



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DENGUE NA BAHIA: DINÂMICA DE DISPERSÃO DO VÍRUS COM  
A INTRODUÇÃO DO SOROTIPO 3 (DENV-3) NO ESTADO**

**PAULO ROBERTO SANTANA DE MELO**

**Salvador - Bahia – Brasil**

**2005**

14.4(813.8)



001663

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**Dengue na Bahia: Dinâmica de dispersão do vírus com a  
introdução do sorotipo 3 (DENV-3) no Estado.**

**Paulo Roberto Santana de Melo  
Orientador: Mitermayer Galvão dos Reis**

Dissertação apresentada ao curso de  
Pós-graduação em Patologia, como parte  
dos requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia

2005



Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ – Salvador – Bahia.

M528 Melo, Paulo Roberto Santana de  
Dengue na Bahia: dinâmica de dispersão do vírus com a in-  
trodução do sorotipo 3 (DENV – 3) no Estado [ manuscrito ] / por  
Paulo Roberto Santana de Melo. – 2005.  
82f.: il. 29 cm.

Datilografado (fotocópia)  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Fa-  
culdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.  
Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório  
de Patologia e Biologia Molecular.

1. Epidemiologia. I. Título.

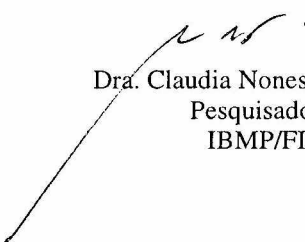
CDU 614.4

DENGUE NA BAHIA: DINÂMICA DE DISPERSÃO DO VÍRUS COM A INTRODUÇÃO DO SOROTIPO 3 (DENV 3) NO ESTADO

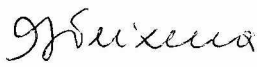
**PAULO ROBERTO SANTANA DE MELO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

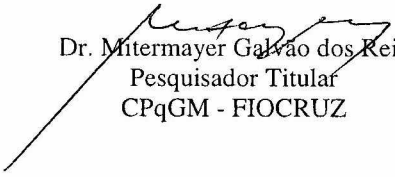
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Cláudia Nones Duarte dos Santos  
Pesquisadora Titular  
IBMP/FIOCRUZ



Dra. Maria da Glória Lima Cruz Teixeira  
Professora Adjunta  
Instituto de Saúde Coletiva - UFBA



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ



*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu: há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou; tempo de matar e tempo de curar; tempo de derribar e tempo de edificar; tempo de chorar e tempo de rir; tempo de prantear e tempo de saltar de alegria; tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar..”*

**Eclesiastes 3:1-5**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter permitido que eu alcançasse sonhos que inicialmente pareciam distantes;

À minha família por ter confiado e acreditado no que eu acho importante mesmo diante de todas as dificuldades;

Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pela orientação e pelas oportunidades oferecidas após o ingresso em seu laboratório;

Ao Dr. Ronald E. Blanton pelo incentivo, co-orientação e espírito investigador;

Aos amigos que sempre se alegraram com minhas conquistas apesar da distância de alguns;

Aos colegas do mestrado pela companhia nos primeiros momentos de dificuldades quando aqui cheguei;

Aos companheiros do LPBM com os quais divido além das bancadas alegrias e dificuldades do dia-a-dia;

Ao colegiado que em muitos momentos desse período foi uma extensão de minha família;

A todos do CPqGM que hoje considero como uma família que ganhei aqui em Salvador;

A FIOCRUZ e CNPq por concessão de financiamentos sem os quais seria impossível a realização deste trabalho;

E a todas as pessoas que em qualquer momento dessa jornada torceram por mim.

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de Tabelas e figuras.....</b>	<b>8</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>9</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>11</b>
<b>1.0 – Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 - Revisão da Literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.2 - O vírus da Dengue e sua Epidemiologia no mundo.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.3 - Aplicações e Implicações dos Métodos Disponíveis para o Diagnóstico da Dengue.....</b>	<b>26</b>
<b>1.1.3.1 - Diagnóstico Sorológico.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.3.2 - Detecção de Antígeno.....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.3.3 - Detecção do Genoma Viral.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.4 - Dinâmica do Vírus da Dengue no Brasil.....</b>	<b>31</b>
<b>1.1.5 - A Dengue como problema de Saúde Pública na Bahia.....</b>	<b>34</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>37</b>
<b>Racional e Relevância.....</b>	<b>38</b>
<b>Manuscrito.....</b>	<b>39</b>
<b>Discussão e Perspectivas.....</b>	<b>64</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>69</b>

