação <i>Multiplex-semi-Nested-PCR</i> e <i>semi-Nested-PCR</i> com base nas regiões C e prM do genoma.....	41
Tabela 4 - Valores de referência dos índices hematológicos estudados para cada sexo.....	43
Tabela 5 - Relação dos <i>pools</i> de larvas e mosquitos coletados e analisados de acordo com o ano.....	45
Tabela 6 - Número de <i>pools</i> de larvas e mosquitos analisados nas principais regiões de Juiz de Fora, MG, de acordo com o ano em que foram coletados.....	45
Tabela 7 - Informações a respeito dos <i>pools</i> de larvas positivos na detecção molecular de DENV, em Juiz de Fora, Minas Gerais.....	45
Tabela 8 - Informações dos pacientes que foram positivos para a detecção sorológica e/ou molecular de <i>Dengue virus</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DENV	<i>Dengue virus</i>
RT	Transcrição Reversa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa
FD	Febre da Dengue ou Dengue Clássica
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DVEA	Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental
cDNA	DNA complementar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ARBOVIROSES.....	12
1.2 MORFOLOGIA, TAXONOMIA E ESTRUTURA DO <i>Dengue virus</i>	13
1.3 CLASSIFICAÇÃO.....	15
1.4 EVOLUÇÃO DO DENV.....	17
1.5 BIOSÍNTESE E MULTIPLICAÇÃO VIRAL.....	18
1.6 TRANSMISSÃO.....	19
1.7 PATOGÊNESE DA DENGUE.....	21
1.8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DENGUE.....	23
1.9 DIAGNÓSTICO.....	25
1.10 PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO DA DENGUE.....	27
1.11 EPIDEMIOLOGIA.....	28
1.11.1 Dengue no mundo.....	28
1.11.2 Dengue no Brasil.....	29
1.11.3 Dengue em Minas Gerais e em Juiz de Fora.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	35
4.1.1 Larvas e mosquitos.....	35
4.1.2 Amostras clínicas.....	36
4.1.3 Sobrenadante de cultura de células infectadas com DENV.....	37
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	37
4.2.1 Larvas.....	37
4.2.2 Mosquitos.....	38
4.2.3 Amostras clínicas e de sobrenadante de cultura de células infectadas com DENV.....	38
4.3 DETECÇÃO MOLECULAR DO MATERIAL GENÉTICO DE DENV.....	39

4.3.1 Transcrição reversa.....	39
4.3.2 PCR.....	40
4.3.3 <i>Multiplex-semi-nested-PCR</i>	40
4.4 DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	41
4.5 DETECÇÃO DA PROTEÍNA NS1 DO <i>Dengue virus</i> EM AMOSTRAS CLÍNICAS.....	42
4.6 ANÁLISE DAS FICHAS DOS PACIENTES.....	42
5 RESULTADOS.....	44
5.1 DETECÇÃO MOLECULAR DO MATERIAL GENÉTICO DE DENV.....	44
5.1.1 Larvas.....	44
5.1.2 Mosquitos.....	44
5.1.3 Amostras clínicas.....	46
5.2 DETECÇÃO DA PROTEÍNA NS1 DO <i>Dengue virus</i> EM AMOSTRAS CLÍNICAS.....	47
5.3 ANÁLISE DAS FICHAS DOS PACIENTES.....	47
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÕES.....	56
8 PERSPECTIVAS.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO...	67
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DE MENOR DE IDADE.....	68
APÊNDICE C - RELAÇÃO DE TODAS AS AMOSTRAS CLÍNICAS DESTE ESTUDO COM AS INFORMAÇÕES PRESENTES NAS FICHAS DOS PACIENTES E COM OS TESTES REALIZADOS.....	69
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFJF.....	76
ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVIROSES

As arboviroses são doenças causadas por arbovírus, que são um grupo heterogêneo de vírus. Estes vírus são mantidos na natureza por meio de ciclos complexos que envolvem vertebrados silvestres e artrópodes hematófagos, como mosquitos e carrapatos. Os seres humanos, geralmente, são hospedeiros acidentais (OCHIENG et al., 2013).

A maioria dos arbovírus pertence às famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae*. No Brasil, a maioria dos vírus que causam doença nos homens pertence às famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Bunyaviridae* e *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) (VASCONCELOS et al., 2009). Os *Flavivirus* apresentam importantes patógenos humanos como o vírus da dengue (DENV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV), vírus Iguape, vírus Ilhéus (ILHV), vírus Rocio (ROCV) e vírus da febre amarela (YFV). Os Flavivírus endêmicos de maior importância clínica no Brasil são os vírus da dengue (DENV) e da febre amarela (YFV) (FIGUEIREDO, 2007).

Os arbovírus patogênicos aos seres humanos podem causar uma ampla variedade de manifestações clínicas. Apesar das particularidades, as principais formas clínicas das arboviroses são doença febril, acompanhada ou não de exantema, febre hemorrágica e encefalite (VASCONCELOS et al., 2009). Em virtude desta semelhança, o diagnóstico clínico diferencial pode ser difícil, exigindo técnicas mais específicas como o isolamento viral e as técnicas moleculares (BRONZONI et al., 2005).

As arboviroses concentram-se nas regiões tropicais. Entretanto, mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem levar à introdução do vetor em novas áreas (regiões subtropicais), criar novos reservatórios ou levar a doença a se adaptar em outros ciclos. Estes fatores aliados à facilidade de locomoção de grandes distâncias podem ocasionar a introdução de arbovírus em outros países ou até mesmo continentes (FIGUEIREDO, 2007; REITER, 2010). Uma comprovação deste fato é o relato de casos autóctones de arboviroses nos Estados Unidos e nos países europeus (AÑES e RIOS, 2013; MEDLOCK et al., 2012). Atualmente, a principal medida de controle destas doenças é o combate ao vetor, pois ainda não existe vacina contra a maioria dos arbovírus, com exceção da Febre amarela e Febre do Vale Rift (OCHIENG et al., 2013).

1.2 MORFOLOGIA, TAXONOMIA E ESTRUTURA DO *Dengue virus*

O *Dengue virus* (DENV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Os *Flavivirus* constituem vírus envelopados, de simetria icosaédrica e medem de 40 a 60 nm (CHAMBERS, RICE e HAHN, 1990) (Figura 1).

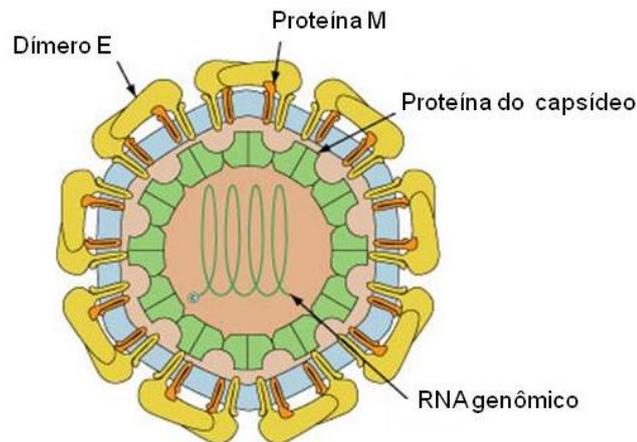


Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral dos *Flavivirus*. Indicação das proteínas estruturais na partícula (Proteína M: proteína da membrana e Proteína do capsídeo). Fonte: Adaptado de VIRAL ZONE - SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS.

A literatura científica já demonstrou a existência de quatro DENV genética e antígenicamente distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Recentemente, no ano de 2013, durante a Terceira Conferência Internacional de Dengue e Febre Hemorrágica do Dengue, o pesquisador Nikos Vasilakis, da Universidade do Texas, Galveston, EUA, apresentou um trabalho sobre a descoberta de um quinto tipo de DENV, como divulgado no sítio eletrônico de notícias da Sociedade Americana para o desenvolvimento da Ciência (American Association for the Advancement of Science). Este novo vírus foi isolado na Malásia, durante um surto ocorrido em 2007. Após o sequenciamento do genoma do vírus, os pesquisadores mostraram que este vírus era filogeneticamente distinto dos outros quatro DENV. Experimentos posteriores mostraram que anticorpos produzidos em macacos contra este novo vírus, diferenciaram-se significativamente dos anticorpos contra DENV-1-4 (SCIENCE, 2013).

O genoma do DENV é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 11.000 nucleotídeos (Figura 2). Ele apresenta uma única janela aberta de leitura (ORF, do inglês “*open reading frame*”) que codifica dez proteínas virais. A ORF é flanqueada por duas regiões não codificadoras denominadas UTRs (do inglês

“*untranslated region*”) de tamanhos variáveis, a 3'UTR e a 5'UTR (CHAMBERS, RICE e HAHN, 1990; GEBHARD, FILOMATORI e GAMARNIK, 2011; SMIT et al., 2011).

O genoma viral codifica para três proteínas estruturais, a proteína do capsídeo (C), do envelope (E) e uma proteína precursora de membrana (prM), e sete proteínas não estruturais, sendo elas: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Estas são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão gênica do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade. Em virtude do reduzido tamanho do genoma dos vírus de RNA, muitas das proteínas estruturais atendem a múltiplas funções no ciclo de multiplicação viral (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006).

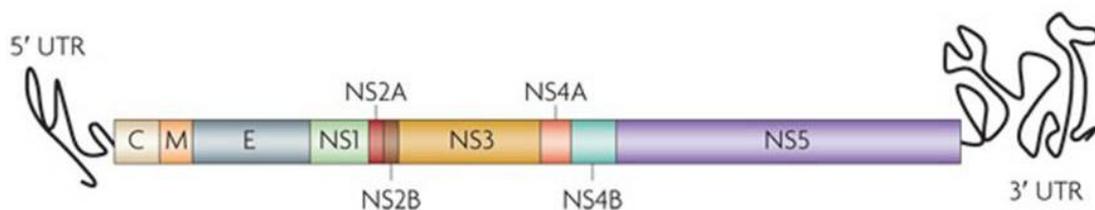


Figura 2 - Representação esquemática do genoma do *Dengue virus*. O genoma inclui as regiões não codificadoras 5'UTR e 3'UTR, os genes C, M e E que codificam as proteínas estruturais do capsídeo, membrana e envelope, respectivamente, e os genes NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 que dão origem as proteínas não estruturais. Fonte: GUZMAN et al., 2010.

A proteína C constitui um componente estrutural do nucleocapsídeo dos flavivírus (CHAMBERS, RICE e HAHN, 1990). Ela é uma proteína muito básica, o que permite a sua ligação ao RNA genômico para a formação do complexo ribonucleoproteico (LINDENBACH e RICE, 2001).

A proteína prM dos flavivírus é uma glicoproteína precursora da proteína M estrutural. A prM sofre uma clivagem tardia para formar M. Esta clivagem está provavelmente associada à maturação ou liberação do vírus (CHAMBERS, RICE e HAHN, 1990).

A proteína E medeia a ligação do vírus e a fusão com a membrana celular do hospedeiro, por meio da interação com os receptores na superfície da célula hospedeira. Ela constitui o maior alvo da imunidade humoral, na medida em que induz a produção de anticorpos (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006).

A glicoproteína NS1 é expressa em três formas: citosólica, na superfície de células e solúvel no soro. A NS1 solúvel induz a resposta imune humoral, o que a torna outro alvo da imunidade humoral (LINDENBACH e RICE, 2001). Além disso, a quantidade de NS1 sintetizada no soro de indivíduos infectados tem demonstrado correlação direta com a viremia e a patogênese da infecção por dengue (DUONG et al., 2011).

A proteína NS3 constitui uma proteína bifuncional que atua como protease, clivando várias proteínas virais, nucleosideotrifosfatase e helicase, sendo de grande importância na síntese do RNA viral. Para que ela tenha atividade faz-se necessário a presença do cofator NS2B (CHAMBERS, RICE e HAHN, 1990; CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006).

As proteínas NS2A, NS4A e NS4B são bem menos caracterizadas. A proteína NS4B, e em menor escala, a NS2A e NS4A são capazes de bloquear os sinais de transdução de interferon (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006).

A proteína NS5 constitui uma RNA-polimerase-RNA-dependente e atua como metiltransferase. Ela é a maior proteína e a mais conservada entre os flavivírus. Ela está associada à indução da transcrição e tradução de interleucina 8 (IL-8). A NS3 e NS5 juntas participam do processo de replicação do genoma (BORBA et al., 2012; CHAMBERS, RICE e HAHN, 1990; CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006).

1.3 CLASSIFICAÇÃO

Rico-Hesse (1990) comparando sequências de nucleotídeos da região E/NS1 do genoma de DENV 1 e 2 definiu os genótipos como um agrupamento de amostras virais que apresentam uma divergência na sequência maior do que 6% dentro de uma dada região do genoma. A análise filogenética baseada na sequência completa do gene E de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 confirma a existência de mais de um genótipo para cada tipo viral, que estão descritos no quadro 1 (CHEN e VASILAKIS, 2011; WEAVER e VASILAKIS, 2009). Outra subdivisão que tem sido abordada recentemente é "linhagem". Esta denominação tem sido empregada para caracterizar os vírus agrupados em subtipos em um nível taxonômico abaixo de genótipo (MENDEZ et al., 2010).

Quadro 1 - Descrição dos genótipos e da localização das cepas pertencentes aos DENV 1-4.

Sorotipo	Genótipo	Localização das cepas
DENV- 1	Genótipo I	Sudeste Asiático, China e Oriente Médio (Arábia Saudita).
	Genótipo II	Tailândia coletadas durante 1950 e 1960.
	Genótipo III	Cepa silvestre oriunda da Malásia.
	Genótipo IV	Ilhas do Pacífico Oriental (Japão, Coreia, China, Mianmar, Malásia e Indonésia), ilhas do Pacífico Ocidental (Polinésia Francesa, Nauru, Filipinas e Havaí), e Austrália.
	Genótipo V	Américas, algumas da África Ocidental, e um número limitado de cepas de Ásia.
DENV -2	Asiático I	Tailândia, Malásia, Camboja, Mianmar, Vietnã e Austrália
	Asiático II	China, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Sri Lanka, Índia, Honduras e México.
	Sudeste Asiático/ Americano	Subtipo 1: Sudeste Asiático.
		Subtipo 2: América Central e do Sul e no Caribe nos últimos 30 anos.
	Cosmopolitano (Genótipo IV)	Subtipo 1: subcontinente indiano, Butão, Sri Lanka, Bangladesh e as Seychelles.
		Subtipo 2: Caracterizado por uma distribuição global, com as estirpes da Indonésia.
Americano (Genótipo V)	América Central e do Sul, Caribe e linhagens mais antigas coletados no subcontinente indiano e Ilhas do Pacífico.	
Genótipo silvestre	Linhagens de humanos, mosquitos e primatas não-humanos coletadas na África Ocidental e do Sudeste Asiático.	
DENV- 3	Genótipo I	Sudeste Asiático, Filipinas e ilhas do Pacífico Sul.
	Genótipo II	Sudeste da Ásia
	Genótipo III	Sri Lanka, Índia, Japão, Taiwan, Singapura, Samoa, África Oriental, Central e América do Sul e Caribe.
	Genótipo IV	Porto Rico e Tahiti.
	Genótipo V	Filipinas, Japão, China e Brasil.
DENV-4	Genótipo I	Filipinas, Tailândia, Vietnã, Mianmar, Malásia, Sri Lanka, Índia, Japão, China e Brasil.
	Genótipo II	Subtipo I: Corresponde a todas as cepas isoladas nas Américas e cepas asiáticas (Indonésia, Nova Caledônia, Singapura, Malásia e Taiti), coletados antes de 2000.
		Subtipo II: Todas cepas asiáticas obtidas após 2000.
	Genótipo III	Representado pelas últimas cinco cepas tailandeses isoladas entre 1997 e 2001.
Genótipo IV	As três únicas amostras de DENV-4 silvestres conhecidas, que foram isoladas de macacos na Malásia durante a década de 1970.	

Fonte: CHEN e VASILAKIS, 2011.

1.4 EVOLUÇÃO DO DENV

O DENV, assim como os demais vírus de RNA, apresenta uma elevada variabilidade genética. Esta diversidade está relacionada, entre outros fatores, à atividade da RNA-polimerase-RNA-dependente, que, em virtude de não apresentar uma função corretora, promove uma replicação menos fidedigna. Dessa forma há uma maior taxa de mutação, que resulta em um grande número de variantes, denominados de quasispécies (CHEN e VASILAKIS, 2011).

Entre os fatores que contribuem para a manutenção da variabilidade genética estão a facilidade de locomoção de hospedeiros e vetores nos dias atuais, que, acompanhada da ampliação das áreas com o mosquito vetor no mundo permitiram a introdução de novos tipos e genótipos em regiões que até então não tinham um histórico de endemicidade. Aliado a estes fatores, está o tamanho da população de hospedeiros e vetores. O aumento da taxa de transmissão interfere na dimensão total da população viral e na taxa de replicação (CHEN e VASILAKIS, 2011).

A recombinação homóloga constitui outro evento que tem sido considerado para explicar a variabilidade genética intra-sorotipo e como responsável para o surgimento de novas cepas. Em regiões onde há a cocirculação de mais de um tipo/genótipo de vírus pode haver a coinfeção de vírus geneticamente diferentes no mosquito e no hospedeiro humano. A partir disso pode emergir uma cepa diferente (CHEN e VASILAKIS, 2011). Mas para que a recombinação seja considerada, faz-se necessário a sua comprovação repetidamente em populações clonais de vírus viáveis, como também que ela se mantenha estável durante a evolução após o evento de recombinação e que o fragmento recombinante seja demonstrado em um único PCR, seguido de clonagem para mensurar o que ocorre em uma única molécula de cDNA (WEAVER e VASILAKIS, 2009).

O processo de evolução do DENV é caracterizado por uma constante renovação de linhagens, na qual um vírus é introduzido no ambiente, persiste por um tempo e depois desaparece. A duração do tempo de permanência do vírus no ambiente é definida por várias questões, entre elas a seleção natural, que elimina as cepas virais que apresentam mutações deletérias ou desvantajosas. Teoricamente, as cepas de maior virulência, que tem a capacidade de causar uma elevada viremia no hospedeiro, que apresentam maiores taxas de transmissão para o hospedeiro, de infecção e disseminação dos vetores do mosquito são favorecidas pela seleção natural (CHEN e VASILAKIS, 2011; WEAVER e VASILAKIS, 2009).

Existem também fatores que restringem a variabilidade genética do DENV. O fato do DENV se multiplicar no vetor invertebrado e no hospedeiro vertebrado (o homem) é um fator

limitante à fixação de mutação do genoma. Dessa forma, para a manutenção do arbovírus no ambiente é necessário uma determinada estabilidade genética para não perder a capacidade de se replicar nos dois ambientes. Este evento funciona como uma seleção negativa (WEAVER e VASILAKIS, 2009).

1.5 BIOSSÍNTESE E MULTIPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de multiplicação do DENV inicia com a adsorção das partículas virais, pela ligação da proteína E aos receptores presentes na superfície da membrana da célula hospedeira [Figura 3 (1)]. Vários estudos têm sido realizados no sentido de caracterizar os receptores celulares envolvidos na infecção do DENV. Entre os diversos receptores das células de mamíferos, o melhor caracterizado é o DC-SIGN, que constitui uma molécula de adesão intercelular da célula dendrítica específica DC 3 (ICAM-3) ligada a uma não integrina. O DC-SIGN pode mediar a infecção de DENV 1-4 (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006; HIDARI e SUZUKI, 2011).

Após a ligação ao receptor de superfície, o DENV é internalizado no citoplasma da célula em vesículas intracelulares dependentes de pH [Figura 3 (2)]. O baixo pH dentro do endossomo desencadeia eventos moleculares na glicoproteína E, que levam à fusão da membrana endossomal com o envelope viral [Figura 3 (3)]. Consequentemente acontece a liberação e desmontagem do nucleocapsídeo no citoplasma celular [Figura 3 (4)]. Diversas vias endocíticas tem sido identificadas, entretanto a principal via de entrada que tem sido identificada é a endocitose mediada por clatrin (ALHOOT, WANG e SEKARAN, 2012; HIDARI e SUZUKI, 2011; SMIT et al., 2011).