## **Lista de Abreviaturas**

**DENV – vírus da dengue**

**DENV-1 – sorotipo 1**

**DENV-2 – sorotipo 2**

**DENV-3 – sorotipo 3**

**DENV-4 – sorotipo 4**

**DC – dengue clássica**

**FD – febre da dengue**

**FHD – febre hemorrágica da dengue**

**SCD – síndrome de choque da dengue**

**IIP – índice de infestação predial**

## **Lista de Tabelas e Figuras**

<b>Figura 1.0</b> – Tradução e processamento da poliproteína de flavivírus.....	<b>15</b>
<b>Figura 2.0</b> - Fatores de risco para FHD/SCD: Aspecto integrado.....	<b>18</b>
<b>Figura 3.0</b> - Casos reportados de FD/FHD pela OMS de 1992-2000.....	<b>19</b>
<b>Figura 4.0</b> - Distribuição global dos sorotipos do vírus da dengue.....	<b>20</b>
<b>Figura 5.0</b> - Distribuição Mundial da dengue em 2001.....	<b>21</b>
<b>Figura 6.0</b> - América Central.....	<b>24</b>
<b>Figura 7.0</b> - Imunofluorescência indireta em células C636 de <i>A. albopictus</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 8.0</b> - Introdução do DENV-1 e DENV-2 e dispersão destes no território brasileiro até 1994.....	<b>32</b>
<b>Figura. 9.0</b> – Mapa do Estado da Bahia com localização dos municípios de Ipujiara e Prado.....	<b>35</b>
<b>Figura. 10</b> – Casos notificados por mês entre 2001 e 2003.....	<b>36</b>
<b>Tabela 1.0</b> – Graus de intensidade de FHD segundo a OMS.....	<b>23</b>

## **Resumo**

**DENGUE NA BAHIA: DINÂMICA E DISPERSÃO DO VÍRUS COM A INTRODUÇÃO DO SOROTIPO 3 (DENV-3) NO ESTADO. PAULO ROBERTO SANTANA DE MELO.** O aparecimento de cada novo sorotipo do vírus da dengue no Brasil oferece uma oportunidade para entender como esta infecção é introduzida e subseqüentemente distribuída. Além do mais, este padrão tem implicação para disseminação de vírus similares em um país de tamanho continental. Finalmente, uma vez que o vetor possui hábitos peridomésticos, um novo sorotipo também modela a distribuição de outras infecções com um padrão de disseminação pessoa a pessoa em uma região com uma alta densidade vetorial. No final de 2001, o Brasil tinha somente sofrido epidemias com DENV-1 e DENV-2. Ambos estavam ativamente circulantes quando o DENV-3 foi introduzido em 2002, produzindo os primeiros casos de febre hemorrágica da dengue no estado da Bahia. Nós determinamos a prevalência e distribuição dos sorotipos do vírus no estado durante 2001, 2002 e 2003 baseados nos isolamentos virais do Laboratório Central do Estado (LACEN). Este laboratório é o centro de referência e processa todas as amostras de 30 diretorias regionais de saúde (DIRES). Em 2001, houve 169 isolamentos de DENV-1 e 53 de DENV-2. Em 2002, foram isolados 123 DENV-1, 50 DENV-2, além do aparecimento do DENV-3 (273 isolamentos). As freqüências relativas de isolamentos versus o tamanho da população e o número de amostras submetidas sugerem que estes isolamentos são reflexos da intensidade de sua circulação. Em janeiro de 2002, com DENV-1 e DENV-2 sendo isolados em todo o estado, 95% de todos os isolamentos de DENV-3 foram da capital, Salvador, e os 5% restantes foram de um município conurbado à mesma, onde se situa o aeroporto de Salvador indicando que este sorotipo pode possivelmente ter chegado por via

aérea. Em fevereiro, a infecção estava distribuída em cidades onde as três principais rodovias dão acesso. Em março, ocorreu uma fase de consolidação com o DENV-3 se estendendo em áreas entre as principais rotas terrestres, e em abril o número de isolamentos decaiu rapidamente. A distribuição do DENV-3 em 2002 foi distintamente diferente dos sorotipos circulantes na Bahia e reflete a introdução de um novo sorotipo no estado. Estes dados estão formando uma base para o desenvolvimento de modelos matemáticos com vistas a se prever a possível introdução do DENV-4 e para o efeito de diferentes intensidades de outros sorotipos circulando simultaneamente.