Posteriormente, em associação com o retículo endoplasmático, o RNA viral dos flavivírus é traduzido em uma poliproteína [Figura 3 (5)], que será clivada pelas proteases celulares e pela serina protease codificada pelo vírus, dando origem às proteínas estruturais e não estruturais [Figura 3 (6)] (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006; LINDENBACH e RICE, 2001).

Após a tradução e o processamento das proteínas virais, a replicação inicia com a síntese de fitas de RNA de cadeia negativa, que servem de molde para a produção de múltiplas cópias de RNA viral de cadeia positiva (RNA genômico) [Figura 3 (7)]. Esta reação é catalisada pela proteína NS5 (RNA-polimerase-RNA-dependente) (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006; GEBHARD, FILOMATORI e GAMARNIK, 2011). De acordo com Lindenbach e Rice (2001), os RNAs virais recém-sintetizados se acumulam em associação com membranas citoplasmáticas na região perinuclear das células de mamíferos.

A montagem e a maturação da partícula viral se iniciam quando a proteína C interage com o RNA genômico do vírus no citoplasma de forma a produzir um precursor de nucleocapsídeo. As proteínas C, prM e E se orientam em relação à membrana do retículo endoplasmático [Figura 3 (8)]. Dessa forma, o nucleocapsídeo adquire o envelope por brotamento no lúmen do retículo [Figura 3 (9)]. Antes da liberação [Figura 3 (10)] das partículas virais por exocitose, elas passam por um processo de maturação que é de fundamental importância para a aquisição de infecciosidade. Acontece a clivagem da proteína prM para regular a ativação da proteína E e mediar a atividade de fusão. Esta clivagem normalmente distingue o vírus liberado de partículas virais intracelulares (BURKE e MONATH, 2001; JUNJHON et al., 2008).

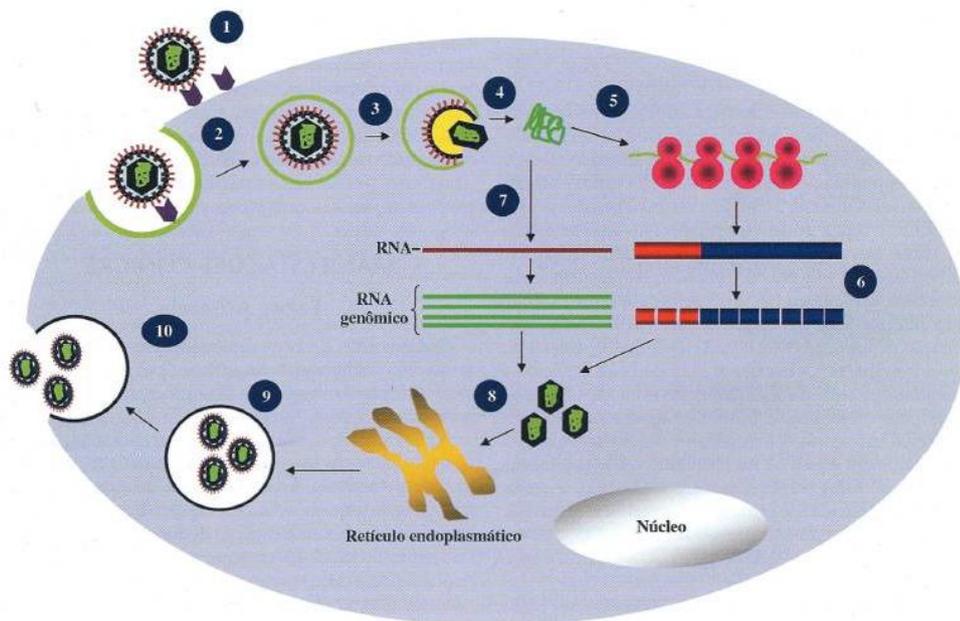


Figura 3 - Diagrama esquemático do ciclo de replicação do DENV. Etapas: (1) Adsorção, (2) Penetração, (3) Fusão da membrana endossomal com o envelope viral, (4) Desnudamento, (5) Tradução da poliproteína, (6) Clivagem das proteínas estruturais e não-estruturais, (7) Replicação, (8) Montagem da partícula viral, (9) Aquisição do envelope por brotamento, (10) Liberação das partículas virais. Adaptado de ROMANOS, 2008.

1.6 TRANSMISSÃO

Os DENV-1-4 são mantidos em dois ciclos de transmissão: o selvagem e o humano (Figura 4). No ciclo selvagem estão envolvidas espécies como *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *Haemagogus leucolaenus* e os primatas não humanos constituem os principais hospedeiros

reservatórios. No ciclo humano, o principal vetor responsável pela transmissão é o *Aedes aegypti*, espécie predominantemente urbana. Entretanto, outras espécies também podem transmitir como o *A. albopictus*. As áreas rurais são consideradas a ponte de ligação entre os dois ciclos, nelas predominam o *A. albopictus* e *A. furcifer*. Entre os fatores que propiciaram a expansão do mosquito e do DENV em áreas urbanas destacam-se o crescimento populacional das cidades, o processo de urbanização desordenado e as mudanças climáticas (CAMPOS et al., 2012; CHEN e VASILAKIS, 2011; MEDLOCK et al., 2012; VASILAKIS et al., 2012).

O vetor necessita da água para completar o seu desenvolvimento. Havendo as condições climáticas favoráveis (como pluviosidade, temperatura máxima e mínima e umidade do tempo), após a ovoposição da fêmea acontece a eclosão dos ovos, dando origem às formas imaturas (larva e pupa), para, a seguir, originar a forma adulta. Este desenvolvimento leva em média dez dias. O mosquito adulto pode viver desde poucas semanas até 45 dias, e uma vez infectado o mosquito pode transmitir o DENV durante toda a vida (CAMPOS et al., 2012; CHAN e JOHANSSON, 2012; PONTES e RUFFINO-NETTO, 1994).

O ciclo de transmissão do DENV inicia quando uma fêmea do mosquito, realizando o seu repasto sanguíneo para completar o desenvolvimento dos ovos, pica o homem. Caso a fêmea esteja infectada com DENV, ao picar o homem, inocula o vírus que está nas suas glândulas salivares. Se o homem estiver contaminado com o DENV e se encontrar na fase virêmica da doença, o mosquito pode tornar-se infectado (PONTES e RUFFINO-NETTO, 1994).

No vetor, o DENV se multiplica primeiramente no trato intestinal, em seguida, o vírus vai para as glândulas salivares, quando começa a ser transmitido pelo mosquito. O intervalo de tempo desde a infecção do vetor até a transmissão do DENV leva de 8 a 12 dias (CHAN e JOHANSSON, 2012). Na fêmea, o vírus também pode se multiplicar no trato genital, permitindo a contaminação do óvulo no momento da fertilização e a infecção da sua descendência (BURKE e MONATH, 2001). Estudos têm revelado que a transmissão transovariana constitui um importante mecanismo de manutenção do vírus no ambiente, especialmente em períodos interepidêmicos (CHEN e VASILAKIS, 2011; FIGUEIREDO et al., 2010; JOSHI, MOURYA e SHARMA, 2002).

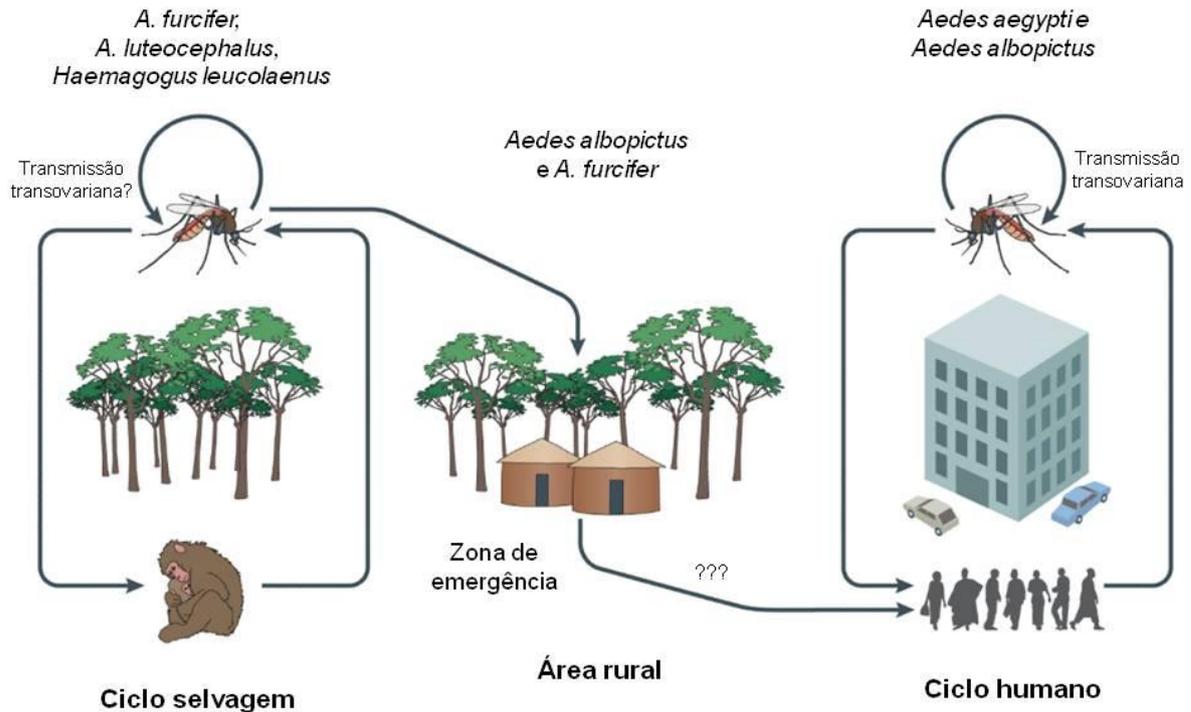


Figura 4 - Diagrama representando os ciclos selvagem e urbano de transmissão do DENV, incluindo os principais vetores envolvidos. Adaptado de VASILASKIS et al., 2012.

1.7 PATOGÊNESE DA DENGUE

Após a picada do vetor infectado, o DENV penetra no organismo do hospedeiro e infecta principalmente as células dendríticas da pele. Estas, por sua vez, migram para os linfonodos para apresentar o antígeno. Neste órgão acontece a multiplicação viral e o recrutamento de monócitos e macrófagos. O vírus é disseminado através do sistema linfático para outras partes do organismo, e várias células da linhagem mononuclear do sangue são infectadas, dentre elas derivados de monócitos, células dendríticas mielóides, macrófagos do baço e do fígado. As células dendríticas e os macrófagos infectados produzem citocinas e ativam os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. O interferon tipo 1 liberado pelos linfócitos T promove uma redução na atividade da medula óssea, levando a uma diminuição na produção de células sanguíneas. Por isso é comum detectar leucopenia e trombocitopenia no paciente com dengue (ROMANOS, 2008).

De acordo com Martina, Koraka e Osterhaus (2009), o fígado em geral é acometido em uma infecção pelo DENV. Percebe-se uma diminuição na função hepática, que pode explicar a diminuição da síntese dos fatores de coagulação e o desenvolvimento de coagulopatias. Associado a isto está a ocorrência de tendências hemorrágicas espontâneas e a elevação das enzimas hepáticas, a alanina transaminase (ALT) e a aspartato transaminase (AST).

Os mecanismos que levam a um quadro mais grave da doença ainda são pouco compreendidos, mas acredita-se que seja multifatorial, constituindo uma complexa interação de fatores do hospedeiro e do vírus. Entre os fatores de risco, destacam-se: a idade, o estado imunológico e os fatores genéticos do hospedeiro; o tipo e genótipo virais responsáveis pela infecção, a ocorrência de uma infecção secundária por um sorotipo diferente e a carga viral inoculada (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006; HALSEY et al., 2012; MARTINA, KORAKA e OSTERHAUS, 2009).

Em relação ao hospedeiro, os fatores genéticos constituem um importante componente de susceptibilidade a doenças. Alterações genéticas em alguns elementos do sistema imunológico podem levar a uma dificuldade no reconhecimento e na apresentação de antígenos, na resposta imune inata e no aumento do estresse oxidativo. Estes eventos contribuem com a infecção viral e a ocorrência de quadros graves ao facilitar a replicação viral e retardar a resposta imunológica (GUBLER, 1998).

Os vírus variam geneticamente e estas alterações podem conferir vantagens em relação à virulência, interferindo na patogênese da doença mais grave de dengue (CHEN e VASILAKIS, 2011; GUBLER, 1998; KHAN et al., 2012; LEITMEYER et al., 1999). Atualmente já se sabe que existem alguns genótipos do DENV envolvidos em quadros mais graves de infecção dengue; por exemplo, os genótipos asiáticos de DENV-2 e DENV-3 geralmente são mais virulentos que os encontrados na América e no Pacífico Sul (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006).

Outra hipótese para explicar os quadros mais graves como a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD) é a ocorrência de uma infecção secundária com um sorotipo distinto do que causou a infecção primária. Halstead e colaboradores (1967) estudando os quadros mais graves que ocorreram na Tailândia e em outros países asiáticos perceberam que os anticorpos produzidos na infecção primária são soro-específico e promovem uma proteção incompleta contra os demais sorotipos. Gubler (1998) explica que o anticorpo heterotípico reconhece o vírus e forma um complexo que é internalizado pelos leucócitos (principalmente macrófagos). Entretanto o vírus não é neutralizado e consegue se multiplicar dentro dos macrófagos, levando a um aumento na carga viral (GUBLER, 1998).

Este evento de facilitação da infecção de células pela ligação a anticorpos não neutralizantes é denominado no inglês *Antibody-Dependent Enhancement* (ADE). Em resposta à infecção do DENV, ocorre a ativação de linfócitos T, que juntamente com as células infectadas, começam a secretar mediadores vasoativos como o fator de necrose tumoral (TNF), IL-1, IL-1B, IL-6 e o fator ativador de plaquetas (PAF) resultando no aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma e mau funcionamento do sistema vascular que podem levar a uma hemorragia e ao choque hipovolêmico, denominado como síndrome de choque da dengue (GUBLER, 1998; GOTO et al., 2012; MALAVIGE et al., 2004; MALAVIGE et al., 2012; MARTINA, KORAKA e OSTERHAUS, 2009).

O conhecimento sobre a patogênese do DENV ainda é limitado, pois não existe um modelo animal ideal para estudar a infecção e a doença (BARGERON, HSIAO e NOISAKRAN, 2012).

1.8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DENGUE

A dengue é uma doença febril, não contagiosa que pode se mostrar como uma doença assintomática, ou a forma de Febre da Dengue ou Dengue Clássica (FD), Febre Hemorrágica de Dengue (FHD) e em Síndrome do Choque da Dengue (SCD) (HALSTEAD et al., 1970; HALSTEAD, 1980).

Embora esta classificação seja muito conhecida e utilizada até os dias de hoje, a Organização Mundial de Saúde propôs uma nova classificação em 2009 de acordo com níveis de gravidade da doença. A partir de estudos clínicos e parâmetros de laboratório, percebeu-se uma nítida diferença entre os pacientes com dengue grave e não grave. Os pacientes com dengue não grave foram divididos em dois grupos, pacientes com e sem sinais de alerta (DEEN et al., 2009; GOTO et al., 2012; MEDINA et al., 2012).

De acordo com a nova classificação, dentro do grupo de pacientes com dengue não grave, considera-se que o paciente está com dengue quando ele vive ou viaja para uma região endêmica e apresenta febre e dois dos seguintes critérios: náuseas, vômitos, erupções, dores, prova do laço positiva, leucopenia ou qualquer sinal de alerta. Os sinais de alerta são dor abdominal ou sensibilidade, vômitos persistentes, acumulação de fluido, sangramento da mucosa, letargia e inquietação, aumento do hematócrito acompanhado de uma rápida diminuição na contagem de plaquetas. Quando o paciente apresenta estes sintomas há a necessidade de uma observação criteriosa e uma intervenção médica (DEEN et al., 2009).

O paciente se encontra em um quadro de dengue grave quando há o extravasamento de plasma levando à SCD. Esta síndrome pode vir acompanhada de acúmulo de líquido com respiração mais intensa, hemorragia grave e o envolvimento de órgãos como fígado, através da elevação de AST e ALT e sistema nervoso central, quando são observadas alterações da consciência (DEEN et al., 2009).

A FD caracteriza-se por uma febre elevada (entre 39°C e 41°C) repentinamente acompanhada de sinais e sintomas inespecíficos como dores retro orbitais, na cabeça, nos músculos e nas articulações e fraqueza. O paciente pode apresentar anorexia, paladar alterado e uma leve dor de garganta. Podem acontecer eventos hemorrágicos como petéquias e púrpura na pele e pequenos sangramentos na mucosa (GUBLER, 1998). Os achados hematológicos e bioquímicos dos pacientes são neutropenia, linfocitose, trombocitopenia, teste de torniquete positivo, elevação nos níveis das enzimas hepáticas (BARROS et al., 2008; COHEN e HALSTEAD, 1966; HALSTEAD et al., 1970).

A FHD se assemelha muito à FD nos primeiros dias de infecção, entretanto ela apresenta manifestações hemorrágicas mais graves como petéquias, púrpura e equimoses, hemorragias na gengiva e no trato gastrointestinal. Além de trombocitopenia e hemoconcentração que podem conduzir a um aumento da permeabilidade vascular (GUBLER, 1998). A SCD constitui um agravamento do quadro com o aumento da permeabilidade vascular que leva ao derramamento do plasma dentro do compartimento extravascular, resultando em hemoconcentração e diminuição da pressão arterial. Outras manifestações observadas são taquicardia, esfriamento das extremidades do corpo e diminuição da proteína total (COHEN; HALSTEAD, 1966; HALSTEAD, 1980; HALSTEAD et al., 1970).

Após a picada do mosquito do gênero *Aedes* infectado com o DENV, o aparecimento dos sintomas acontece de três a dez dias (CHAN e JOHANSSON, 2012). O curso da doença é caracterizado inicialmente por uma elevação na viremia. Esta fase dura até o quinto dia após o início dos sintomas. A partir do sexto dia, ocorre a soroconversão e conseqüentemente, a diminuição da carga viral (Figura 5) (HALSTEAD, 1980; JARMAN et al., 2011; PAULA e FONSECA, 2004; VAUGHN et al., 2000).

Na infecção primária, a partir do sexto dia os níveis de imunoglobulina M (IgM) se mostram aumentados até o seu pico máximo que se dá em torno do 10º dia, considerada a fase aguda da infecção. Por volta do 70º dia, os anticorpos IgM declinam até atingirem níveis não detectáveis. As imunoglobulinas G (IgG) aparecem um ou dois dias após o aparecimento de IgM e persistem em níveis detectáveis pelo resto da vida, conferindo imunidade duradoura para aquele sorotipo específico. A fase de convalescença é caracterizada pelo declínio nos níveis de IgM e permanência dos níveis de IgG (BARROS et al., 2008; LIMA et al., 2012). Na infecção secundária a IgG remanescente da infecção

primária é a primeira imunoglobulina a ser produzida. A IgM é produzida em níveis bem menores, quando comparados à primeira infecção (HALSTEAD et al., 1967; PAULA e FONSECA, 2004).

1.9 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da dengue é baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BARROS et al., 2008). Como a dengue tem um amplo espectro de sintomas, sendo muitos inespecíficos, é de grande importância a confirmação laboratorial. O conhecimento do agente etiológico além de permitir um manejo clínico adequado do paciente, contribui com os dados epidemiológicos ao propiciar aos órgãos competentes uma notificação mais confiável (DEEN et al., 2009).

O diagnóstico laboratorial inclui exames inespecíficos, como hemograma, contagem de plaquetas, coagulograma, provas da função hepática e dosagem da albumina sérica e, exames específicos, tais como os testes sorológicos, o isolamento do vírus em cultura de células e a pesquisa do material genético viral por meio de técnicas moleculares (BARROS et al., 2008; PAULA e FONSECA, 2004).

A fase aguda da doença, compreendida até o quinto dia após o início dos sintomas, é caracterizada pela elevada carga viral (viremia) e pela presença do antígeno NS1. Nesta fase o diagnóstico da dengue é facilitado por meio do isolamento do vírus em cultura de células, da detecção molecular do genoma do DENV e a pesquisa de NS1 (Figura 5) (PAULA e FONSECA, 2004).

O isolamento viral em cultura de células constitui uma técnica muito utilizada em laboratórios de pesquisa. A maior vantagem deste método é amplificação do vírus, o que permite a sua caracterização genética, bem como a realização de outros testes, como o de susceptibilidade a drogas (MELO, 2010). A limitação desta técnica é o tempo consumido, pode ser necessário mais de sete dias de cultura para observar os resultados (JARMAN et al., 2011). Entre as linhagens de células utilizadas no isolamento do DENV, os clones de células C6/36 de *Aedes albopictus* são os mais amplamente empregados devido a sua alta sensibilidade e estabilidade (SAMUEL e TYAGI, 2006).

As técnicas de biologia molecular tem se mostrado muito úteis no diagnóstico, pois fornecem um resultado rápido, preciso, acurado, sensível e permitem a detecção de vírus que são de difícil isolamento nos sistemas normalmente empregados (CHEN et al., 2010). Outro ponto a ser considerado é o grande número de amostras que podem ser analisadas

(PAULA e FONSECA, 2004). Entretanto, esta técnica apresenta como limitação a dificuldade na detecção em amostras com carga viral baixa (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Vários protocolos têm sido desenvolvidos no intuito de detectar e identificar o tipo de vírus responsável pela infecção de dengue. A Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) permitiu uma das etapas mais importantes no diagnóstico molecular do vírus, que é a produção de uma fita de DNA complementar (cDNA) a partir uma fita de RNA fita simples e a identificação do tipo de acordo com o tamanho de fragmento de DNA gerado (BRONZONI et al., 2005; LANCIOTTI et al., 1992; SAMUEL e TYAGI, 2006). Outro aspecto a ser considerado são o desenvolvimento de protocolos de multiplex PCR. A realização de uma reação de PCR com mais de um primer específico para diferentes cepas virais tem agilizado o diagnóstico (PAULA e FONSECA, 2004).

A detecção de NS1 constitui um método sorológico de grande utilidade. Como este antígeno pode ser detectado a partir de um dia antes do início dos sintomas e até cinco dias após o início dos sintomas, ele permite um diagnóstico mais rápido durante a fase aguda da infecção. Este ensaio pode ser realizado por imunocromatografia e por ELISA (BISORDI et al., 2011).

A partir do terceiro dia após o início dos sintomas, o paciente com dengue pode desenvolver alterações hematológicas e bioquímicas, como leucopenia, neutropenia, presença de linfócitos atípicos, trombocitopenia e o aumento na dosagem das enzimas hepáticas (AST e ALT) e da albumina sérica, que podem ser detectadas por exames inespecíficos como o hemograma, a contagem de plaquetas e a dosagem das enzimas hepáticas. A observação destas alterações nestes exames pode contribuir com o diagnóstico da doença. Em muitos casos os testes sorológicos são realizados em conjunto para confirmar o diagnóstico (AZIN et al., 2012; BARROS et al., 2008; COHEN e HALSTEAD, 1966).

Após o sexto dia do aparecimento dos sintomas é observado a redução na carga viral e a produção de anticorpos. Nesta fase o diagnóstico é feito por meio dos testes sorológicos. Entre os métodos empregados na detecção dos anticorpos contra o DENV, os mais utilizados na rotina laboratorial são o ensaio imunoenzimático para IgM e IgG (ELISA) e o imunocromatográfico (Figura 5) (LIMA et al., 2012; PAULA e FONSECA, 2004). Estes testes apresentam maior rapidez, simplicidade, sensibilidade e não exigência por equipamentos caros e sofisticados, contribuindo também para a monitorização de regiões endêmicas e notificação às autoridades competentes (BISORDI et al., 2011). Entretanto, constituem limitações destas técnicas a ocorrência de reações cruzadas entre os anticorpos dos quatro sorotipos do DENV e os de outros flavivírus e o fato dos anticorpos serem melhor detectados a partir do quinto dia após o início dos sintomas (PAULA e FONSECA, 2004).

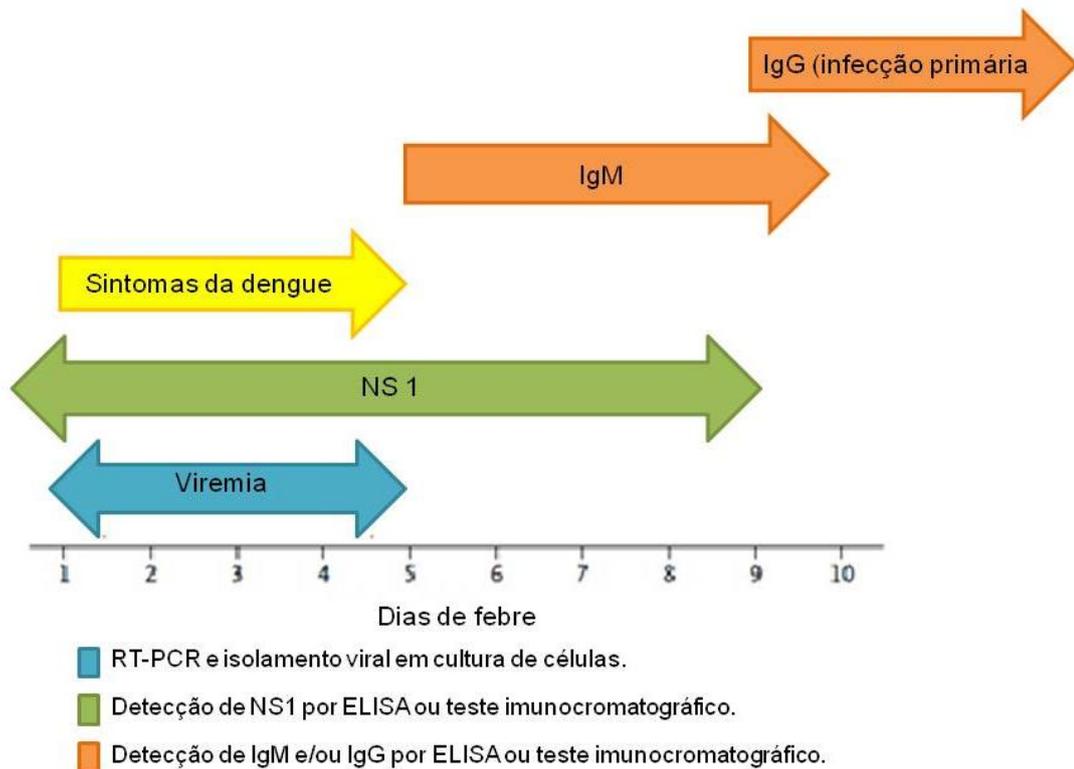


Figura 5 - Curso de uma infecção primária de dengue e opções de diagnóstico laboratorial de acordo com a fase da doença. Adaptado de SIMONS et al., 2012.

1.10 PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO DA DENGUE

Ainda não existe uma vacina contra a dengue licenciada para uso, entretanto, pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de obter uma que seja segura e eficaz. Entre as limitações encontradas para a obtenção da vacina incluem a necessidade da vacina conferir proteção contra todos DENVs, a dificuldade de encontrar um modelo animal adequado para o estudo da resposta imunológica e o custo relacionado ao processo de desenvolvimento. Com a descoberta do DENV 5 o desenvolvimento de uma vacina torna-se ainda mais desafiador (GUY e ALMOND, 2008; MAHONEY et al., 2012; MURRELL, WU e BUTLER, 2011; SABCHAREON et al., 2012; SCIENCE, 2013).

Embora diversas drogas tenham sido testadas, até o momento não existe um tratamento específico para a dengue. A doença é tratada com medicamentos para aliviar os sintomas, como o uso de antipiréticos para controlar a febre alta e a hidratação do paciente (ALEN e SCHOLS, 2012; RAJAPAKSE, RODRIGO e RAJAPAKSE, 2012). Outro procedimento recomendado para os casos mais graves com sinais hemorrágicos pronunciados é a transfusão de plaquetas (GAMAKARANAGE et al., 2012). É importante ressaltar que existem drogas contraindicadas para pacientes com suspeita de dengue, como

os antiinflamatórios não-esteroidais (especialmente a aspirina). Esta classe de medicamentos inibe a função plaquetária deixando o paciente com dengue mais predisposto a sofrer sangramentos (GORZONI, MASSAIA e PIRES, 2010).

Diante deste cenário, o combate ao vetor transmissor constitui a principal medida de controle da dengue. Entre as estratégias que têm sido utilizadas para controlar o mosquito destacam-se a aplicação de inseticidas, a destruição dos possíveis focos criadouros de larvas, como vedar caixas d'água e não deixar vasilhames expostos para impedir o acúmulo de água, e as campanhas de conscientização da população (BRAGA e VALLE, 2007; CASTRO et al., 2012).

1.11 EPIDEMIOLOGIA

1.11.1 Dengue no mundo

A dengue concentra-se nas regiões tropicais e subtropicais (HALSTEAD, 1980). As altas temperaturas e os elevados níveis pluviométricos desta região favorecem o desenvolvimento do mosquito transmissor da dengue (Figura 6) (SOUZA, SILVA e SILVA, 2010). Estima-se que 2,5 milhões de infecções de dengue ocorram anualmente e aproximadamente 50 bilhões de pessoas residam nos países localizados na área endêmica (NATHAN, DAYAL-DRAGER e GUZMAN, 2009).



Figura 6 - Mapa da distribuição mundial dos países ou áreas onde a dengue tem sido reportada. Fonte: Retirado de WHO, 2012.

1.11.2 Dengue no Brasil

A maior parte dos casos de dengue acontece nos centros urbanos durante os meses mais quentes e úmidos do ano, que são os cinco primeiros meses do ano, compreendendo de janeiro a maio, período considerado como epidêmico (MACIEL, SIQUEIRA JÚNIOR e MARTELLI, 2008; SOUZA, SILVA e SILVA, 2010). Os primeiros casos de dengue no Brasil foram registrados em Niterói (Rio de Janeiro) em 1923 e a doença foi diagnosticada com base em critérios clínicos (TEIXEIRA, BARRETO e GUERRA, 1999). A primeira epidemia de dengue, de que se tem relato aconteceu em 1981 na cidade de Boa Vista (Roraima, região Norte), na qual foi possível confirmar laboratorialmente a circulação dos tipos 1 e 4 (CORDEIRO, 2010).

Anos mais tarde, em 1986, ocorreu um grande surto no Rio de Janeiro em que foi detectado o DENV-1. Deste estado, o vírus se propagou para as regiões Nordeste e Centro-Oeste do país e foi o tipo predominante no Brasil na década de 80 (ARAÚJO et al., 2006). A partir do sequenciamento e análise do genoma de amostras de DENV-1 obtidos no Brasil, descobriu-se que todos os isolados pertenciam ao genótipo V e que houve a cocirculação de algumas linhagens, sendo que uma linhagem foi introduzida duas vezes, quase ao mesmo tempo, em diferentes regiões do país (DRUMOND et al., 2012a).

O primeiro relato de DENV-2 no país aconteceu no Rio de Janeiro em 1990 e depois em diversos estados brasileiros. A introdução do DENV-2 foi acompanhada do aumento no número de epidemias e da ocorrência de quadros mais graves de dengue como FHD e SCD (CRUZ et al., 2010; CUNHA et al., 1997; revisado por DRUMOND et al., 2012b). No Brasil já foram relatados o genótipo II de DENV-2 (ARAÚJO et al., 2006) e o genótipo Sudeste Asiático/Americano (CHEN e VASILAKIS, 2011). Além destes genótipos, já foi observado a introdução, propagação e circulação de três linhagens de DENV-2 bem definidas, em diferentes momentos, cuja origem provavelmente é o Caribe (DRUMOND et al., 2012b).

O DENV-3 foi identificado primeiramente no Rio de Janeiro em 2000. Este tipo viral foi considerado o responsável por uma das maiores epidemias no Estado do Rio de Janeiro, com um elevado número de casos de FHD e de mortes. Nos anos seguintes ocorreram relatos de DENV-3 em diversos estados brasileiros, demonstrando a sua rápida propagação (ARAÚJO et al., 2012). No Brasil há a cocirculação dos genótipos III e V de DENV-3 na região Norte, sendo o genótipo V associado a quadros mais graves de dengue em Porto Velho (AQUINO et al., 2009; CASTRO et al., 2013; CHEN e VASILAKIS, 2011; NOGUEIRA et al., 2008). O genótipo III descrito no país apresentou quatro linhagens distintas filogeneticamente (ARAÚJO et al., 2012).

O primeiro relato de reintrodução do DENV-4 no Brasil ocorreu em Manaus, em 2008 (FIGUEIREDO et al., 2008). No país já foram identificados o genótipo I em pacientes de Manaus, estado do Amazonas (MELO, ROMANO e ZANOTTO, 2009) e o genótipo II em amostras de pacientes provenientes dos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (SOUZA et al., 2011).

A situação epidemiológica atual do Brasil é caracterizada pela circulação dos quatro sorotipos virais (Figura 7) e pelo elevado número de casos de dengue (Tabela 1). Em 2013, foram notificados 1.476.917 casos suspeitos de dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

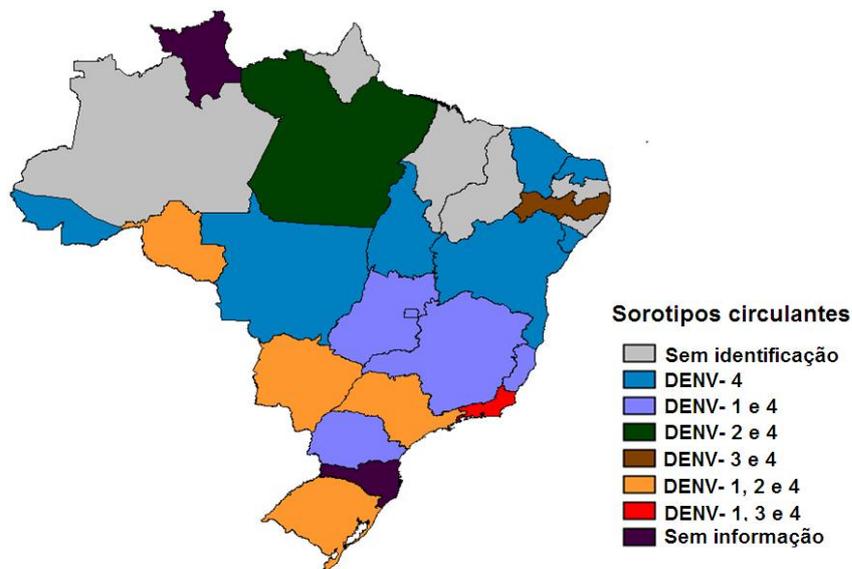


Figura 7 - Distribuição dos sorotipos virais no Brasil de janeiro a março de 2013. Fonte: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013.

1.11.3 Dengue em Minas Gerais e em Juiz de Fora

Os primeiros relatos de casos de dengue em Minas Gerais aconteceram a partir de 1987 (PONTES e RUFFINO-NETO, 1994). Desta data em diante, o estado já apresentou epidemias em diversas cidades (Tabela 1). Entre 2006 e 2007, foram detectados os sorotipos 1, 2 e 3 em um inquérito soroepidemiológico em três distritos de Belo Horizonte (PESSANHA et al., 2010). Esta informação foi confirmada pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (2013), que também comunicou a reintrodução do DENV-4 no estado. Esta situação exige uma intensificação das ações de combate ao vetor, haja vista a maior possibilidade de ocorrência de casos graves da doença.

Em 2013 o estado passou por uma grande epidemia, totalizando 435.828 casos confirmados, valor que excede o número registrado em 2010, quando Minas Gerais foi

considerado o estado com maior número de notificações (DATASUS, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Juiz de Fora (MG) é o maior município da Zona da Mata mineira, sendo considerada a capital regional da Zona da Mata e principal pólo de atendimento à saúde desta Região. A cidade tem aproximadamente 500 mil habitantes (IBGE, 2013) e localiza-se a 272 km de Belo Horizonte e 184 km do Rio de Janeiro (capital) (DNIT, 2010). Além de sua proximidade com estas duas importantes cidades brasileiras, que usualmente apresentam grandes epidemias de dengue, há um intenso trânsito de pessoas entre Juiz de Fora e estas duas capitais facilitando a introdução e cocirculação de tipos e genótipos na região. O município vem enfrentando grandes epidemias de dengue nos últimos anos, com a ocorrência de quadros graves e mortes, como por exemplo, em 2010, quando foram notificados 8.816 casos (Tabela 1). Deste total, 16 casos evoluíram para óbito. Em 2013, Juiz de Fora apresentou 5.264 casos confirmados (Dados disponibilizados pela Secretaria de Saúde de Juiz de Fora, 2014).

Tabela 1 - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net) no Brasil, em Minas Gerais e em Juiz de Fora de 2007 a 2012.

Local	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Brasil	500.339	559.895	386.133	984.425	730.292	540.844
Minas Gerais	28.528	49.251	53.294	209.472	38.370	22.949
Juiz de Fora	372	491	280	8.816	2.748	46

Fonte: DATASUS, 2013.

2 JUSTIFICATIVA

A dengue tem se destacado como a arbovirose de maior relevância para a saúde pública no Brasil e no mundo, principalmente pelo número de pessoas que estão nas áreas de transmissão da doença e pelas complicações que podem surgir. O país tem passado por muitas epidemias nos últimos anos. Em 2010 e 2011, por exemplo, foram notificados números expressivos de casos no Brasil, 984.425 e 730.292, respectivamente, o que exige maior atenção por parte das autoridades sanitárias.

Vários fatores estão relacionados aos quadros mais graves de dengue, dentre eles destacam-se a existência de genótipos mais virulentos e a ocorrência de uma infecção secundária causada por um tipo diferente do responsável pela primeira infecção. Existem genótipos de DENV mais virulentos que estão associados a infecções mais severas. A aquisição da virulência está relacionada principalmente à variabilidade genética dos vírus, que pode ser ocasionada tanto pela introdução de novos tipos, genótipos e linhagens virais, como pelas mutações. Alterações na sequência de nucleotídeos podem conferir vantagens aos vírus, como melhorar a habilidade de se replicar em monócitos, aumentar a carga viral e contribuir com a sua transmissão, tornando-o mais virulento. Outro fator que pode levar aos quadros mais graves é a ocorrência de uma infecção secundária por um tipo viral diferente do responsável pela infecção primária. Como os anticorpos são soros-específicos, quando um indivíduo é reinfestado por um tipo viral diferente, o vírus é parcialmente neutralizado, levando a um agravamento da doença. Este evento é favorecido pela cocirculação de tipos virais em uma mesma área. A situação epidemiológica de dengue no país é caracterizada pela presença do DENV-4 em alguns estados e pela circulação simultânea de mais de um tipo viral em outras regiões (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2013). Diante desta situação, estudos de detecção dos tipos de DENV tem grande relevância no Brasil.

No país há um maior número de casos de dengue na região Sudeste (41,7%), seguida pelas regiões Nordeste (36,3%), Centro-Oeste (36,3%), Norte (10,5%) e Sul (1,2%). Minas Gerais se localiza na região de maior ocorrência da doença e já apresentou epidemias em vários municípios.

A cidade de Juiz de Fora, a maior cidade da Zona da Mata mineira, é caracterizada por um grande trânsito de pessoas entre as cidades de Belo Horizonte e Rio de Janeiro que já apresentaram casos mais graves da doença, o que facilita a introdução e cocirculação de tipos e genótipos na região. O município vem enfrentando grandes epidemias de dengue nos últimos anos, com a ocorrência de quadros graves e mortes.

A realização do monitoramento molecular de DENV em larvas e mosquitos do ambiente proposta por este trabalho permitirá investigar se eles estão infectados com o DENV e, desta forma, detectar precocemente o(s) sorotipo(s) viral (is) que está (ão) circulando, mesmo em períodos não epidêmicos. A análise de amostras de DENV obtidas de pacientes também é de grande importância, pois além de realizar a identificação do(s) sorotipo(s) que está (ão) causando doença na população, permite verificar se há correlação entre o sorotipo viral com os quadros clínicos observados. O emprego das técnicas moleculares contribui com a identificação e genotipagem dos vírus circulantes, o que representa uma vantagem frente aos testes sorológicos. A partir destes conhecimentos podem ser obtidos dados pertinentes à transmissão, origem e circulação destes vírus na região.