## **Abstract**

**DENGUE AT BAHIA: DYNAMICS OF DISPERSION OF VIRUS WITH THE INTRODUCTION OF SEROTYPE 3 (DENV-3) IN THE STATE. PAULO ROBERTO SANTANA DE MELO.** The appearance of each new dengue serotype in Brazil offers an opportunity to understand how this infection is introduced and subsequently distributed. Further, this pattern may have implications for the spread of other viruses in a continental sized country. Finally, since the vector is peridomestic, a new serotype also models the likely distribution of a new virus with person to person spread. At the end of 2001, Brazil had only experienced epidemics with DENV-1 and DENV-2. Both were actively circulating when DENV-3 was introduced in 2002, and produced the first cases of dengue hemorrhagic fever in the state of Bahia. We determined the prevalence and distribution of dengue serotypes circulating in this state during 2001, 2002 and 2003 based on viral isolations by the state's central laboratory. In 2001, there were 169 isolations of DENV-1 and 53 of DENV-2. In 2002, there were 123 DENV-1 isolates, 50 DENV-2, plus the new appearance of DENV-3 (273 isolates). The frequency of isolations relative to population size and number of samples submitted indicates that viral isolations here are reflective of the intensity of their circulation. In January 2002, with DENV-1 and DENV-2 being isolated throughout the state, 95% of all DENV-3 isolations were from the coastal state capital, Salvador, and the remaining 5% were from a nearby coastal district. This indicates that the infection could probably have arrived by air travel or less likely by sea. In February, the infection was distributed in districts where the 3 major highways run. In March, there was a consolidation phase with the infection reaching areas between the main routes, and by April the number of isolations quickly dissipated. The distribution of DENV-3 in 2002 was distinctly different from the others and



reflects the introduction of a new serotype. These data will form the basis of mathematical models for the anticipated introduction of DENV-4 and for the effect of different intensities of other simultaneously circulating serotypes.

## 1.0 - INTRODUÇÃO

A dengue é atualmente uma das arboviroses de maior importância para saúde pública global. Vários bilhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de infecção pelo vírus da dengue em diferentes países, que na sua maior parte estão situados em regiões tropicais ou subtropicais cujos centros urbanos sofrem da falta de condições adequadas de moradia e expansão urbana desordenada. O principal vetor implicado na transmissão desta virose é o mosquito *Aedes aegypti* que através de diversas campanhas já chegou a ser erradicado de boa parte do continente Americano, entretanto, hoje quase toda a América é infestada por este mosquito (FIGUEIREDO, 2000).

Estudos têm sido realizados a fim de se entender fatores epidemiológicos, genéticos (tanto do vírus quanto do hospedeiro) e ambientais os quais podem influenciar a ocorrência de epidemias com quadros graves da doença. Diversos países têm registrado casos graves de infecção pelo vírus da dengue conhecido como Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). A grande epidemia de Cuba, em 1981, foi um dos primeiros episódios de quadros graves de infecção pelo vírus da dengue nas Américas seguido por outros países como Venezuela e Brasil na ocorrência de quadros graves desta doença (PINHEIRO, 1998). Poucos trabalhos, no entanto, tem descrito a dinâmica de circulação viral em territórios específicos. Observações deste tipo são de extrema importância pela possibilidade de antecipação do impacto decorrente da introdução e co-circulação de diferentes sorotipos em uma dada região, podendo direcionar medidas de prevenção em saúde pública como contenção de epidemias e campanhas de combate ao mosquito.

O Brasil nesta última década experimentou importantes epidemias de dengue em quase todo seu território. Praticamente todos os seus estados, destacando os da região Sul, enfrentaram epidemias de dengue com a ocorrência de FHD em muitos deles. O estabelecimento de hiperendemicidade, onde diversos sorotipos circulam ao mesmo tempo, faz com que casos graves passem a ser mais freqüente, o que exige medidas importantes de saúde pública além da necessidade de aumento do conhecimento sobre a epidemiologia da doença, e aspectos relacionados com as cepas de vírus em circulação para o entendimento da dinâmica de circulação do DENV seguindo os sorotipos existentes em nosso estado e país. Este tipo de conhecimento pode direcionar políticas de saúde pública além de um potencial ganho de informações que possam ser aplicadas no entendimento de outras viroses ou infecções que apresentem o mesmo padrão de disseminação.

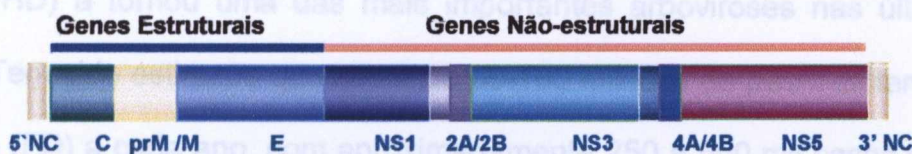
## **1.1 - REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.1.2 - O vírus da Dengue e sua Epidemiologia no mundo**

O vírus da dengue (DENV) é do gênero *Flavivirus* da família *Flaviridae* (a mesma família dos vírus da febre amarela e da hepatite C) conhecido por ser o agente etiológico da febre da dengue (FD) e da ameaçadora febre hemorrágica da dengue (FHD) que nas formas mais graves é chamado de síndrome do choque da dengue (SCD), o qual é endêmico na maioria dos países tropicais e subtropicais do mundo. Estima-se que existam entre 2,5 e 3 bilhões de pessoas vivendo sob risco de infecção por este vírus (MACKENZIE *et al.*, 2004). Esta arbovirose tem se expandido nos últimos anos aumentando gradativamente o número de casos em

muitos países inclusive no Brasil, com conseqüências alarmantes como o crescimento do índice de casos graves muito observado na última epidemia ocorrida no nosso país.