Os resultados obtidos nesta pesquisa podem fornecer subsídio para a estruturação de políticas públicas e o estabelecimento de medidas de prevenção e controle, que podem levar à redução do número de casos e o tempo de duração das epidemias de dengue nesta região.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar e caracterizar as amostras de DENV circulantes no município de Juiz de Fora – MG, no período de 2011 a 2013.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a infecção pelo DENV em *pools* de larvas de *Aedes sp.* e *pools* de mosquitos *Aedes aegypti* coletados em pontos estratégicos de Juiz de Fora, MG, em períodos epidêmicos e não epidêmicos.
- Investigar a infecção pelo DENV em amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue em Juiz de Fora, MG por meio de testes sorológicos e moleculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de realização deste trabalho seguiram o fluxograma abaixo (Figura 8).

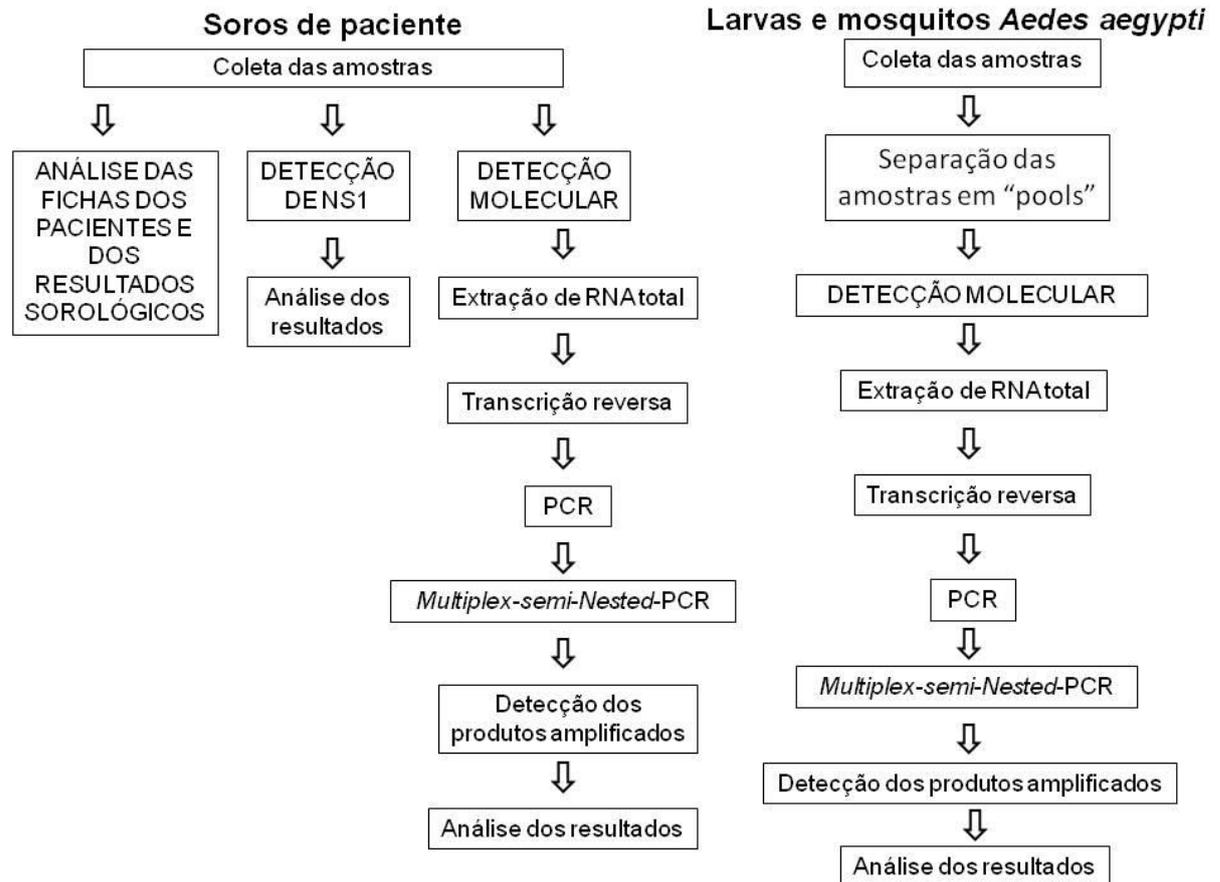


Figura 8 - Fluxograma da estratégia de estudo.

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

4.1.1 Larvas e mosquitos

A coleta das larvas e dos mosquitos *Aedes aegypti* foi coordenada pela Chefia do Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental (DVEA) da Prefeitura de Juiz de

Fora. As larvas e os mosquitos foram coletados de pontos estratégicos estabelecidos pelo DVEA em visitas periódicas nos bairros com o auxílio do puçá, no período de abril de 2011 a março de 2013. Em seguida, eles foram identificados pela equipe técnica do Laboratório de Entomologia do DVEA/Prefeitura de Juiz de Fora, separados por bairros, acondicionados sobre refrigeração e encaminhados para o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora em caixa térmica. Estes materiais foram organizados em “*pools*” (conjuntos) levando em consideração a espécie do vetor, o local de coleta e a semana epidemiológica. Cada “*pool*” de larvas continha no máximo 50 unidades e cada “*pool*” de mosquitos apresentava no máximo 20 unidades. Os microtubos foram armazenados em freezer -20°C até o processo de extração de RNA total.

Antes da realização da extração do RNA total, com base nas informações de onde cada amostra foi coletada (qual bairro), as amostras foram organizadas e classificadas de acordo com as principais regiões do município. Para esta análise foi consultado o site oficial da Prefeitura de Juiz de Fora (PREFEITURA DE JUIZ DE FORA, 2013).

Pelo menos cinco “*pools*” de larvas coletadas em regiões diferentes de Juiz de Fora foram analisados mensalmente. Os “*pools*” de mosquitos analisados foram selecionados de forma a avaliar amostras de diferentes bairros e regiões, no intuito de abranger ao máximo o município.

4.1.2 Amostras clínicas

Amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue foram obtidas da Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora, Laboratório Lawall e do Hospital Universitário de 2011 a 2013. Como a cidade de Juiz de Fora é um polo de referência em atendimento à saúde, da Zona da Mata mineira, ela recebe vários pacientes de outros municípios. Dessa forma, nem todas as amostras clínicas pertencem a pacientes residentes de Juiz de Fora. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora e da Santa Casa de Misericórdia (Parecer nº 352/2010) (ANEXOS A e B, respectivamente).

As amostras de soro foram aliquotadas em microtubos contendo 150 µl e foram armazenadas no freezer a -70°C até o momento da extração.

4.1.3 Sobrenadante de cultura de células infectadas com DENV

Os controles positivos foram os sobrenadantes de cultura de células de mosquitos (C6/36) infectadas com cada sorotipo do DENV. Estas amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Erna G. Kroon do Laboratório de Vírus, da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

4.2.1 Larvas

A extração de RNA total das larvas foi realizada pelo método da sílica (BOOM et al., 1990). Os *pools* de larvas foram macerados com pistilos plásticos estéreis e macerador automático (*Pellet pestle, disposable cordless motor* Sigma-Aldrich®) e acrescidos de 900µL de tampão de lise. Em seguida, foram agitados por uma hora no homogeneizador horizontal a 70 rpm. O material foi separado em centrífuga (*Thermo Electron Corporation*® CR3i multifunction) por 5 minutos a 6.800 x *g* e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 50µL de solução de sílica. O conteúdo foi homogeneizado manualmente por dois minutos e centrifugado por 45 segundos a 1.700 x *g*. O sobrenadante obtido foi descartado e ao sedimento foram acrescentados 500 µL de solução de lavagem e centrifugado por 45 segundos a 1.700 x *g* e o sobrenadante foi removido. Este processo foi repetido duas vezes. A seguir, o sedimento foi lavado duas vezes com 500µL de etanol (Sigma®) a 70%, centrifugado por 45 segundos a 1.700 x *g* e o sobrenadante foi retirado. O sedimento resultante foi suspenso com 500µL de acetona PA (Sigma®) e homogeneizado em vortex (Certomat®). O conteúdo foi centrifugado por 45 segundos a 1.700 x *g* e o sobrenadante foi removido com o auxílio de pipeta. Com a finalidade de secar o sedimento, os microtubos foram deixados no banho-maria a 56°C por 10 minutos de tampa aberta. Ao material foram adicionados 50µL de tampão Tris-EDTA (TE) previamente aquecido a 56°C, os tubos foram homogeneizados em agitador do tipo vortex e, em seguida, foram centrifugados por 5 minutos a 6.800 x *g*. O sobrenadante final que continha o RNA foi separado em alíquotas de 10 µL e estocado a -70°C até ser utilizado no processo de transcrição reversa.

4.2.2 Mosquitos

A extração de RNA total dos mosquitos foi realizada pelo método do Tri-reagente Sigma[®] que seguiram as orientações fornecidas pelo fabricante. Ao *pool* de mosquitos foram adicionados 250 µL de tampão fosfato salino (PBS, do inglês “*phosphate buffered saline*”) e macerado com o auxílio de pistilos plásticos estéreis e macerador automático (*Pellet pestle, disposable cordless motor* Sigma-Aldrich[®]). Em seguida, o material foi separado por centrífuga (*Thermo Electron Corporation*[®], CR3i multifunction) a 4.000 x g por 3 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foi acrescido de um ml de Tri-reagente e incubado de 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Sigma[®]) ao conteúdo, homogeneizado vigorosamente por 15 segundos e incubado à temperatura ambiente, por 3 minutos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 x g. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo devidamente identificado e acrescida de 500 µL de isopropanol (Sigma[®]). Em seguida, o conteúdo foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 x g, por 10 minutos. Nesta etapa houve a precipitação do RNA e formação de um sedimento com a consistência de gel. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com 1 ml de etanol (Sigma[®]) a 75%. A seguir, o conteúdo foi homogeneizado em agitador do tipo vortex (Certomat[®]) e centrifugado por 5 minutos a 7.500 x g. O sobrenadante foi retirado e o tubo foi mantido com a tampa aberta de 5 a 10 minutos para o sedimento secar. O RNA foi suspenso com 40 a 60 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPEC). Foram feitas alíquotas de 10 µL e estas foram congeladas a -70°C até ser utilizada na transcrição reversa.

4.2.3 Amostras clínicas e sobrenadante de cultura de células infectadas com DENV

O RNA total das amostras de soro e de sobrenadante de células infectadas com DENV foi obtido método da sílica (BOOM et al., 1990) como descrito anteriormente. Foram empregados 150 µl de soro e de sobrenadante no processo de extração. Em todas as amostras, o RNA extraído foi alíquotado em quantidades de 10 µl e armazenados no freezer -70°C até o momento de ser utilizado na transcrição reversa.

4.3 DETECÇÃO MOLECULAR DO MATERIAL GENÉTICO DE DENV

Nesta etapa foram empregados os protocolos de Lanciotti e colaboradores (1992) e Vilela e colaboradores (2010). Estas metodologias visam a amplificação da região do genoma do DENV compreendida pelos genes C e prM e utilizam os iniciadores D1, D2, TS1, TS2, TS3, TS4 e D1.2AP (Tabela 2).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na detecção do tipo de DENV que tem como alvo as regiões C e prM do genoma.

Iniciador	Sequência (5' - 3')
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA
D 1. 2AP	TGGCGAAGAGATTCTCAAAG

Fonte: LANCIOTTI et al, 1992 e VILELA et al., 2010.

4.3.1 Transcrição reversa

Para a síntese do cDNA, o RNA extraído de larvas, mosquitos, soros de pacientes e sobrenadante de cultura de células infectadas com DENV foram submetidos à reação de transcrição reversa. Em microtubos, 30 pmol do iniciador reverso D2 (IDT[®]) foram adicionados a 8ul (aproximadamente 500 ng) do RNA extraído. Os tubos foram submetidos à incubação a 70°C por 10 minutos para desnaturação e em seguida, foram incubados por dois minutos em banho de gelo. A seguir, ao conteúdo foi acrescentado a mistura de reagentes que apresentava tampão uma vez concentrado (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, Promega[®]), 50 mM de dNTP (Ludwig[®]), 200 mM de DTT (Ditiotreitol, Promega[®]), 200 U da Transcriptase reversa MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*, Promega[®]) e água DEPEC suficiente para completar o volume de 20 µL. Os microtubos foram incubados em termociclador (Eppendorf[®] *Mastercycler Thermal Cyclers*), a 42°C por uma hora e 72°C por 5

minutos. Ao final, os produtos da reação foram armazenados a -20° (LANCIOTTI et al., 1992).

4.3.2 PCR

A estratégia empregada nesta metodologia é a realização de um PCR em que há a amplificação de um fragmento de aproximadamente 511 pb, que compreende uma região do genoma comum aos quatro sorotipos de DENV. Um microlitro do sobrenadante do produto produzido na etapa anterior foi acrescido à mistura de reagentes contendo: tampão uma vez concentrado (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega®), 25 mM de dNTP (Ludwig®), 37,5 mM de MgCl₂ (Promega®), 2,0 pmol do iniciador D1 e 2,0 pmol D2 (IDT®), 0,25 U de *Taq* DNA Polimerase (Promega®) e água suficiente para completar 25 µl. Os tubos, a seguir foram incubados em termociclador Eppendorf® *Mastercycler Thermal Cyclers* e submetidos ao programa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 50 segundos, pareamento dos iniciadores a 55°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos, finalizando com extensão final 72°C por 5 minutos (LANCIOTTI et al., 1992).

4.3.3 *Multiplex-semi-Nested-PCR*

Nesta etapa da detecção molecular, foi mantido um dos iniciadores (D1) e empregado o iniciador D1.2AP (VILELA et al., 2010) e/ou os iniciadores específicos para cada tipo de DENV (TS1, TS2, TS3 e TS4) (LANCIOTTI et al., 1992).

Para a detecção do DENV em larvas, foi feita uma *Multiplex-semi-Nested-PCR*, usando o iniciador D1 e os quatro iniciadores específicos na reação (TS1, TS2, TS3 e TS4).

A detecção do tipo do DENV em mosquitos, amostras clínicas e sobrenadante de cultura de células infectadas com DENV foi realizada em duas reações de *Multiplex-semi-Nested-PCR* para cada amostra. Primeiramente foi feita uma reação com os iniciadores D1, TS1 e TS3. Em seguida, foi realizada outra reação com os iniciadores D1, TS2 e TS4. Estas combinações de iniciadores foram selecionadas em virtude dos tamanhos dos fragmentos esperados, de forma a facilitar a visualização dos produtos amplificados, após a separação eletroforética (Tabela 3).

Um microlitro do sobrenadante do produto obtido na reação anterior foi acrescido da mistura de reagentes contendo: tampão uma vez concentrado (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega[®]), 25 mM de dNTP (Ludwig[®]), 37,5 mM de MgCl₂ (Promega[®]), 1,0 pmol do iniciador D1 e 1,0 pmol de cada TS (IDT[®]), 0,25 U de *Taq* DNA Polimerase (Promega[®]). A seguir os tubos foram incubados em termociclador (Eppendorf[®] *Mastercycler Thermal Cyclers*) e submetidos ao programa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 50 segundos, pareamento dos iniciadores a 55°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos, finalizando com extensão final 72°C por 5 minutos (LANCIOTTI et al., 1992).

Com o objetivo de fazer uma rápida triagem nas amostras clínicas foi realizado em paralelo um “*semi-Nested PCR*”. Esta etapa previa a amplificação de um fragmento de 434 pb da região que contém os genes do capsídeo e da pré-membrana (C-prM) presente nos quatro tipos virais (Tabela 3). Nesta reação foram utilizados o iniciador D1 (LANCIOTTI et al., 1992) e o iniciador D1.2AP (VILELA et al., 2010). As condições de termociclagem foram as mesmas descritas anteriormente no *Multiplex-semi-Nested-PCR*.

Tabela 3 - Combinação dos iniciadores e tamanhos dos fragmentos esperados da reação *Multiplex-semi-Nested-PCR* e *semi-Nested-PCR* com base nas regiões C e prM do genoma.

Combinação dos iniciadores	Tamanho do fragmento esperado
D1 + TS1	482 pb
D1 + TS2	119 pb
D1 + TS3	290 pb
D1 + TS4	392 pb
D1 + D1.2 AP	434 pb

Fonte: LANCIOTTI et al., 1992 e VILELA et al., 2010.

4.4 DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

O produto obtido na última reação de cada protocolo foi separado em gel de poliacrilamida 8% por eletroforese. O gel foi montado em uma cuba vertical (10x10, BioRad[®]), com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1 X, pH 8,4 e a eletroforese ocorreu a 100 volts por 1 hora e 15 minutos. Em cada poço foram aplicados 10 µL do produto acrescidos de 2,5 µL do tampão de corrida 6 x concentrado (0,25% de xileno de cianol, 40% de sacarose). Foi utilizado o padrão de tamanho de DNA de 100 pb (Ludwig[®] Biotec) (BASSAN, CAETANO-ANOLLÉS e GRESSHOFF, 1991).

Após a separação eletroforética, o gel foi corado com o nitrato de prata. Primeiramente o gel foi imerso em uma solução fixadora 1 (40% de metanol, 10% ácido acético e 50% de água) por 30 minutos sob agitação constante de 45 rpm. A seguir, o gel foi lavado e imergido na solução fixadora 2 (10% de etanol, 5% de ácido acético e 85% de água) por 30 minutos sob agitação constante de 45 rpm. O próximo passo foi deixar o gel por 10 minutos em uma solução oxidante a 10% sob agitação. Depois, o gel foi lavado algumas vezes e a solução de 0,2% de AgNO_3 foi adicionada. Passados 20 minutos de agitação com esta solução, o gel foi lavado e a solução reveladora foi aplicada (2,93g Na_2CO_3 , 0,05g de Paraformaldeído e 100 mL de água). A coloração do gel foi interrompida com a mistura das soluções fixadora 1 e 2. O gel foi visualizado em Negatoscópio (Telepanorâmico, Blue equipamentos[®]) (BASSAN, CAETANO-ANOLLÉS e GRESSHOFF, 1991)

4.5 DETECÇÃO DA PROTEÍNA NS1 DO *Dengue virus* EM AMOSTRAS CLÍNICAS

A detecção do antígeno NS1 do *Dengue virus* foi realizada com o kit Dengue NS1 da Bioclin[®], que constitui um teste imunocromatográfico. A tira reativa foi retirada da embalagem e identificada. Com o auxílio da pipeta Pasteur que acompanha o kit, foram acrescentados três gotas (ou 100 μL) do soro ou plasma no espaço destinado a amostra. Passados entre 15 e 20 minutos foi realizada a leitura dos resultados.

O teste foi NS1 reagente quando houve a formação de duas linhas vermelhas, uma na região teste (T) e a outra na região do controle (C). Neste caso o paciente apresentava o antígeno Dengue NS1. O teste foi considerado não reagente quando a fita reativa continha apenas uma linha vermelha na região do controle (C), não havendo a formação da linha na região teste (T). Portanto, não foi detectado o antígeno Dengue NS1. Este teste foi realizado no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, em amostras clínicas de pacientes que apresentavam até seis dias de febre, de acordo com os dados fornecidos nas fichas clínicas.

4.6 ANÁLISE DAS FICHAS DOS PACIENTES

A partir da análise das fichas dos pacientes foram obtidos os resultados dos testes sorológicos (IgM e/ou IgG) e dos exames hematológicos (hematócrito, leucometria global e contagem de plaquetas) realizados pelos pacientes. Estes testes foram realizados nos

Laboratórios de Análises Clínicas colaboradores da pesquisa e os resultados dos mesmos foram encaminhados ao Laboratório de Virologia. A realização dos testes era condicionada à solicitação deste exame pelo médico e por isso nem todos os pacientes participantes da pesquisa apresentaram estes dados.