O genoma deste vírus é composto por uma fita única de RNA (RNA positivo), com aproximadamente 11Kb (quilobases) de tamanho produzindo três proteínas estruturais e sete não estruturais na sua tradução observado na **Figura 1.0** (SHURTLEFF *et al.*, 2001). Todos os flavivírus possuem um grupo comum de epítomos na sua proteína de envelope que resulta em extensiva reação cruzada em testes sorológicos. A infecção por um dos quatro tipos de vírus produz uma imunidade duradoura para o mesmo, entretanto, o indivíduo ainda é susceptível à infecção por um dos outros três sorotipos com risco de quadros graves quando a infecção for heterotípica (KLIKIS *et al.*, 1989).



**Fig. 1.0 – Organização do genoma de flavivírus.**

A forma de transmissão do vírus da dengue ao hospedeiro vertebrado é através da picada de mosquito do gênero *Aedes*. Dependendo da área geográfica, diferentes espécies de *Aedes* (*Stegomyia*) spp. podem atuar como vetores desta virose. O principal agente transmissor em nosso país é o mosquito *Aedes aegypti*. Por conta da expansão desordenada de áreas urbanas em muitas regiões do mundo, este inseto se adaptou aos arredores domiciliares aumentando seu potencial na transmissão do vírus da dengue. Grande parte do continente americano

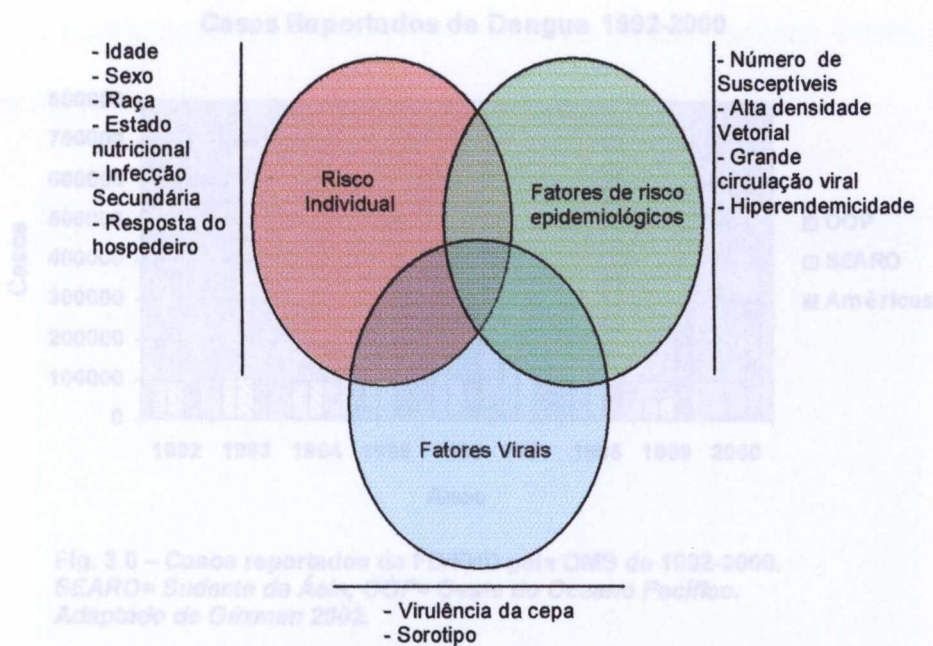
principalmente as regiões tropicais, subtropicais e até algumas cidades norte-americanas, estão infestadas por mosquitos *Aedes* (GUBLER, 1998). O período de incubação intrínseca varia de três a quinze dias, sendo em média de cinco a seis dias, podendo ocorrer quatro diferentes quadros clínicos pela infecção com o vírus da dengue: dengue assintomática ou febre não diferenciada, febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome de choque da dengue (SCD). Febre não diferenciada podendo ser um curto mal estar febril associado com poucos outros sintomas ou até mesmo assintomático.

Uma das características da infecção pelo vírus da dengue é sua capacidade para produzir formas graves da doença, com letalidade elevada caso os pacientes não sejam submetidos a tratamento correto e oportuno, como também de se expressar com pouco ou nenhum sintoma. A emergência da febre hemorrágica da dengue (FHD) a tornou uma das mais importantes arboviroses nas últimas duas décadas. Tem sido estimado que cerca de 50-100 milhões de pessoas tenham febre da dengue (FD) a cada ano, com aproximadamente 250 a 500 mil casos de FHD no mesmo período de tempo com 0,5% de letalidade (RIGAU-PEREZ *et al.*, 1998). O mecanismo preciso, no aspecto imunopatológico, pelo qual o vírus do dengue causa doença hemorrágica grave não é bem entendido, embora fatores do hospedeiro (i.e., *status* imune, doenças crônicas e predisposição genética) e/ou virulência das cepas podem desempenhar um papel chave na patogênese (FIGUEROA & RAMOS, 2000; GUZMAN & KOURI, 2002).

A FHD é caracterizada por uma febre de começo súbito, a qual permanece por dois a sete dias, e uma variedade de sinais e sintomas inespecíficos. Durante a fase

aguda é difícil distinguir a FHD da FD e de outras moléstias comuns em áreas tropicais como leptospirose e febre amarela. Os pacientes normalmente apresentam trombocitopenia (com plaquetas  $\leq 100,000/\text{mm}^3$ ) e hemoconcentração que é considerada como evidência de eminente síndrome de falha vascular (ROTHMAN & ENNIS, 1999). Manifestações hemorrágicas comuns incluem sangramentos na pele como petéquias, lesões púrpuras e equimoses. Epistaxes, sangramento nas gengivas, hemorragia gastrintestinal e hematúria ocorrem menos freqüentemente. Petéquias espalhadas são as manifestações hemorrágicas mais comuns observadas; elas aparecem na maior parte nas extremidades, mas também são encontradas no tronco, outras partes do corpo e na face em pacientes com síndrome de choque da dengue (SCD) (LEI *et al.*, 2001). Uma anormalidade fisiopatológica vista em pacientes com FHD e SCD é um aumento da permeabilidade vascular que leva a perda de plasma para compartimentos extravasculares (pleura e peritônio), resultando em hemoconcentração e diminuição da pressão sanguínea (ROTHMAN & ENNIS, 1999). Mudanças hemostáticas na FHD e SCD envolvem três fatores: mudanças vasculares, trombocitopenia e desordem na coagulação. Um mecanismo complexo está envolvido na ocorrência de quadros graves de dengue, sendo assim é uma questão multifatorial bem representada pela **Figura 2.0**.





**Fig. 2.0 –Fatores de risco para FHD/SCD: Aspecto integrado. Adaptado de Gúzman 2002.**

Diversos fatores podem estar envolvidos na emergência e re-emergência da FD. Tanto a FD quanto a FHD são problemas de saúde pública, principalmente em países tropicais e subtropicais. Estima-se que anualmente cerca de 50 a 100 milhões de casos a cada ano (GUBLER, 2002). A dengue é endêmica nas Américas, sudeste da Ásia (SEAR), no oeste do Pacífico (OOP), África e no leste do Mediterrâneo, sendo as três primeiras regiões as principais atingidas, respectivamente. A Figura 3.0 representa os casos de FD e FHD por regiões geográficas de 1992 a 2000 (GUZMAN & KOURI, 2002). Nos últimos oito anos a incidência da dengue tem crescido nas áreas endêmicas, particularmente nas Américas; apesar de nos três últimos anos o número de casos fatais ter aumentado no sudeste da Ásia e regiões do oeste do Pacífico. São necessários mais estudos avaliando melhor alguns fatores de riscos para responder melhor a estas observações, como estudos em genes candidatos para aumento de susceptibilidade a quadros graves de infecção pelo vírus da dengue.

### Casos Reportados de Dengue 1992-2000

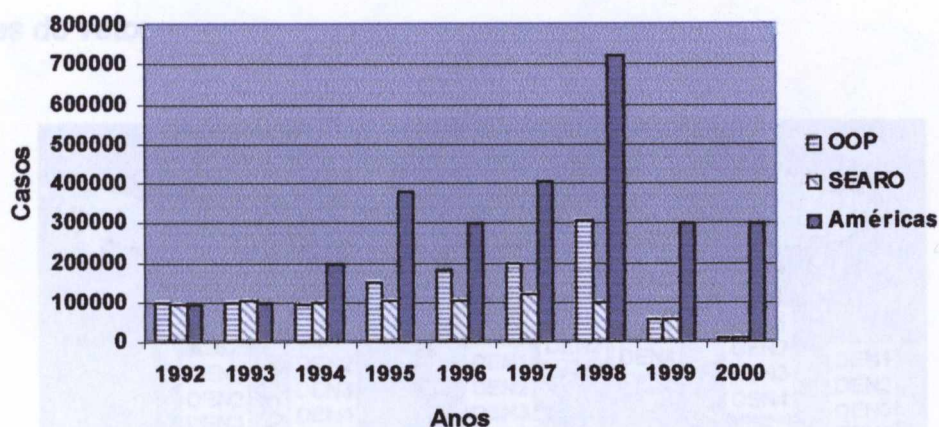


Fig. 3.0 – Casos reportados de FD/FHD pela OMS de 1992-2000. SEARO= Sudeste da Ásia, OOP= Oeste do Oceano Pacífico. Adaptado de Gúzman 2002.

Figura 4.0 – Distribuição global dos sorotipos do vírus da dengue. Adaptado de Mackenzie et al., Nature 2004.