Para a detecção de anticorpos Dengue IgM e IgG, os laboratórios colaboradores da pesquisa utilizaram o teste imunocromatográfico Dengue Test Biscience[®]. De acordo com a apresentação do resultado, o teste poderia ser interpretado como reagente, não reagente e inválido.

Os Laboratórios de Análises Clínicas colaboradores da pesquisa realizaram os exames hematológicos solicitados pelos médicos para os pacientes com suspeita de dengue. Foi empregada a Citometria de Fluxo como método de análise. A partir das fichas com os dados dos pacientes, o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora utilizou os resultados do hematócrito, da leucometria global e da contagem de plaquetas. Os valores observados em cada parâmetro hematológico foram comparados com os valores de referência (Tabela 4) e classificados em inferior, normal e superior. Na contagem de plaquetas, além destas denominações, também foi empregado < 100.000 .

Pacientes com um quadro de dengue grave podem apresentar uma diminuição acentuada na contagem de plaquetas, de forma que valores inferiores a $100.000/\text{mm}^3$ são indícios laboratoriais importantes, pois indicam anormalidade na coagulação, que podem ser representadas por manifestações hemorrágicas como petéquias e sangramentos (AZIN et al., 2012; BARROS et al., 2008; DEEN et al., 2009).

Tabela 4 - Valores de referência dos índices hematológicos estudados para cada sexo.

Índices	Homens	Mulheres
Hematócrito (%)	41,0 a 53,0	35,0 a 46,0
Leucometria global ($/\text{mm}^3$)	3.500 a 10.000	
Contagem de plaquetas (mil/mm^3)	140.000 a 450.000	

Fonte: FAILACE, 2003.

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO MOLECULAR DO MATERIAL GENÉTICO DE DENV

5.1.1 Larvas

Foram processados 26 *pools* de amostras coletadas em 2011, 81 referentes a 2012 e 56 de 2013, perfazendo um total de 163 *pools* e 4.236 larvas analisadas (Tabelas 5 e 6). Foi detectado o material genético do DENV em seis (3,68%) *pools*. Em cinco *pools* foram encontrados os produtos amplificados com tamanho de aproximadamente 482 pb, correspondendo ao tamanho esperado para DENV-1, pelo protocolo de Lanciotti e colaboradores (1992). Em outro *pool* de larvas foi observado o produto amplificado com o tamanho de 119 pb, que corresponde ao esperado para DENV-2. Os *pools* positivos foram coletados em bairros que pertencem às regiões Centro, Norte e Sul (Tabela 7 e Figura 9).

Dos 163 *pools* de larvas analisados, 141 foram obtidos no período epidêmico e 22 no período não epidêmico. As amostras que apresentaram o produto amplificado com o tamanho esperado para DENV-1 e DENV-2 foram coletados nos períodos epidêmicos de 2012 e de 2013.

5.1.2 Mosquitos

Foram analisados seis *pools* de mosquitos coletados em 2011, 33 *pools* referentes a 2012 e oito de 2013, perfazendo um total de 47 *pools* e 382 mosquitos analisados (Tabelas 5 e 6). Todas as regiões de Juiz de Fora foram representadas com pelo menos um *pool* de mosquitos analisado (Figura 9). Não foi encontrado, em nenhuma amostra testada, o produto amplificado com a banda de tamanho correspondente a um dos quatro tipos de DENV.

Em relação a distribuição das amostras de mosquitos de acordo com o período do ano em que foram coletados, foi observado que todas as amostras de mosquitos de 2011 foram obtidas em período não epidêmico coletadas em 2012 e 2013 foram obtidas no período epidêmico.

Tabela 5 - Relação dos *pools* de larvas e mosquitos coletados e analisados de acordo com o ano.

		2011	2012	2013	Total
Larvas	# <i>pools</i> analisados	26	81	56	163
	# larvas analisadas	339	1429	2.468	4.236
Mosquitos	# <i>pools</i> analisados	6	33	8	47
	# mosquitos analisados	30	282	70	382

Tabela 6 - Número de *pools* de larvas e mosquitos analisados nas principais regiões de Juiz de Fora, MG, de acordo com o ano em que foram coletados.

Material	Ano	Norte	Nordeste	Centro	Leste	Oeste	Sul	Sudeste	Total
Larvas	2011	9	3	5	3	2	3	1	26
	2012	28	10	13	14	2	12	2	81
	2013	12	10	6	11	7	5	5	56
Mosquitos	2011	2	0	3	1	0	0	0	6
	2012	9	4	10	6	0	3	1	33
	2013	3	0	2	1	1	1	0	8

Nota: As regiões foram consultadas no site oficial da Prefeitura de Juiz de Fora (PREFEITURA DE JUIZ DE FORA, 2013).

Tabela 7 - Informações a respeito dos *pools* de larvas positivos na detecção molecular de DENV, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Identificação dos <i>pools</i> de larvas	Bairro/Região JF do <i>pool</i>	Região	Mês/ ano de obtenção da amostra	Número de larvas	PCR
176	Jardim Natal	Norte	Fevereiro/ 2012	15	DENV-1
323	Mariano Procópio	Centro	Maio/ 2012	19	DENV-1
429	Monte Castelo	Norte	Janeiro/ 2013	32	DENV-1
494	Bela Aurora	Sul	Janeiro/ 2013	47	DENV-1
534	Santa Helena	Centro	Janeiro/ 2013	19	DENV-1
626	Bairro Industrial	Norte	Janeiro/ 2013	35	DENV-2

Nota: As principais regiões com os seus respectivos bairros foram obtidos no site oficial da Prefeitura de Juiz de Fora (PREFEITURA DE JUIZ DE FORA, 2013).

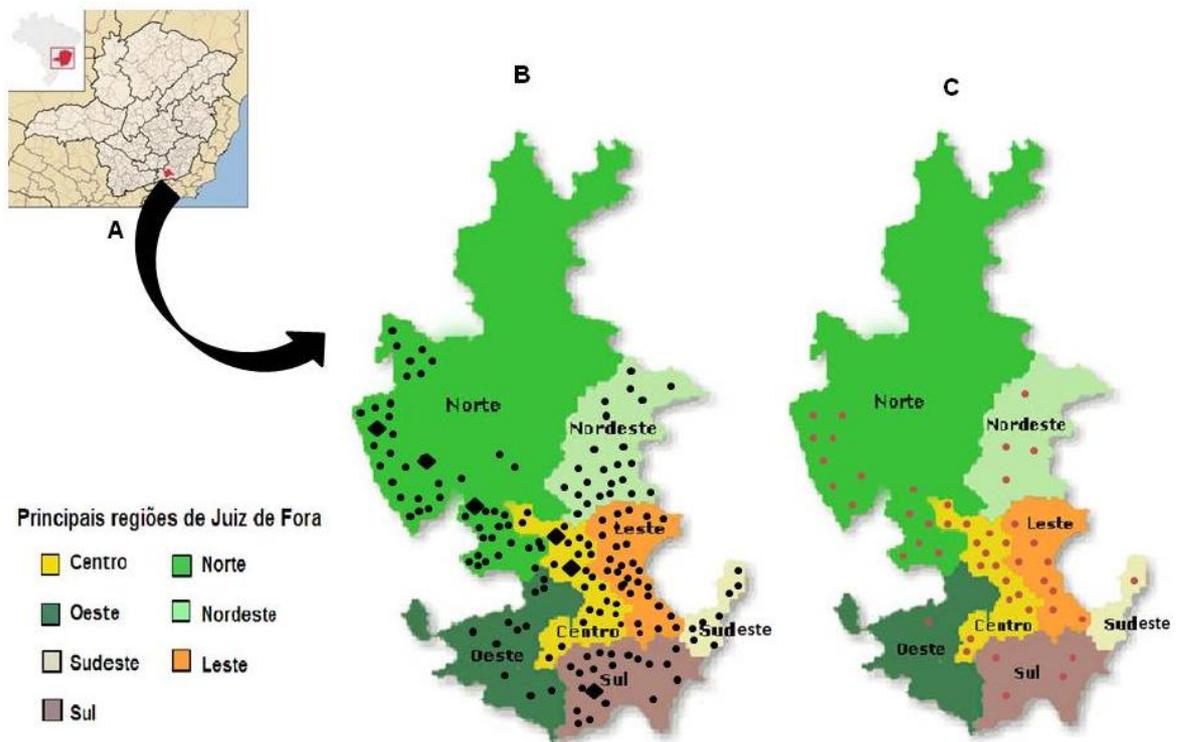


Figura 9 - Distribuição dos *pools* de larvas e de mosquitos analisados nas principais regiões de Juiz de Fora, de 2011 a 2013, Juiz de Fora, Minas Gerais. 9A: Mapa de Minas Gerais com a indicação da localização de Juiz de Fora, 9B: Distribuição dos *pools* de larvas analisados (pontos pretos) e dos *pools* em que foram encontrados o material genético do DENV (losangos pretos) nas principais regiões de Juiz de Fora e 9C: Distribuição dos *pools* de mosquitos analisados (pontos vermelhos) nas principais regiões de Juiz de Fora.

Nota: O mapa de Juiz de Fora com as suas principais regiões foi obtido no site oficial da Prefeitura de Juiz de Fora (PREFEITURA DE JUIZ DE FORA, 2013).

5.1.3 Amostras clínicas

Das 178 amostras clínicas obtidas neste estudo, 166 foram submetidas à detecção molecular do genoma do vírus por PCR (Figura 10 e Apêndice C). Destas amostras, 6/166 (3,61%) foram positivas para DENV. Em uma amostra foi encontrado uma banda com o tamanho de fragmento esperado para DENV-1 (482 pb) e nas outras cinco amostras foram encontrados uma banda com o tamanho correspondente a DENV-2 (119 pb). Duas amostras positivas foram coletadas em 2012 e as demais em 2013 (Tabela 8).

Tabela 8 - Informações dos pacientes que foram positivos para a detecção sorológica e/ou molecular de *Dengue virus*.

Ano	Amostra (paciente)	Resultados deste estudo				Dados das fichas dos pacientes			
		PCR	NS1	IgM	IgG	Dias de febre	Hematócrito	Leucometria global	Contagem de plaquetas
2012	8	DENV-2	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	11	DENV-1	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
2013	159	-	+	+	ND*	1	N	N	Inferior
	54	DENV-2	-	-	-	2	Inferior	N	< 100.000
	42	-	+	ND*	ND*	2	N	N	N
	45	-	+	+	ND*	2	N	N	< 100.000
	82	-	+	+	ND*	4	N	Inferior	Inferior
	24	DENV-2	+	ND*	ND*	5	ND*	ND*	ND*
	69	-	+	+	ND*	5	Inferior	N	< 100.000
	75	-	+	+	ND*	5	N	N	N
	80	-	+	+	ND*	5	N	Inferior	N
	53	DENV-2	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	26	DENV-2	NR	-	-	ND*	N	Inferior	N
	63	-	+	+	ND*	6	N	N	< 100.000
	94	-	+	+	ND*	6	N	Inferior	Inferior
	95	-	+	-	ND*	6	N	N	N

ND*: Não disponível; NR*: Não realizado; N: Normal; +: amostra positiva; -: amostra negativa.

5.2 DETECÇÃO DA PROTEÍNA NS1 DO *Dengue virus* EM AMOSTRAS CLÍNICAS

Sessenta amostras clínicas de pacientes, que apresentavam até seis dias de febre, coletadas em 2013 (Apêndice C), foram testadas quanto à presença do antígeno NS1. Deste total, 11/60 (18,33%) foram reagentes, sendo oito amostras de pacientes que apresentavam de um a cinco dias de febre e três, que apresentavam seis dias de febre (Tabela 8).

5.3 ANÁLISE DAS FICHAS DOS PACIENTES

Nas fichas de 72 pacientes havia a identificação do dia de febre que os mesmos apresentaram no momento da coleta. Deste total, 51/72 (70,84%) pacientes estavam com até cinco dias de febre, os demais se encontravam com seis dias ou mais.

Além desta informação, 132 fichas continham o resultado de testes sorológicos para detecção de IgM e/ou IgG. Setenta e nove pacientes haviam sido testados tanto para IgM quanto para IgG. Destes, 15/79 (19%) foram positivos nos dois testes (IgM+/IgG+), 6/79

(7,6%) foram IgM positivas e IgG negativas (IgM+/IgG-) e 9/79 (11,4%) foram IgM negativas e IgG positivas (IgM-/IgG+). Outras 53 pacientes tinham os resultados para IgM e destes, 33/53 (62,3%) apresentaram IgM (IgM+) (Figura 10, Figura 11 e Apêndice C).

Levando em consideração os dias de febre e a sorologia, foi observado que tanto os pacientes IgM e IgG positivos, quanto os IgM negativos e IgG positivos não apresentavam a identificação do dia de febre. Dos pacientes IgM positivos e IgG negativos somente um tinha a especificação do dia de febre (amostra 57, dois dias). Entre 33/53 (62,3%) pacientes que apresentavam apenas dados de IgM e que foram positivos neste teste, 31/53 (58,49%) estavam com um a nove dias de febre e 2/53 (3,77%) pacientes não tinham a indicação do número de dias de infecção (Apêndice C).

As fichas de 109 pacientes apresentaram dados hematológicos de hematócrito, leucometria global e contagem de plaquetas (Figura 10 e Apêndice C). Destes, 18/109 (16,51%) amostras apresentaram hematócrito inferior ao valor de referência; 32/109 (29,35%) pacientes mostraram leucopenia (leucometria global abaixo de $3.500/\text{mm}^3$) e 24/109 (22,02%) desenvolveram trombocitopenia, sendo 16 (14,68%) com número de plaquetas inferior a $140.000 \text{ mil}/\text{mm}^3$ e 8/109 (7,34%) com uma contagem de plaquetas abaixo de $100.000 \text{ p}/\text{mm}^3$.

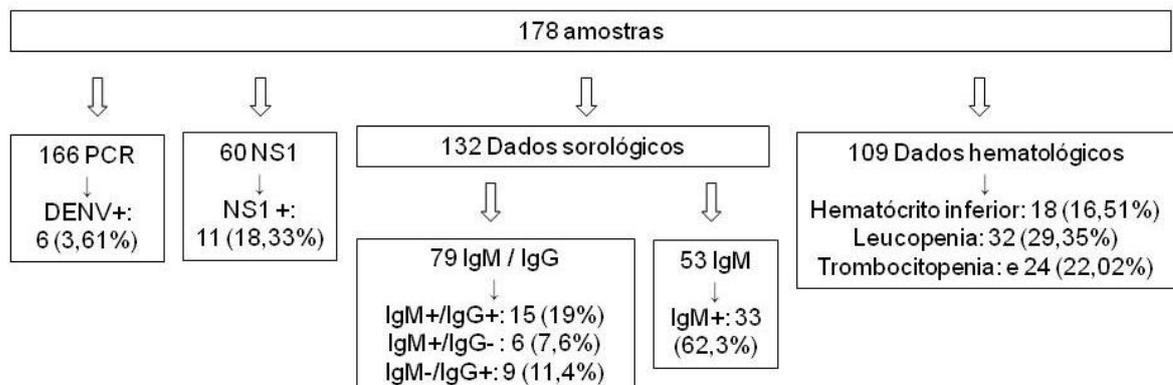


Figura 10 - Diagrama esquemático apresentando os resultados dos testes moleculares e sorológicos realizados com as amostras de soros de pacientes e dados hematológicos.

Entre os pacientes que foram positivos nos testes de detecção molecular, de NS1 e de anticorpos 39/109 (35,78%) desenvolveram pelo menos uma alteração hematológica, sendo a leucopenia 23/109 (21,1%) e a trombocitopenia 18/109 (16,51%) as de maior ocorrência. Outros 14/109 (12,84%) pacientes que foram positivos nos testes específicos não apresentaram nenhuma alteração hematológica. Em relação aos pacientes que se mostraram negativos na detecção molecular, de NS1 e de anticorpos, 19/109 (17,43%)

tiveram perfis hematológicos alterados, de forma que o hematócrito inferior ao valor de referência (9/109, 8,25%) e a leucopenia (8/109, 7,34%) foram as alterações hematológicas mais observadas. Outros 38/109 (34,86%) pacientes que foram negativos nos testes específicos para dengue não desenvolveram nenhuma mudança nos perfis estudados (Apêndice C).

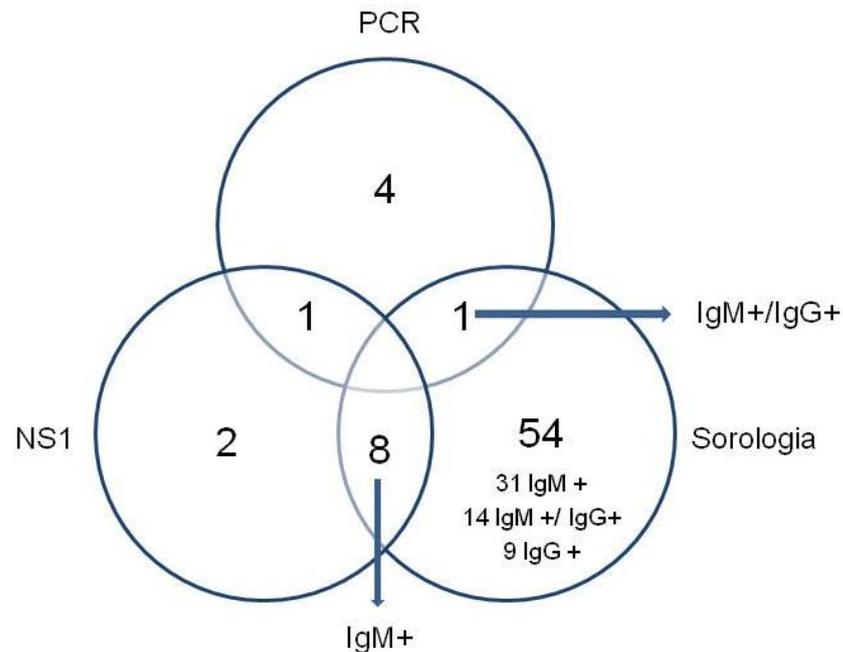


Figura 11 - Organização esquemática dos pacientes que apresentaram a infecção pelo DENV de acordo com a detecção molecular e sorológica.

Em relação às amostras positivas na detecção molecular referentes a 2012, uma amostra foi positiva tanto na detecção molecular, quanto na sorologia (IgM e IgG reagente). Das amostras positivas coletadas em 2013, observou-se que o paciente número 54 apresentava dois dias de febre, hematócrito e contagem de plaquetas inferiores aos valores de referência e IgM, IgG e NS1 negativos; o paciente referente à amostra 24 estava no quinto dia de febre e foi NS1 positiva e o paciente número 26 exibiu leucometria global inferior ao valor de referência (leucopenia) e foi negativa para IgM e IgG.

Os demais pacientes (tabela 8), embora não tenham apresentado o material genético viral, desenvolveram alterações hematológicas e sorológicas que podem ser observadas no quadro clínico de infecção pelo DENV.

6 DISCUSSÃO

As atividades de vigilância epidemiológica são de grande importância para a predição de epidemias e para o controle da dengue. Informações a respeito da circulação do vetor e do vírus, bem como do estado imunológico da população, no intuito de verificar se houve uma exposição prévia ao vírus permitem conhecer o panorama epidemiológico de uma dada região. De acordo com a situação entomológica e a circulação prévia de determinados sorotipos virais em certas áreas, medidas de vigilância e controle diferenciadas podem ser necessárias para prevenir a ocorrência de surtos e de casos graves de dengue. Neste contexto, estudos de epidemiologia e caracterização molecular dos DENV assumem grande importância para monitorar a transmissão e identificar o(s) sorotipo(s). Neste trabalho foi realizada a investigação molecular do DENV em larvas e mosquitos *Aedes aegypti* coletados do ambiente e em pacientes com suspeita de dengue.