Diversos fatores podem estar envolvidos na emergência e re-emergência da FD e FHD dos quais dois devem ser destacados: aumento da densidade e distribuição geográfica do vetor com transmissão do vírus em diversas regiões geográficas observado na Figura 4.0 (MACKENZIE *et al.*, 2004). Mudanças na densidade demográfica justificam o primeiro fator, particularmente com o crescimento da população global juntamente com urbanização não planejada resultando em moradias com condições inapropriadas, com inadequados sistemas de abastecimento de água e esgotamento sanitário. A situação epidemiológica piora ainda pela deterioração dos sistemas de saúde e dos programas de controle dos mosquitos nos principais países endêmicos. O continente americano oferece um exemplo singular para este tipo de observação, com a grande campanha de erradicação iniciada no final da década de 40, onde a maior parte dos países se tornou livres do vetor. Entretanto, durante as décadas de 60 e 70 o *A. aegypti* re-infestou a América Central e do Sul por conta da não adesão de alguns países ao

do vírus da dengue distribuída pelo mundo.



programa de erradicação do vetor. Hoje, somente poucos países deste continente estão livres do vetor.

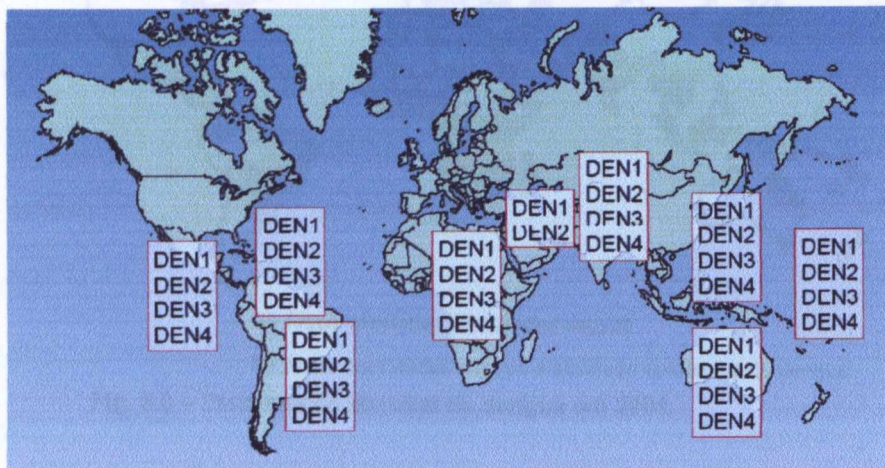
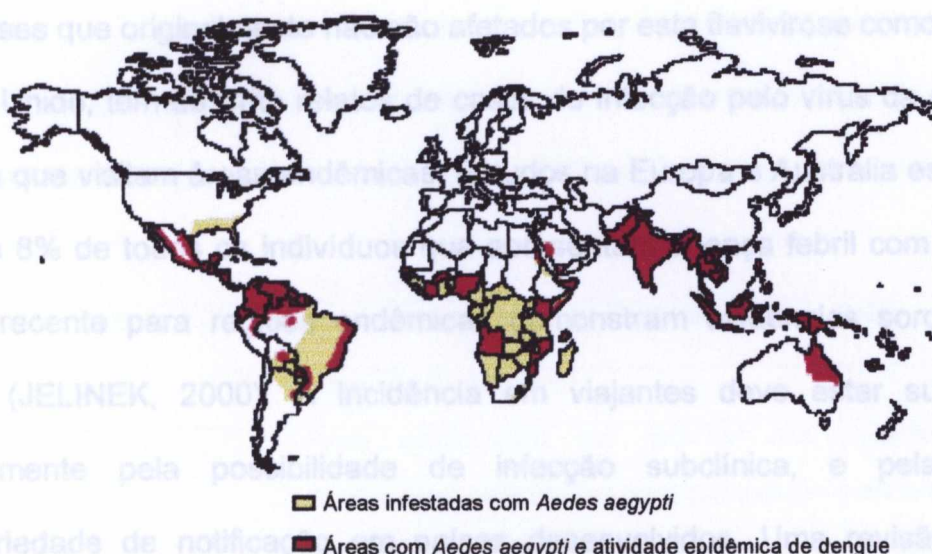


Figura 4.0 – Distribuição global dos sorotipos do vírus da dengue. Adaptado de Mackenzie *et al.*, Nature 2004.

Muitos países ao redor do mundo têm experimentado epidemias com as mais variadas formas. O aumento do transporte aéreo tem também possibilitado o movimento de diferentes sorotipos, cepas, e até mesmo genótipos do vírus de uma região para outra. Indivíduos em fase virêmica (até o quinto dia do aparecimento dos sintomas) são capazes de introduzir um novo sorotipo em uma população humana susceptível. Por exemplo, 17 anos após o último relato, o DENV-3 foi re-introduzido na América Central e em menos de sete anos ele chegou ao Caribe e países da América do Sul produzindo epidemias de FD e FHD (FIGUEROA & RAMOS, 2000). Em geral diversos fatores que aumentam o contato entre o vetor e o hospedeiro favorecem o aumento da transmissão do DENV, apesar de fatores como mudanças climáticas e evolução viral não poderem ser excluídos de influenciarem na emergência desta flavivirose. Percebe-se que a transmissão da dengue é um fenômeno complexo onde diversos fatores estão envolvidos como os mencionados anteriormente. A Figura 5.0 demonstra as áreas infestadas com *A. aegypti* e com atividade epidêmica do vírus da dengue distribuída pelo mundo.





**Fig. 5.0 – Distribuição Mundial da dengue em 2001.**

Muitos países ao redor do mundo têm experimentado epidemias com as mais variáveis intensidades com casos de FD e FHD/SCD. Um ponto em comum entre as regiões que experimentam epidemias é o clima que possuem e por representarem países na maioria das vezes regiões muito pobres ou em desenvolvimento. A Tailândia, por exemplo, tem sido atingida crescentemente por epidemias de FHD com uma alta incidência desta forma clínica da dengue desde sua primeira epidemia em 1958. Apesar da experiência deste país no tratamento ter aumentado possibilitando a diminuição de casos fatais de 8% na década 1960 para 0,6% em 1996, a FHD ainda é um importante problema de saúde pública nesta localidade (BARBAZAN *et al.*, 2002). Um outro problema enfrentado na Tailândia é que apesar do controle vetorial ser realizado, esta estratégia tem falhado principalmente nos períodos interepidêmicos, quando diminui muito o interesse da população em auxiliar neste combate, o que impede o sucesso das campanhas de erradicação (BARBAZAN *et al.*, 2002).

Países que originalmente não são afetados por esta flavivirose como Alemanha e Reino Unido, têm descrito relatos de casos de infecção pelo vírus da dengue em viajantes que visitam áreas endêmicas. Estudos na Europa e Austrália estimam que cerca de 8% de todos os indivíduos que apresentam doença febril com história de viagem recente para regiões endêmicas demonstram evidências sorológicas de dengue (JELINEK, 2000). A incidência em viajantes deve estar subestimada, principalmente pela possibilidade de infecção subclínica, e pela falta de obrigatoriedade de notificação em países desenvolvidos. Uma revisão clínica e epidemiológica europeia revelou que de 294 pacientes com diagnóstico confirmado para dengue 2,4% desenvolveram FHD (JELINEK *et al.*, 2002), sendo sudeste da Ásia, Índia e Américas as maiores fontes geográficas de aquisição de infecção pelo vírus da dengue, contribuindo com 29, 23 e 22% dos casos, respectivamente.

Nas Américas antes de 1981 não eram conhecidas epidemias de FHD apesar da circulação do vírus em diversas regiões nas décadas de 1960 e 70. Um grande marco na ocorrência de quadros graves da infecção foi a experiência de Cuba em 1981. Esta epidemia foi detectada no final do mês de maio do mesmo ano aumentando nos meses de julho e agosto, com os últimos casos diagnosticados em outubro. Ocorreu um total de 344.203 casos de FD e FHD/SCD reportados, destes 10.312 casos foram classificados entre os graus II e IV de intensidade segundo a OMS (Tabela 1.0 demonstra os graus de intensidade que podem ocorrer na FHD apesar de atualmente este tipo de classificação ser muito difícil principalmente pela variação de espectro da doença). Ocorreram 158 casos fatais, dos quais 101 em crianças menores de 15 anos. Esta epidemia foi limitada graças a um vigoroso e efetivo programa de controle do mosquito *A. aegypti* implementado pelas

autoridades de Cuba. Após esta campanha a ilha se tornou teoricamente livre do mosquito em 1997, quando uma outra epidemia ocorreu em Santiago de Cuba, com 2946 casos de FD, chegando a 205 casos de FHD e 12 mortes, todas em adultos.

**Tabela 1.0 – Graus de intensidade de FHD segundo a OMS**

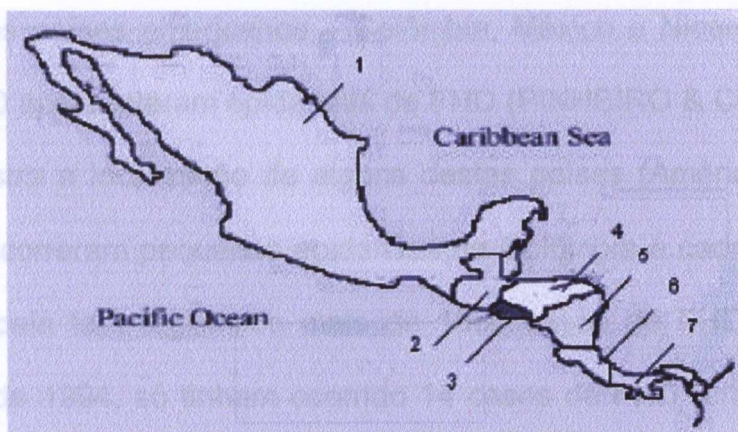
<b>Grau</b>	<b>Características Clínicas</b>
<b>I</b>	Febre acompanhada por sintomas não específicos, raras manifestações hemorrágicas como prova do torniquete positivo;
<b>II</b>	Em adição as manifestações do grau I, sangramento espontâneo na pele e outras hemorragias;
<b>III*</b>	Falha circulatória manifestada por pulso rápido e fraco, hipotensão com diminuição da temperatura corporal, flacidez na pele e distúrbios do humor;
<b>IV*</b>	Choque profundo com indetectável pressão sanguínea e pulso.