A partir da análise das larvas de *Aedes aegypti*, foi encontrado em cinco *pools* o material genético de DENV-1 e em um *pool*, o de DENV-2. A detecção do material genético viral no estágio larvário indica a ocorrência da transmissão transovariana, evento que contribui com a manutenção do DENV em circulação no ambiente, mesmo em períodos interepidêmicos, quando a taxa de transmissão do vírus é baixa. Estudos similares já demonstraram a transmissão transovariana, como o de Guedes e colaboradores (2010) realizado em Recife (Brasil). Eles coletaram ovos do ambiente com o auxílio de armadilhas. Os ovos se desenvolveram até atingirem a fase adulta, dando origem a 139 *pools* de mosquitos. Deste total, 17 *pools* apresentaram o DENV (de forma que três tinham o material genético de DENV-1, dez, o DENV-2 e quatro, o DENV-3). Outro estudo observou a persistência de DENV-3 em sucessivas gerações de mosquitos *Aedes aegypti* por meio da transmissão transovariana (JOSHI, MOURYA e SHARMA, 2002). Desta forma, o *A. aegypti*, além de vetor, poderia ter um papel de reservatório viral.

No presente estudo, 3,68% dos *pools* de larvas analisados apresentaram o material genético de DENV. Esta porcentagem de *pools* de larvas positivos está de acordo com resultados obtidos por outros autores (VILELA et al., 2010). Vilela e colaboradores (2010) coletaram mosquitos e ovos de *Aedes aegypti* no ambiente por meio de armadilhas. No trabalho de Vilela e colaboradores, os mosquitos e as larvas, obtidas a partir do desenvolvimento dos ovos coletados, foram submetidos a detecção molecular de DENV. O material genético de DENV-3 foi encontrado em 1 (0,18%) dos 101 *pools* de larvas testados e em 4 (16,9%) dos 25 *pools* de mosquitos analisados (VILELA et al., 2010).

A transmissão do DENV depende da presença de *Aedes aegypti*. O desenvolvimento do vetor pode ser influenciado pelo clima e pela estação do ano. Vários trabalhos vêm

relacionando a ocorrência de casos de dengue à infestação do vetor e à condições climáticas, como umidade, pluviosidade e temperatura. Em geral, há uma maior ocorrência da doença nos meses mais quentes e úmidos (verão), que são situações favoráveis ao desenvolvimento do vetor (KARIM et al., 2012; SOUZA, SILVA e SILVA, 2010). Portanto, a variação de positividade de larvas e mosquitos na detecção molecular de DENV pode estar relacionada, dentre outros fatores, à época do ano que o material foi coletado, ao clima da região onde aconteceu a coleta e à infestação do vetor (KARIM et al., 2012; SOUZA, SILVA e SILVA, 2010).

Os Levantamentos do Índice Rápido de *Aedes aegypti* (LIRAA) de Juiz de Fora de janeiro de 2012 e 2013 registraram, respectivamente, Índices de Infestação Predial (IIP) de 3,1% e 7,56% (ACESSA, 2012; ACESSA, 2013). Estes valores são considerados bastante elevados em relação ao índice recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que determina que o LIRAA deve ser de até no máximo 1,0 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Entre as regiões que apresentaram maior número de infestação do vetor, destacam-se as regiões Leste, Centro, Sudeste e Norte (ACESSA, 2012; ACESSA, 2013). O presente estudo encontrou o material genético do DENV em *pools* de larvas coletados no período epidêmico de 2012 e 2013, em regiões caracterizadas pela alta infestação do vetor (Norte, Centro e Sul). Diante da importância destes resultados para o poder público, estes dados foram repassados para o DVEA/PMJF, no intuito de colaborar com o controle da dengue na cidade.

A vigilância entomológica baseada em testes laboratoriais constitui um importante mecanismo de monitoramento da circulação do DENV em uma região, na medida em que ela informa se os vetores estão carregando o vírus na natureza e o que está acontecendo em termos de transmissão durante o período estudado (FIGUEIREDO et al., 2010). Neste trabalho em nenhum *pool* de mosquito analisado, foi encontrado o material genético de nenhum dos quatro tipos virais pesquisados, embora, no geral, é mais comum encontrar o vírus em mosquitos do que em larvas (FIGUEIREDO et al., 2010; PINHEIRO et al., 2005). De acordo com Burke e Monath (2001), o mosquito adquire o vírus através da transmissão transovariana, ou se torna infectado a partir da ingestão de sangue com o vírus. Em contrapartida, as larvas apresentam como única opção de infecção do vírus a transmissão transovariana. Esta divergência entre os achados do presente trabalho com o demais poderia estar relacionada a alguns fatores tais como, (i) pequeno número de mosquitos analisados; (ii) o acondicionamento e transporte inadequado dos mosquitos até serem transportados ao Laboratório de Virologia da UFJF, (iii) pequena quantidade de mosquitos infectados por *pool*, ou mesmo baixa carga viral nestes. Ao contrário das larvas, não havia uma busca ativa por mosquitos durante as coletas pela equipe do DVEA, assim, a coleta dos mosquitos ocorria eventualmente, o que resultou em uma amostragem pequena. Além

disso, como os agentes de endemias não tinham condições de armazená-los e transportá-los refrigerados durante as coletas, a temperatura inadequada poderia comprometer a viabilidade da amostra biológica.

Além disso, neste trabalho, também foram analisadas amostras clínicas de pacientes com suspeita de dengue. Foram encontrados 16 pacientes na fase aguda da doença que foram positivos na caracterização molecular de DENV e/ou na pesquisa de NS1. Na detecção molecular, seis pacientes apresentaram o material genético de DENV, sendo uma amostra positiva para DENV-1 e cinco, para DENV-2. Outra abordagem para detecção da infecção viral foi a pesquisa pelo antígeno NS1 em amostras de pacientes com até seis dias de início dos sintomas, onde foram encontrados outros 10 pacientes na fase aguda da doença, que não foram positivos no PCR.

Na fase aguda da doença, a detecção do DENV pode ser feita pelos testes moleculares, por ser a fase virêmica (BARROS et al., 2008; VAUGHN et al., 2000). Entretanto, alguns pacientes que se encontravam na fase aguda da infecção foram negativos na PCR. Este achado poderia ser explicado, dentre outros fatores, a uma baixa carga viral, uma possível variabilidade genética dos vírus presentes nestes pacientes ou mesmo pacientes em uma fase mais avançada do curso da infecção, que poderiam ainda apresentar resultados positivos no teste de detecção de NS1 (HU et al., 2011; VAUGHN et al., 2000). Estudos já demonstraram que o nível de antígeno NS1 no sangue se correlaciona com a viremia e que ele pode ser detectado desde um dia antes do início dos sintomas até nove dias após os sintomas começarem, já que o antígeno pode ficar mais tempo na corrente sanguínea do paciente do que o vírus (ALCON et al., 2002; DUONG et al., 2011; HU et al., 2011). Outra questão a ser considerada é a possibilidade dos pacientes se encontrarem em uma infecção secundária. Tricou e colaboradores (2011) avaliando a cinética da viremia e do antígeno NS1 em 33 pacientes que se encontravam em uma infecção primária e 215, em uma infecção secundária por dengue, verificaram que a redução da viremia e do antígeno NS1 era mais rápida em pacientes que se encontravam em uma infecção secundária, de forma que a duração da viremia e do antígeno na corrente sanguínea em uma infecção secundária era menor, de dois a três dias.

Em pacientes infectados com DENV, geralmente, a partir do 5º ou 6º dia do início dos sintomas, ocorre a soroconversão e há a diminuição da carga viral na corrente sanguínea, sendo a dengue diagnosticada então, pela detecção de anticorpos. Contudo, neste estudo, na amostra de soro de um paciente (amostra 8) foi detectado o DENV-1 e também anticorpos anti-DENV do tipo IgM e IgG. Na ficha deste paciente não havia dados sobre o dia de febre ou dados hematológicos, mas a detecção simultânea de IgG, IgM e RNA viral poderia ser um indicativo de infecção secundária, uma vez que a produção de IgG em uma infecção primária, ocorre por volta do nono dia após o início dos sintomas (quando

já não seria esperado encontrar o vírus na corrente sanguínea) e na infecção secundária estes anticorpos já podem ser detectados a partir do sétimo dia da infecção (BARROS et al., 2008; LIMA et al., 2012). Resultados similares foram observados por Neeraja e colaboradores (2013), que avaliando 387 amostras clínicas de pacientes que se encontravam na fase aguda da infecção, detectaram em sete destas, os anticorpos IgM e IgG e o material genético do DENV.

De acordo com as fichas de alguns pacientes, 63 apresentaram anticorpos anti-dengue. Um destes foi positivo no PCR, como descrito acima e outros oito foram positivos também na pesquisa de NS1. Estudos têm demonstrado que, em virtude do momento que cada parâmetro (anticorpo e NS1) pode ser detectado no decorrer da infecção, a combinação destes dois testes tem aumentado a sensibilidade e a especificidade da detecção em pacientes que se encontram em diferentes fases do curso da infecção (BLACKSELL et al., 2011; HU et al., 2011).

No presente trabalho também foram observados pacientes (19%) que foram positivos tanto para IgM, quanto para IgG. Como não havia a identificação do dia de início febre nestes pacientes não é possível afirmar que eles estavam em uma infecção secundária recente, estes poderiam estar na fase convalescente da doença, quando os níveis de IgM e IgG ainda podem ser detectados (LIMA et al., 2012). Outros pacientes se mostraram positivos para IgM e negativos para IgG (7,6%). Destes, um se encontrava com dois dias de febre (amostra 57). Esta amostra, em especial, foi negativa para NS1 e para PCR. Hu e colaboradores (2010) avaliando a cinética dos anticorpos IgM e IgG e do antígeno NS1 em amostras de pacientes que se encontravam em uma infecção primária, detectaram a imunoglobulina M no terceiro dia após o início dos sintomas. Este achado do presente trabalho poderia talvez indicar a ocorrência de uma infecção primária recente. A partir da análise das fichas, verificou-se também a presença de pacientes que foram negativos para IgM e positivos para IgG (11,4%). Como as fichas destes pacientes não tinham informação sobre o início do dia de febre, a presença da imunoglobulina G poderia indicar que o paciente estava na fase convalescente da doença ou em uma infecção secundária, como também já ter apresentado uma infecção passada.

Além destes pacientes com dados sorológicos, outros (62,26%) apresentavam apenas resultados de IgM e se mostravam positivos neste teste. Entre estes, 58,49% dos pacientes se encontravam com um a nove dias de infecção. Pelo fato das fichas destes não mostrarem dados sobre o teste de IgG, não é possível afirmar se eles estavam em uma infecção primária ou secundária, mas estavam com uma infecção recente. Embora os testes sorológicos se apresentem muito úteis na avaliação do perfil imunológico da população deve-se considerar a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com anticorpos de outros flavivírus. Portanto, não é possível afirmar que os pacientes positivos na sorologia

estejam infectados com DENV. Este fato é importante, ainda mais que a sintomatologia observada em pacientes infectados com outros flavivírus pode ser semelhante a observada na dengue.

A partir da análise das fichas e dos resultados dos testes, foi observado que entre os pacientes positivos nos testes específicos para dengue, 35,78% desenvolveram pelo menos uma alteração hematológica e que outros se mostraram normais nos três perfis analisados (hematócrito, leucometria global e contagem de plaquetas). Verificou-se também a ocorrência de pacientes negativos nos testes específicos para dengue que mostraram alterações hematológicas, como hematócrito inferior ao valor de referência, leucopenia e trombocitopenia (17,47%). Barros e colaboradores (2008) observaram evento semelhante, quando de 111 pacientes negativos para IgM, 18 apresentaram trombocitopenia e 22, leucopenia.

O hemograma, ao informar o estado clínico do paciente, pode contribuir com o diagnóstico e prognóstico do paciente. Nos casos mais graves de infecção a observação de trombocitopenia intensa, por exemplo, pode indicar a ocorrência de hemorragias, evento geralmente relacionado ao agravamento do quadro clínico. Azin e colaboradores (2012) avaliando a dinâmica dos perfis hematológicos e bioquímicos de pacientes com suspeita de dengue observaram que a trombocitopenia foi o achado laboratorial de maior ocorrência em pacientes com Febre Hemorrágica do Dengue. Entretanto, a realização apenas do hemograma em uma suspeita de dengue, como já demonstrado e também verificado no presente trabalho, não é suficiente para diagnosticar a doença, pois outras enfermidades podem levar às alterações observadas, ou mesmo a sintomatologia semelhante, como malária, gripe, leptospirose, febre tifoide e sarampo (BUCHY e PEELING, 2009).

Estes resultados mostram a importância do diagnóstico diferencial da dengue, por meio de testes específicos, na medida em que estes permitem a identificação do agente infeccioso que está causando a infecção no paciente. Dessa forma, a detecção molecular de DENV e a pesquisa do antígeno NS1 de *Dengue virus* seriam os métodos empregados na confirmação da infecção viral de pacientes que se encontram na fase aguda da dengue. Os testes sorológicos de detecção de IgM e IgG auxiliam o diagnóstico na fase de convalescença. Os resultados da detecção de anticorpos juntamente com os dados de início dos sintomas do paciente, podem indicar uma infecção prévia, o que é de grande importância, especialmente em lugares onde há a circulação de mais de um sorotipo viral, como no Brasil.

Assim como nas larvas de *Aedes aegypti*, nos pacientes foram encontrados o material genético de DENV-1 e DENV-2. Estes resultados apontam a cocirculação de dois tipos virais no município de Juiz de Fora, nos anos de 2012 e 2013. Estudos já verificaram que a introdução de um novo tipo viral em uma dada região geralmente é acompanhada da

ocorrência de casos mais graves de dengue. Pelo fato dos anticorpos serem soros-específicos, o anticorpo produzido na infecção primária por um sorotipo não protege o paciente frente a uma infecção heterotípica. Em uma infecção secundária, estes anticorpos heterotípicos sub-neutralizantes podem interagir com os vírus, facilitando a infecção de mais células (principalmente macrófagos), pelo mecanismo de ADE (*Antibody-dependent enhancement*) (GUBLER, 1998; NOGUEIRA et al., 1993; NOGUEIRA et al., 2005).

A hipótese de que a cocirculação facilita a ocorrência de quadros mais graves de infecção e de mortes, pode ser um dos fatores associados aos casos de Dengue com complicações (10 casos), três casos de Febre Hemorrágica do Dengue e quatro óbitos relacionados à dengue em Juiz de Fora no ano de 2013 (Informações disponibilizadas pelo DVEA/JF em 2014). Outros fatores, como características genéticas do vírus e do hospedeiro, bem como sua resposta imune também podem estar relacionados a estes casos (GUBLER, 1998).

Este é o primeiro estudo de levantamento molecular de DENV em Juiz de Fora, mostrando a cocirculação dos DENV-1 e DENV-2, nos anos de 2012 e 2013, tanto no vetor, quanto no hospedeiro humano. Os achados de cocirculação viral reforçam a necessidade de continuidade de vigilância de DENV, no município, uma vez que a hiperendemicidade pode estar relacionada com a ocorrência de quadros mais graves de dengue. Além disso, os resultados deste trabalho reforçam a necessidade da realização de diferentes testes laboratoriais diferenciais, permitindo a identificação correta do DENV (ou mesmo outro patógeno), bem como a identificação de infecções prévias, auxiliando no diagnóstico preciso e prognóstico dos pacientes. Estas medidas em conjunto, podem auxiliar no controle e prevenção desta doença, nesta região.

7. CONCLUSÕES

- O *Aedes aegypti* encontrava-se distribuído em todas regiões de Juiz de Fora, nos anos de 2012 e 2013.
- As regiões Norte, Centro e Sul de Juiz de Fora apresentaram *pools* de *Aedes aegypti* infectados com DENV, em 2012 e 2013.
- Foi demonstrada a transmissão transovariana de DENV-1 e DENV-2 em *Aedes aegypti* em Juiz de Fora, nos anos de 2012 e 2013.
- Foi observado a cocirculação dos DENV-1 e DENV-2 em *A. aegypti* e na população humana, nos anos de 2012 e 2013, em Juiz de Fora.
- Foi demonstrada a importância do diagnóstico diferencial da dengue, na medida em que os métodos inespecíficos não conseguiram determinar um quadro de dengue, como também da importância da combinação de mais de um método de diagnóstico.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar tentativas de isolamento viral, das amostras positivas para dengue, permitindo outros estudos de caracterização destes vírus, como a genotipagem.
- Investigar a presença de outros flavivírus, que não DENV, nas amostras clínicas de pacientes com sintomatologia semelhante à de dengue, mas negativos nos testes de detecção de DENV.

REFERÊNCIAS

- ACESSA. Dengue. Índice de infestação pelo mosquito da dengue em JF aponta estado de alerta. Disponível em:< <http://www.acesa.com/saude/arquivo/dengue/> 2012/01/12 -indice-de-infestacao-pelo-mosquito-da-dengue-em-jf-indica-alerta>. Acesso em 08 dez. 2012.
- ACESSA. Dengue. Juiz de Fora apresenta LIRAA de 7,56% e preocupa autoridades. Disponível em:< <http://www.acesa.com/saude/arquivo/dengue/2013/01/17-juiz-de-fora-apresenta-liraa-de-756-e-preocupa-autoridades>>. Acesso em: 20 dez. 2013.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to *Dengue virus* type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.2, p. 376-381, fev. 2002.
- ALEN, M. M. F.; SCHOLS, D. *Dengue virus* entry as target for antiviral therapy. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p.1-13, jan. 2012.
- ALHOOT, M. A.; WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. RNA interference mediated inhibition of dengue virus multiplication and entry in HepG2 cells. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. 1-11, jan. 2012.
- AÑES, G.; RIOS, M. Dengue in the United States of America: A Worsening Scenario? **BioMed Research International**, v. 2013, p.13. 2013.
- AQUINO, V.H.; AMARILLA, A.A.; ALFONSO, H.L.; BATISTA, W.C.; FIGUEIREDO, L.T.M. New genotype of dengue type 3 virus circulating in Brazil and Colombia showed a close relationship to old Asian viruses. **PlosOne**, v. 4, n. 10, p. 1-8, out. 2009.
- ARAÚJO, J.M.G. de; BELLO, G.; ROMERO, H.; NOGUEIRA, R.M.R. Origin and Evolution of *Dengue virus* type 3 in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1-10, set. 2012.
- ARAÚJO, F.M. de C.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G. de; RAMALHO, I.L.C.; RORIZ, M.L.F. de 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, n. 8, p. 925-928, dez. 2006.
- AZIN, F.R.F.G.; GONÇALVES, R.P.; PITOMBEIRA, M.H.S.; LIMA, D.M.; BRANCO, I.C. Dengue: profile of hematological and biochemical dynamics. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.34, n.1, p. 36-41. 2012.
- BARGERON, K.; HSIAO, H.; NOISAKRAN, S. Role of Microparticles in *Dengue virus* infection and its impact on medical. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 85, p. 3-8, 2012.
- BARROS, L. P. S.; IGAWA, S.E.S.; JOCUNDO, S. Y.; BRITO JUNIOR, L. C. Análise crítica dos achados hematológicos e sorológicos de pacientes com suspeita de Dengue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 363 - 366, 2008.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 196, p. 80-83. 1991.

- BISORDI, I.; ROCCO, I.M.; SUZUKI, A.; KATZ, G.; SILVEIRA, V.R.; MAEDA, A.; SOUZA, R.P.de; BASSI, M.G.; DEL TEDESCO, E.F.; FREITAS, R.; BESSA, T.A.F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection for diagnosis in public health laboratories, São Paulo State, 2009. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.53, n.6, p. 315-320, nov-dez. 2011.
- BLACKSELL, S.D.; JARMAN, R.G.; BAILEY, M.S.; TANGANUCHITCHARNCHAI, A.; JENJAROEN, K.; GIBBONS, R.V.; PARIS, D.H.; PREMARATNA, R.; SILVA, H.J.; LALLOO, D.G.; DAY, N.P.J. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 12, p. 2095–2101, dez. 2011.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, mar. 1990.
- BORBA, L.; STROTTMANN, D.M.; NORONHA, L. de; MASON, P.W.; SANTOS, C.N.D. dos. Synergistic interactions between the NS3 (hel) and E proteins contribute to the virulence of dengue virus type 1. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, p. 1-12, abr. 2012.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 22, p. 113 - 118. 2007.
- BRONZONI, R.V. de M.; BALEOTTI, F.G.; NOGUEIRA, R.M.R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L.T.M. Duplex Reverse Transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of Brazilian Alphavi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.2, p. 696-702. 2005.
- BUCHY, P.; PEELING, R. Laboratory diagnosis and diagnostic tests. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. New ed. Geneva, 2009, cap. 4, p. 91-106.
- BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In.: FIELDS, B.N.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E.; KNIPE, D.M. **Virology**. 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001, cap. 33. p. 852- 922.
- CAMPOS, M.; SPENASSATTO, C.; MACORIS, M. de L. da G.; PADUAN, K. dos S.; PINTO, J.; RIBOLLA, P.E. Seasonal population dynamics and the genetic structure of the mosquito vector *Aedes aegypti* in São Paulo, Brazil. **Ecology and evolution**, v. 2, n. 11, p. 2794-2802, nov. 2012.
- CASTRO, M.G. de; NOGUEIRA, F.B. de; NOGUEIRA, R.M.R.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SANTOS, F.B. dos. Genetic variation in the 3' untranslated region of *Dengue virus* serotype 3 strains isolated from mosquitoes and humans in Brazil. **Virology Journal**, v. 10, n. 3, p. 1-11, 2013.
- CHAMBERS, T. J.; RICE, C. M.; HAHN, C. S. *Flavivirus* genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews Microbiology**, v. 44, p. 649 - 688, 1990.
- CHAN, M.; JOHANSSON, M. A. The Incubation Periods of Dengue Viruses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-7, nov. 2012.

CHEN, C.-F.; SHU, P.-Y.; TENG, H.-J.; SU, C.-L.; WU, J.-W.; WANG, J.-H.; LIN, T.-H.; HUANG, J.-H.; WU, H.-S. 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**, v. 10, n. 10, p. 1017-1025. 2010.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue--quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562-1608, out. 2011.

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, dez. 2006.

COHEN, S.N.; HALSTEAD, S.B. Shock associated with dengue infection. **Tropical pediatrics**, v. 68, n. 3, p. 448-456. 1966.

CORDEIRO, J.D.S. **Caracterização molecular e análise filogenética dos vírus dengue circulantes na cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil**. 2010. 59 folhas. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva)- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Ministério da Ciência e Tecnologia, Manaus, 2010.

CRUZ, A. C. R.; CRUZ, A.C.R.; GALLER, R.; SILVA, E.V.P. da; SILVA, M. de O. e; CARNEIRO, A.R.; ROSA, E.S.T. da; VASCONCELOS, H.B.; SÁ, E.L.R. de; VASCONCELOS, P.F. da C. Molecular epidemiology of *Dengue virus* serotypes 2 and 3 isolated in Brazil from 1991 to 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 3, p. 25-34, set. 2010.

CUNHA, R.V. da; CUNHA, R.V. da; MASPERO, R.C.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ARAÚJO, E.S. de; LUZ, D. da C.; NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue infection in Paracambi, State of Rio de Janeiro, 1990-1995. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 379-83, 1997.

DATASUS. **Ministério da Saúde**. Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net. Disponível em: <dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. Acesso em: 20 dez. 2013.

DEEN, J.; LUM, L.; MARTINEZ, E.; TAN, L.H. Clinical management and delivery of clinical services. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. New ed. Geneva, 2009, cap. 3, p. 25-58.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE INFRAESTRUTURA DE TRANSPORTES. **Ministério dos Transportes**. Disponível em: <www.dnit.gov.br>. Acesso em: 01 mar. 2013.

DRUMOND, B.P.; 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. 2061-2073, 2012a.

DRUMOND, B.P.; MONDINI, A.; SCHMIDT, D.J.; BRONZONI, R.V. DE 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**, in press. 2012b.

DUONG, V.; LY, S.; TRY, P.L.; TUISKUNEN, A.; ONG, S.; CHROEUNG, N.; LUNDKVIST, A.; LEPARC-GOFFART, I.; DEUBEL, V.; VONG, S.; BUCHY, P. Clinical and virological factors

influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. **Plos One**, v.5; n.7, jul. 2011.

FAILACE, R. **Hemograma-manual de interpretação**. 4. ed: Artmed, 2003.

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n.2, p. 224-229, mar-abr. 2007.

FIGUEIREDO, M. L. G. de; GOMES, A. de C.; MARILLA, A.A; LEANDRO, A. de S.; ORRICO, A. de S.; ARAUJO, R.F. de;CASTRO, J. do S.M.; DURIGON, E.L.; AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L.T.M. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virology Journal**, v. 7, n. 152, p. 1-5, jan. 2010.

FIGUEIREDO, R.M.P. de; NAVECA, F.G.; BASTOS, M. de S.; MELO, M. do N.; VIANA, S. de 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, abr. 2008.

GAMAKARANAGE, C.; RODRIGO, C.; SAMARAWICKRAMA, S.; WIJAYARATNE, D.; JAYAWARDANE, M.; KARUNANAYAKE, P.; JAYASINGHE, S. Dengue hemorrhagic fever and severe thrombocytopenia in a patient on mandatory anticoagulation; balancing two life threatening conditions; a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 1-4, jan. 2012.

GEBHARD, L.G.; FILOMATORI, C.V; GAMARNIK, A.V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1739-56, set. 2011.

GORZONI, M.L.; MASSAIA, I.F.D.S.; PIRES, S.L. Dengue in an elderly patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 3, maio/jun. 2010.

GOTO, K.; HATAKEYAMA, S.; OKAMOTO, K.; KITAZAWA, T.; ABE, K.; MORIYA, K.; KOIKE, K.; YOTSUYANAGI, H. Dengue Hemorrhagic Fever in an adult traveler returning to Japan. **Internal Medicine**, v. 51, n. 13, p. 1779-1782, 2012.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever Dengue. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUEDES, D.R.D.; CORDEIRO, M.T.; MELO-SANTOS, M.A.V.; MAGALHÃES, T.; MARQUES, E.; REGIS, L.; FURTADO, A.F.; AYRES, F.J. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, p. 67–75, jun. 2010.

GUY, B.; ALMOND, J. W. Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 31, n. 2-3, p. 239-52, mar. 2008.

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 global threat. **Nature reviews - Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 7-16, dez. 2010.

HALSEY, E.S.; MARKS, M.; GOTUZZO, E.; FIESTAS, V.; SUAREZ, L.; VARGAS, J.; AGUAYO, N.; MADRID, C.; VIMOS, C.; KOCHHEL, T.J.; LAGUNA-TORRES, V.A. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, p.1-10, maio. 2012.

HALSTEAD, S.B.; NIMMANNITYA, S.; YAMARAT, C.; RUSSELL, P. K. Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. **Japanese journal of medical science & biology**, v. 20, p. 96-103, dez. 1967.

HALSTEAD, S.B.; UDOMSAKDI, S.; SIMASTHIEN, P.; SINGHARAJ, P.; SUKHAVACHANA, P.; NISALAK, A. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. 1. Experience with classification of dengue viruses. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 42, p. 261-275, abr. 1970.

HALSTEAD, S.B. Dengue haemorrhagic fever-a public health problem and a field for research. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 1, p. 1-21, jan. 1980.

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

HU, D.; DING, B.D.X.; WANG, Y.; CHEN, Y.; PAN, Y.; WEN, K.; WANG, M.; CHE, X. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. **Virology Journal**, v.8; n.47. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão**. IBGE Cidades @. Minas Gerais. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 19 mar. 2013

JARMAN, R.G.; NISALAK, A.; ANDERSON, K.B.; KLUNGTHONG, C.; THAISOMBOONSUK, B.; KANEECHIT, W.; KALAYANAROOJ, S.; GIBBONS, R.V. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 218-23, fev. 2011.

JOSHI, V.; MOURYA, D.T.; SHARMA, R.C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 2, p. 158-61, ago. 2002.

JUNJHON, J.; LAUSUMPAO, M.; SUPASA, S.; NOISAKRAN, S.; SONGJAENG, A.; SARAITHONG, P.; CHAICHOUN, K.; UTAIPAT, U.; KEELAPANG, P.; KANJANAHALUETHAI, A.; PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; MALASIT, P.; SITTISOMBUT, N. Differential modulation of prM cleavage, extracellular particle distribution, and virus infectivity by conserved residues at nonfurin consensus positions of the dengue virus pr-M junction. **Journal of virology**, v. 82, n. 21, p. 10776-91, nov. 2008.

KARIM, N.; MUNSHI, S.U.; ANWAR, N.; ALAM, S. Climatic factors influencing dengue cases in Dhaka city: a model for dengue prediction. **Indian Journal of Medical Research**, v. 136, p. 32-39, jul. 2012.

KHAN, E.; HASAN, R.; MEHRAJ, J.; MAHMOOD, S. Genetic diversity of *Dengue virus* and associated clinical severity during periodic epidemics in South East Asia. **Current Topics in Tropical Medicine**, mar. 2012.

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, n. 3, p. 545-51, mar. 1992.

- LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.M.; SALAS, R.; CHACON, I.V. de; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. *Dengue virus* structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, jun. 1999.
- LINDENBACH, B.D; RICE, C.M. In.: FIELDS, B.N.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E.; KNIPE, D.M. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: **Virology**. 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001, cap. 32. p. 810-851.
- LIMA; J.R.C.; ROUQUAYROL, M.Z.; CALLADO, M.R.M.; GUEDES, M.I.F.; PESSOA, C. Interpretation of the presence of IgM and IgG antibodies in a rapid test for dengue : analysis of dengue antibody prevalence in Fortaleza City in the 20 th year of the epidemic. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 163-167, 2012.
- MACIEL, I.J.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.B.; MARTELLI, C.M.T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 111-130, maio-jun. 2008.
- MAHONEY, R.T; FRANCIS, D.P.; FRAZATTI-GALLINA, N.M.; PRECIOSO, A.R.; RAW, I. WATLER, P.; WHITEHEAD, P.; WHITEHEAD, S.S. Cost of production of live attenuated dengue vaccines: A case study of the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. **Vaccine**, p.1-5, 2012.
- MALAVIGE, G.N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D.J.; SENEVIRATNE, S. L. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 948, p. 588-601, out. 2004.
- MALAVIGE, G. N.; HUANG, L.C.; SALIMI, M.; GOMES, L.; JAYARATNE, S. D.; OGG, G.S. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-9, nov. 2012.
- MARTINA, B.E.E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A.D.M.E. *Dengue virus* pathogenesis: an integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-81, out. 2009.
- MEDINA, F.; MEDINA, J.F.; COLÓN, C.; VERGNE, E.; SANTIAGO, G.A.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L. Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. In:_. **Current protocols in microbiology**, Novembro, 2012. cap.15, p. 2.1- 2.24.
- MEDLOCK, J.M. ; HANSFORD, K.M.; SCHAFFNER, F.; VERSTEIRT, V.; HENDRICKX, G.; ZELLER, H.; VAN BORTEL, W. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 12, n. 6, p. 435-47, jun. 2012.
- MELO, F. L. de; ROMANO, C. M.; ZANOTTO, P. M. de A. Introduction of *Dengue virus* 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n.4, p. 1-3, abr. 2009.
- MELO, W. A. O papel do diagnóstico laboratorial da influenza. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.1, p. 191-193. 2010.
- MENDEZ, J.A.; USME-CIRO, J.A.; DOMINGO, C.; REY, G.J.; SANCHEZ, J.A.; TENORIO, A; GALLEGU-GOMEZ, J.C. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. **Virology Journal**, v. 7, n. 226, p. 1-12, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Mapa da dengue aponta 157 municípios em situação de risco e 525 em alerta. Disponível em:< <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/7716->>. Acesso em 05 jan. 2014.

MURRELL, S.; WU, S.-C.; BUTLER, M. Review of *Dengue virus* and the development of a vaccine. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 2, p. 239-47, 2011.

NATHAN, M. B.; DAYAL-DRAGER, R. GUZMAN, M. Epidemiology, burden of disease and transmission. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. New ed., Geneva, 2009. cap. 1, p. 3-17.

NEERAJA, M.; LAKSHMI, V.; DASH, P.K.; PARIDA, M.M.; RAO, P.V.L. The clinical, serological and the molecular diagnosis of the emerging dengue infection. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, n.3, p. 457-461, mar. 2013.

NOGUEIRA, M.B.; STELLA, V.; BORDIGNON, J.; BATISTA, W.C.;BORBA, L. de; SILVA, L.H.P. da; HOFFMANN, F.G.; PROBST, C.M.; SANTOS, C.N.D. dos. Evidence for the co-circulation of *Dengue virus* type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 483-488, ago. 2008.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; SOUZA, R. W.; ZAGNE, S. M. O.; SCHATZMAYR; H. G. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiology and Infection**, v. 111, p. 163-170. 1993.

NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; FILIPPIS, A.M.B. de; SANTOS, F.B. dos; CUNHA, R.V. da; COELHO, J.O.; SOUZA, L.J. de; GUIMARÃES, F.R.; ARAÚJO, E.S.M. de; SIMONE, T.S. de; BARAN, M.; TEIXEIRA JÚNIOR, G.; MIAGOSTOVICH, M.P. *Dengue virus* Type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, set. 2005.

OCHIENG, C.; LUTOMIAH, J.; MAKIO, A.; KOKA, H.; CHEPKORIR, E.; YALWALA, S.; MUTISYA, J.; MUSILA, L.; KHAMADI, S.; RICHARDSON, J.; BAST, J.; SCHNABEL, D.; WURAPA, E.; SANG, R. Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007 - 2012. **Virology Journal**, v. 10, n. 140. 2013.

PAULA, S. O. de; FONSECA, B. A. L. da. Dengue : A review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

PESSANHA, J.E.M.; CAIAFFA, W.T.; KROON, E.G.; PROIETTI, F.A. Dengue em três distritos sanitários de Belo Horizonte , Brasil : inquérito soropidemiológico de base populacional, 2006 a 2007. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 27, n. 4, p. 252-258, 2010.

PINHEIRO, V.C.S.; TADEI, W.P.; BARROS, P.M.S.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; CRUZ, A.C.R. Detection of *Dengue virus* serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 833-9, dez. 2005.

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil : aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

PREFEITURA DE JUIZ DE FORA. Informações da cidade. **Mapas de Juiz de Fora**. Disponível em: <<http://www.pjf.mg.gov.br/cidade/mapas/mapas.php>>. Acesso em: março 2012.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Treatment of dengue fever. **Infection and drug resistance**, v. 5, p. 103-112, jan. 2012.

REITER, P. Yellow fever and dengue: a threat to Europe? **Eurosurveillance**, v.15, n.10, mar. 2010.

RICO-HESSE, R. Molecular Evolution and Distribution of Dengue Viruses Type 1 and 2 in Nature. **Virology**, n. 174, p.479-493, 1990.

ROMANOS, M.T.V. Febre amarela e dengue. In: SANTOS, N.S. de O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, cap. 13, p. 399-409.

SABCHAREON, A.; SIRIVICHAYAKUL, C.; LIMKITTIKUL, K.; CHANTHAVANICH, P.; SUVANNADABBA, S.; JIWARIYAVEJ, V.; DULYACHAI, W.; PENGSA, K.; MARGOLIS, H.S.; LETSON, G.W. Dengue infection in children in ratchaburi, Thailand: a cohort study. I. Epidemiology of symptomatic acute dengue infection in children, 2006-2009. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 7, p. 1-8, jul. 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 3ª ed: Cold Spring Harbor, 2001.

SAMUEL, P. P.; TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 5, p. 615-28, maio. 2006.

SCIENCE. Centers for Disease Prevention and Control - First new *Dengue virus* type in 50 years. Disponível em: < <http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Informe Epidemiológico - Dengue 27.12.2013. Disponível em: < <http://www.saude.mg.gov.br/servidor/banco-de-noticias/story/5460-informe-epidemiologico-dengue-27-12-2013>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Balanço da dengue/ Semana epidemiológica 36 de 2013. Disponível em: <www1.saude.ba.gov.br/dengue/situacao_epidemia_brasil.ppt>. Acesso em 10 jan. 2014.

SILVA, E.F.; SILVA, E.F.; ORSI, M.; ANDRADE, A.L.; DOMINGUES, R.Z.; SILVA, B.M.; ARAÚJO, H.R.C. de; PIMENTA, P.F.P.; DIAMOND, M.; ROCHA, E.S.O.; KROON, E.G.; MALAQUIAS, L.C.C; COELHO, L.F.L. A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, p. 13, jan. 2012.

SIMMONS, C.P.; FARRAR, J.; CHAU, N.V.V.; WILLS, B. Dengue -Current concepts. **The New England and Journal of Medicine**, v.366, p.1423-32. 2012.

SMIT, J. M.; MOESKER, B.; RODENHUIS-ZYBERT, I.; WILSCHUT, J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160-71, fev. 2011.

SOUZA, R.P. de; ROCCO, I.M.; MAEDA, A.Y.; SPENASSATTO, C.; BISORDI, I.; SUZUKI, A.; SILVEIRA, V.R.; SILVA, S.J.S.; AZEVEDO, R.M.; TOLENTINO, F.M.; ASSIS, J.C.; BASSI, M.G.; DAMBRO, B.P.; TUMIOTO, G.L.; GREGIANINI, T.S.; SOUZA, L.T.M.; TIMENETSKY, M. do C.S.T.; SANTOS, C.L.S. *Dengue virus* Type 4 Phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the Veil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n.12, p. 1-7, dez. 2011.

SOUZA, S. S. de; SILVA, I.G. da; SILVA, H.H.G da. Association between dengue incidence , rainfall and larval density of *Aedes aegypti*, in the State of Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 152-155, 2010.

TEIXEIRA, M. da G.; BARRETO, M.L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33. 1999.

TRICOU, V.; MINH, N.N.; FARRAR, J.; TRAN, H.T.; SIMMONS, C.P. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n.9, set. 2011.

VASCONCELOS, P.F. C.; ROSA, A.P.A.T.; PINHEIRO, F.P.; ROSA, J.F.S.T. Arboviroses. In.: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 4ª ed. Atheneu, 2009, cap 9, 339-351.

VASILAKIS, N.; CARDOSA, J.; HANLEY, K. A.; HOLMES, E.C.; WEAVER, S.C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Natural Reviews Microbiology**, v.9, n.7, p. 532-541, 2012.

VAUGHN, D.W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B.L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T.P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A. Dengue viremia titer, antibody response pattern and virus serotype correlate with disease severity. **The journal of infectious diseases**, v. 181, n. 1, p. 2-9, 2000.

VILELA, A.P.; FIGUEIREDO, L.B.; SANTOS, J.R. dos; EIRAS, A.E.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.; KROON, E.G. *Dengue virus* 3 genotype I in mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n.6, jun. 2010.

VIRAL ZONE - Swiss Institute of Bioinformatics. Flavivirus. Disponível em:< http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/24.html>. Acesso em 15 jan. 2014

WEAVER, S.; 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, n.4, p. 523-540, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue, countries or areas at risk, 2011. Geneva: 2012. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png>. Acesso em 20 Jan. 2014

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O menor, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Detecção, caracterização molecular e filogenia de Dengue vírus circulantes em Juiz de Fora - MG”. Neste estudo pretendemos estudar quais os vírus da dengue estão circulando em Juiz de Fora-MG.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é que já foi demonstrado que existem quatro tipos de vírus da Dengue, 1, 2, 3 e 4. Estes vírus podem causar a Dengue clássica (febre do Dengue) e quadros mais graves da dengue, como a Febre hemorrágica do Dengue. Assim, ao fazermos uma pesquisa para estudar os vírus da dengue que estão causando doença nas pessoas em Juiz de Fora, podemos, no futuro, auxiliar no tratamento dos pacientes e ajudar a estabelecer medidas de controle, prevenindo o acontecimento de novas epidemias (surto de dengue) na Região de Juiz de Fora-MG.

Para este estudo adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): os pacientes com quadro clínico suspeito de dengue, admitidos na Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora, após exame clínico pela equipe deste hospital, responderão a um breve questionário e terão uma amostra de sangue coletada. A coleta de sangue será feita pela equipe da Santa Casa. Esta amostra de sangue será usada para obtenção de 0,5 a 1,0 mL de soro que será enviado ao Laboratório de Virologia da UFJF e usado nesta pesquisa. Esta amostra de soro será usada para fazer o estudo de vírus (obtenção e caracterização do vírus da dengue ou outros vírus que podem causar doenças parecidas com a dengue).

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar sua autorização ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não trará qualquer prejuízo ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade (nome e documento de identidade) com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este estudo apresenta risco mínimo, isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras como conversar, tomar banho, ler, etc. Apesar disso, você tem assegurado o direito a acompanhamento médico hospitalar ou ambulatorial, se necessário, no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome o nome do menor ou o material que indique a participação do menor não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, e responsável pelo (a) menor _____ fui informado (a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em permitir que o menor, sob minha responsabilidade, participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, ____ de _____ de 20____ .

Assinatura do (a) participante

Assinatura do (a) pesquisador(a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:
CEP- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SANTA CASA E/OU DA UFJF

PESQUISADOR RESPONSÁVEL – SANTA CASA DE MISERICÓRDIA – DR. GUILHERME CORTES FERNANDES

PESQUISADORA RESPONSÁVEL UFJF : BETÂNIA PAIVA DRUMOND RUA JOSÉ KELMER, S/N -CAMPUS UNIVERSITÁRIO, BAIRRO SÃO PEDRO. INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA. LABORATÓRIO DE VIROLOGIA JUIZ DE FORA (MG) - CEP: CEP 36036-900.FONE: (32)2102 3213 / E-MAIL: BETANIA.DRUMOND@UFJF.EDU.BR

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DE MENOR DE IDADE

Você está sendo convidado(a), como voluntário(a), a participar da pesquisa “Detecção, caracterização molecular e filogenia de Dengue vírus circulantes em Juiz de Fora - MG”. Neste estudo pretendemos estudar quais os vírus da dengue estão circulando em Juiz de Fora-MG.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é que já foi demonstrado que existem quatro tipos de vírus da Dengue, 1, 2, 3 e 4. Estes vírus podem causar a Dengue clássica (febre do Dengue) e quadros mais graves da dengue, como a Febre hemorrágica do Dengue. Assim, ao fazermos uma pesquisa para estudar os vírus da dengue que estão causando doença nas pessoas em Juiz de Fora, podemos, no futuro, auxiliar no tratamento dos pacientes e ajudar a estabelecer medidas de controle, prevenindo o acontecimento de novas epidemias (surtos de dengue) na Região de Juiz de Fora-MG.

Para este estudo adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): os pacientes com quadro clínico suspeito de dengue, admitidos na Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora, após exame clínico pela equipe deste hospital, responderão a um breve questionário e terão uma amostra de sangue coletada. A coleta de sangue será feita pela equipe da Santa Casa. Esta amostra de sangue será usada para obtenção de 0,5 a 1,0 mL de soro que será enviado ao Laboratório de Virologia da UFJF e usado nesta pesquisa. Esta amostra de soro será usada para fazer o estudo de vírus (obtenção e caracterização do vírus da dengue ou outros vírus que podem causar doenças parecidas com a dengue).

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar sua autorização ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não trará qualquer prejuízo ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade (nome e documento de identidade) com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este estudo apresenta risco mínimo, isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras como conversar, tomar banho, ler, etc. Apesar disso, você tem assegurado o direito a acompanhamento médico hospitalar ou ambulatorial, se necessário, no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, fui informado (a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, ____ de _____ de 20 ____ .

Assinatura do (a) participante

Assinatura do (a) pesquisador (a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:
CEP- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SANTA CASA E/OU DA UFJF

PESQUISADOR RESPONSÁVEL – SANTA CASA DE MISERICÓRDIA – DR. GUILHERME CORTES FERNANDES

PESQUISADORA RESPONSÁVEL UFJF : BETÂNIA PAIVA DRUMOND RUA JOSÉ KELMER, S/N -CAMPUS UNIVERSITÁRIO, BAIRO SÃO PEDRO. INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA. LABORATÓRIO DE VIROLOGIAJUÍZ DE FORA (MG) - CEP: CEP 36036-900.FONE: (32)2102 3213 / E-MAIL: BETANIA.DRUMOND@UFJF.EDU.BR

APÊNDICE C - RELAÇÃO DE TODAS AS AMOSTRAS CLÍNICAS DESTE ESTUDO COM AS INFORMAÇÕES PRESENTES NAS FICHAS DOS PACIENTES E COM OS TESTES REALIZADOS.

Ano	Amostra (paciente)	PCR	NS1	IgM	IgG	Dias de febre	Hematócrito	Leucometria global	Contagem de plaquetas
2011	01	-	NR*	-	-	ND*	Inferior	Normal	Inferior
	02	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
2012	03	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	04	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	05	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	06	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	07	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	08	DENV-2	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	09	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	10	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	11	DENV-1	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	12	-	NR*	+	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	13	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	14	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	15	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
2013	16	-	NR*	-	+	ND*	Normal	Normal	Normal
	17	-	NR*	-	-	7	Inferior	Normal	< 100.000
	18	-	NR*	+	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	19	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	20	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Inferior	Normal
	21	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	22	-	-	ND*	ND*	2	ND*	ND*	ND*
	23	-	-	ND*	ND*	5	ND*	ND*	ND*
	24	DENV-2	+	ND*	ND*	5	ND*	ND*	ND*

Nota: ND*: Não disponível; NR*: Não realizado; -: Negativo; +: Positivo

Ano	Amostra (paciente)	PCR	NS1	IgM	IgG	Dias de febre	Hematócrito	Leucometria global	Contagem de plaquetas
2013	25	-	-	ND*	ND*	2	Inferior	Inferior	Inferior
	26	DENV-2	NR*	-	-	ND*	Normal	Inferior	Normal
	27	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	28	-	NR*	+	+	ND*	Normal	Normal	< 100.000
	29	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	30	-	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	31	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Inferior
	32	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	33	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	34	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	35	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	36	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	37	-	NR*	+	+	ND*	Normal	Normal	Normal
	38	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	39	NR*	NR*	+	-	ND*	Inferior	Normal	Normal
	40	-	NR*	+	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	41	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	42	-	+	ND*	ND*	2	Normal	Normal	Normal
	43	-	-	ND*	ND*	2	Normal	Inferior	Normal
	44	-	-	ND*	ND*	5	Inferior	Normal	Inferior
	45	-	+	+	ND*	2	Normal	Normal	< 100.000
	46	-	NR*	-	ND*	6	Normal	Normal	Normal
	47	-	-	-	ND*	1	Inferior	Normal	Normal
	48	-	NR*	+	ND*	1	Normal	Inferior	Normal
	49	-	NR*	-	ND*	6	Normal	Normal	Normal
	50	-	NR*	-	ND*	10	Inferior	Normal	Normal

Nota: ND*: Não disponível; NR*: Não realizado; -: Negativo; +: Positivo

Ano	Amostra (paciente)	PCR	NS1	IgM	IgG	Dias de febre	Hematócrito	Leucometria global	Contagem de plaquetas
2013	51	-	-	-	ND*	1	Normal	Normal	Normal
	52	-	-	-	ND*	5	Normal	Normal	Normal
	53	DENV-2	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	54	DENV-2	-	-	-	2	Inferior	Normal	< 100.000
	55	-	-	+	ND*	6	Normal	Normal	Normal
	56	-	NR*	+	ND*	ND*	Normal	Inferior	Normal
	57	-	-	+	-	2	Inferior	Normal	Normal
	58	-	-	+	ND*	3	Inferior	Normal	Inferior
	59	-	-	-	ND*	3	Normal	Normal	Normal
	60	-	-	+	ND*	3	Normal	Inferior	Normal
	61	-	-	ND*	ND*	3	Normal	Normal	Normal
	62	-	NR*	-	ND*	11	Inferior	Normal	Inferior
	63	-	+	+	ND*	6	Normal	Normal	< 100.000
	64	-	-	ND*	ND*	5	Inferior	Normal	Normal
	65	-	-	-	ND*	4	Normal	Normal	Normal
	66	-	-	+	ND*	6	Normal	Normal	Normal
	67	-	-	+	ND*	5	Normal	Inferior	Normal
	68	-	-	-	ND*	6	Normal	Normal	Normal
	69	-	+	+	ND*	5	Inferior	Normal	< 100.000
	70	-	NR*	+	ND*	7	Normal	Normal	< 100.000
	71	-	NR*	+	ND*	7	Normal	Inferior	Normal
	72	-	-	-	ND*	2	Normal	Normal	Normal
	73	-	-	+	ND*	3	Normal	Normal	Inferior
	74	-	NR*	+	ND*	7	Normal	Normal	Normal
	75	-	+	+	ND*	5	Normal	Inferior	Normal
	76	-	-	+	ND*	4	Normal	Inferior	Normal

Nota: ND*: Não disponível; NR*: Não realizado; -: Negativo; +: Positivo

Ano	Amostra (paciente)	PCR	NS1	IgM	IgG	Dias de febre	Hematócrito	Leucometria global	Contagem de plaquetas
2013	77	-	-	-	ND*	3	Normal	Normal	Normal
	78	-	-	+	ND*	6	Inferior	Inferior	Normal
	79	-	-	+	ND*	6	Normal	Inferior	Normal
	80	-	+	+	ND*	5	Normal	Inferior	Normal
	81	-	-	+	ND*	6	Normal	Inferior	< 100.000
	82	-	+	+	ND*	4	Normal	Inferior	Inferior
	83	-	-	+	ND*	5	Normal	Normal	Inferior
	84	-	-	+	ND*	6	Normal	Normal	Normal
	85	-	-	ND*	ND*	2	Normal	Superior	Normal
	86	-	-	+	ND*	5	Normal	Normal	Normal
	87	-	-	ND*	ND*	1	Normal	Normal	Normal
	88	-	-	ND*	ND*	1	Normal	Normal	Normal
	89	-	-	-	ND*	2	Normal	Normal	Normal
	90	-	-	ND*	ND*	1	Normal	Normal	Normal
	91	-	-	-	ND*	2	Normal	Normal	Normal
	92	-	-	-	ND*	3	Normal	Normal	Normal
	93	-	-	+	ND*	4	Normal	Inferior	Normal
	94	-	+	+	ND*	6	Normal	Inferior	Inferior
	95	-	+	-	ND*	6	Normal	Normal	Normal
	96	-	-	ND*	ND*	3	Normal	Superior	Normal
	97	-	-	ND*	ND*	4	Normal	Inferior	Normal
	98	-	NR*	+	ND*	7	Normal	Inferior	Normal
	99	-	-	-	ND*	6	Normal	Normal	Normal
	100	-	NR*	-	-	ND*	Inferior	Normal	Normal
101	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Inferior	Normal	
102	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*	
103	-	NR*	+	+	ND*	Inferior	Inferior	Inferior	

Nota: ND*: Não disponível; NR*: Não realizado; -: Negativo; +: Positivo

Ano	Amostra (paciente)	PCR	NS1	IgM	IgG	Dias de febre	Hematócrito	Leucometria global	Contagem de plaquetas
2013	104	-	NR*	-	+	ND*	Normal	Normal	Normal
	105	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	106	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	107	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	108	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	109	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	110	NR*	NR*	-	-	ND*	Inferior	Normal	Normal
	111	NR*	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	112	-	NR*	-	ND*	ND*	Normal	Normal	Normal
	113	NR*	NR*	-	+	ND*	Normal	Normal	Normal
	114	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	115	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	116	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	117	NR*	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Inferior
	118	-	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	119	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	120	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	121	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	122	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	123	-	NR*	+	-	ND*	Normal	Inferior	Inferior
	124	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	125	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	126	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
127	-	NR*	+	+	ND*	Normal	Inferior	Normal	
128	-	NR*	+	+	ND*	Normal	Normal	Normal	
129	-	NR*	-	+	ND*	Normal	Normal	Inferior	
130	-	NR*	-	+	ND*	ND*	ND*	ND*	

Nota: ND*: Não disponível; NR*: Não realizado; -: Negativo; +: Positivo

Ano	Amostra (paciente)	PCR	NS1	IgM	IgG	Dias de febre	Hematócrito	Leucometria global	Contagem de plaquetas
2013	131	-	NR*	+	+	ND*	Normal	Inferior	Inferior
	132	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Inferior	Normal
	133	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Inferior	Normal
	134	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	135	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	136	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	137	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	138	-	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	139	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	140	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	141	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	142	-	NR*	+	+	ND*	Normal	Inferior	Normal
	143	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	144	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	145	-	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	146	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
	147	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	148	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	149	NR*	NR*	-	+	ND*	Normal	Normal	Normal
	150	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
151	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal	
152	-	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*	
153	-	NR*	+	-	ND*	ND*	ND*	ND*	
154	-	NR*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	
155	-	NR*	-	+	ND*	ND*	ND*	ND*	
156	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal	
157	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Inferior	Normal	

Nota: ND*: Não disponível; NR*: Não realizado; -: Negativo; +: Positivo

Ano	Amostra (paciente)	PCR	NS1	IgM	IgG	Dias de febre	Hematócrito	Leucometria global	Contagem de plaquetas
2013	158	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	159	-	+	+	ND*	1	Normal	Normal	Inferior
	160	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	162	-	NR*	-	-	ND*	Normal	Normal	Normal
	163	-	-	+	ND*	2	Normal	Normal	Normal
	164	-	-	-	ND*	3	Inferior	Inferior	Normal
	165	-	-	ND*	ND*	2	Normal	Normal	Normal
	166	-	-	ND*	ND*	2	Normal	Normal	Normal
	167	NR*	NR*	+	ND*	3	Normal	Inferior	Normal
	168	NR*	NR*	+	ND*	9	Normal	Inferior	Normal
	169	NR*	-	-	ND*	5	Normal	Normal	Normal
	170	-	NR*	+	ND*	8	Normal	Normal	Normal
	171	NR*	-	ND*	ND*	1	Normal	Normal	Normal
	172	NR*	-	ND*	ND*	2	Normal	Normal	Normal
	173	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
	174	-	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	175	-	NR*	+	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	176	-	NR*	-	+	ND*	ND*	ND*	ND*
	177	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*
178	NR*	NR*	-	+	ND*	ND*	ND*	ND*	
179	-	NR*	-	-	ND*	ND*	ND*	ND*	

Nota: ND*: Não disponível; NR*: Não realizado; -: Negativo; +: Positivo

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFJF



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUÍZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
AV. PÁDUA DE CARVALHO, 400 - JUF - BRASIL

Parecer nº 352/2010

Protocolo CEP-UFJF: 2256.316.2010 **FR:** 386158 **CAAE:** 0207.0.180.000-10

Projeto de Pesquisa: Detecção, caracterização molecular e filogenia de Dengue vírus circulantes em Juiz de Fora - MG

Área Temática: Grupo III

Pesquisador Responsável: Betânia Paiva Drumond

Data prevista para o término da pesquisa: março de 2013

Instituição colaboradora/sediadora: Universidade Federal de Juiz de Fora

Análise do protocolo:

Itens Avaliados		Sim	Não	P	NA	
Justificativa	O estudo proposto apresenta pertinência e valor científico	X				
	Objeto de estudo está bem delimitado	X				
Objetivo(s)	Apresentam clareza e compatibilidade com a proposta	X				
Material e Métodos	Atende ao(s) objetivo(s) proposto(s)	X				
	Informa	Tipo de estudo	X			
		Procedimentos que serão utilizados	X			
		Número de participantes	X			
		Justificativa de participação em grupos vulneráveis				X
		Critérios de inclusão e exclusão	X			
		Recrutamento	X			
		Riscos ou desconfortos esperados		X		
		Coleta de dados	X			
		Tipo de análise	X			
		Cartilha Ética	X			
	Assegura o arquivamento do material coletado pelo período mínimo de cinco anos		X			
	Explicita como será o descarte do material coletado		X			
Revisão da literatura	Atual e sustentam o(s) objetivo(s) do estudo	X				
Resultados	Informa os possíveis impactos e benefícios	X				
Cronograma	Agenda as diversas etapas de pesquisa	X				
	Informa que a coleta de dados ocorrerá após aprovação do projeto pelo comitê	X				
Orçamento	Lista a relação detalhada dos custos da pesquisa	X				
	Apresenta o responsável pelo financiamento	X				
Referências	Segue uma normatização	X				
Instrumento de coleta de dados	Preserva o sujeito de constrangimento	X				
	Apresenta pertinência com o(s) objetivo(s) proposto(s).	X				
Termo de dispensa de TCLE	Solicita dispensa				X	
Termo de	Apresenta o termo em caso de participação de				X	



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36089-900 - JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

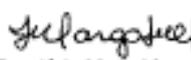
assentimento	menores					
TCLE	Está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito	X				
	Apresenta justificativa e objetivos	X				
	Descreve suficientemente os procedimentos	X				
	Apresenta campo para a identificação dos sujeitos	X				
	Informa que uma das vias do TCLE deverá ser entregue ao sujeito	X				
	Assegura liberdade do sujeito recusar ou retirar o consentimento sem penalidades	X				
	Garante sigilo e anonimato	X				
	Explícita	Riscos e desconfortos esperados		X		
		Ressarcimento de despesas	x			
		Indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa	x			
Pesquisador (es)	Forma de contato com o pesquisador	X				
	Forma de contato com o CEP	X				
	Apresentam titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa	X				
	Apresenta comprovante do Currículo Lattes do pesquisador principal e dos demais participantes.	X				
	Carta de Encaminhamento à Coordenação do CEP	X				
Documentos	Folha de Rosto preenchida	X				
	Projeto de pesquisa, redigido conforme Modelo de Apresentação de Projeto de Pesquisa padronizado pela Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ)	X				
	Resumo do projeto	X				
	Declaração de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável pelo setor/serviço onde será realizada a pesquisa	X				
	Um CD-ROM gravado contendo: Projeto de pesquisa, Resumo do projeto e TCLE.	X				

P= parcialmente

NA=Não se aplica

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Aprovado
Juiz de Fora, 16 de dezembro de 2010


Prof. Dra. Iêda Maria Vargas Dias
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI
DATA: 10 / 12 / 2010
ASS: <i>Iêda Maria Vargas Dias</i>

**AXENO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE JUIZ DE FORA**



SANTA CASA de MISERICÓRDIA DE JUIZ DE FORA

Fundada em 06 de agosto de 1854

Av. Barão do Rio Branco, 3335 – Passos - 36021-630 – Juiz de Fora – MG

Fone 0 xx 32 3229-2222

E-mail: santacasa@santacasajf.org.br

CNPJ: 21.575.709/0001-95

Inscrição Estadual: 367.727208.0087

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA

SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE JUIZ DE FORA

Protocolo CEP/UFJF: 2256.316.2010 **CAAE:** 0207.0.180.000-10 **FR:** 386158
PROJETO DE PESQUISA: “Detecção, caracterização molecular e filogenia da Dengue vírus
circulantes em Juiz de Fora - MG”
PESQUISADORA/COORDENADORA: Betânia Paiva Drumond
ÁREA TEMÁTICA: Grupo III
INSTITUIÇÃO COLABORADORA/SEDIADORA: Universidade Federal de Juiz de Fora

Recebemos o projeto de pesquisa descrito acima com os seguintes anexos:
Resumo do projeto, projeto original, termo de consentimento livre e esclarecido
carta de solicitação ao CEP UFJF da inclusão do Dr. Guilherme Cortes Fernandes
e da Santa Casa de Misericórdia como participantes do projeto, parecer de
aprovação da inclusão do Dr. Guilherme e da Santa Casa de Misericórdia de Juiz
de Fora.

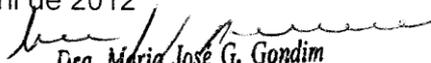
Parecer do CEP:

Em relação ao presente projeto de pesquisa, a pesquisadora apresentou novc
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (adulto e menor de idade).
constando linguagem mais acessível e alteração de parágrafo. Foi analisado por
este CEP e resultou em adequação.

Somos de parecer favorável ao estudo. O CEP requer que ao final do estudo
seja enviado um relatório.

Data da aprovação: 10 de abril de 2012

Assinatura da Coordenadora:


Dra. Maria José G. Gondim
COORDENADORA DO CEP/SCMJF