\*Os graus III e IV são também definidos como Síndrome de Choque da Dengue (SCD).

Em Porto Rico a FD é endêmica com um padrão sazonal anual de ocorrência mínima entre março e junho, com seu pico de transmissão de setembro a novembro. Durante a epidemia de 1977 neste país, o DENV-3 foi o sorotipo mais freqüentemente isolado desaparecendo em seguida da ilha (RIGAU-PEREZ *et al.*, 2002). No início de 1985, em Porto Rico, três sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-4) co-circularam, produzindo epidemias locais anualmente. Por dois a três anos esses sorotipos co-circularam neste país, com cada um sorotipo prevalecendo em cada ciclo. Entre 1994-1995, o DENV-2 produziu uma grande epidemia, mas em 1996 o DENV-4 predominou por um pequeno período do ano entre os três sorotipos isolados (RIGAU-PEREZ *et al.*, 2001). O DENV-3 teve um padrão interessante em Porto Rico, sendo o sorotipo mais isolado na epidemia de



1977, e a partir deste ano só voltou a ser isolado neste país em 1994 e simultaneamente na Nicarágua e Panamá (RIGAU-PEREZ *et al.*, 2002). Após três anos, este sorotipo já era encontrado em todos os países da América Central (BRISENO-GARCIA *et al.*, 1996). Já em 1998, o DENV-3 foi isolado de pacientes nas ilhas Caribenhas da Jamaica e Barbados. Estas informações demonstram como é de extrema importância o entendimento da dinâmica de circulação do vírus da dengue em diferentes regiões do mundo, no interesse de obter dados para eventuais previsões de introdução e disseminação de novos sorotipos e ainda para previsões de grandes epidemias.



**Fig. 6.0 – América Central com localização dos países que sofrem circulação de diversos sorotipos do vírus da dengue. 1: México; 2: Guatemala; 3: El-Salvador; 4: Honduras; 5: Nicarágua; 6: Costa Rico; 7: Panamá.**

Desde 1981, casos ou epidemias de FHD têm ocorrido em 25 países das Américas todos os anos (exceto 1983), pequenos surtos foram reportados em El-Salvador, México, Nicarágua e Porto Rico entre 1982 e 1988 (PINHEIRO, 1989). Entretanto, em 1989, a segunda maior epidemia de dengue nas Américas ocorreu na Venezuela. Os primeiros casos foram diagnosticados em outubro daquele ano, alcançando seu máximo em janeiro de 1990 declinando abruptamente. De dois de

dezembro de 1989 até 17 de abril de 1990, um total de 3.108 casos de FHD foram notificados com 73 casos fatais (PINHEIRO, 1989). Cerca de dois terços dos casos ocorreram em crianças menores de 14 anos de idade com distribuição etária similar entre os casos fatais. Os sorotipos isolados durante a epidemia foram DENV-1, DENV-2 e DENV-4, com predominância do DENV-2, entretanto, o isolamento dos casos fatais só foi possível através de imunohistoquímica de biópsias hepáticas, fixadas em formol, com antígenos do DENV-2 encontrados em amostras de quatro pacientes. Desde então epidemias de FHD têm atingido a Venezuela todos os anos, a última em 1997, quando ocorreram 6.300 casos com 43 mortes registradas.

Três outros países americanos – Colômbia, México e Nicarágua – durante a década de 1990 apresentaram epidemias de FHD (PINHEIRO & CORBER, 1997). A **Figura 6.0** mostra a localização de alguns destes países (América Central). Entre 1990 e 1994, ocorreram pequenas epidemias na Colômbia a cada ano, mas desde de 1995 este país tem registrado mais de 1000 casos de FHD anualmente. No México, antes de 1994, só tinham ocorrido 14 casos de FHD (entre 1984 e 1991), com uma pequena epidemia ocorrida em 1994, e a partir de 1995 ocorreu um considerável aumento na incidência de casos de FHD. Neste país durante a epidemia de 1995, DENV-2 foi isolado de 20 pacientes com FHD e DENV-1 de cerca de 5 casos adicionais, entretanto, DENV-3 e DENV-4 os quais também circulam neste país, foram recuperados de apenas casos com FD (BRISENO-GARCIA et al., 1996). Na Nicarágua, epidemias têm ocorrido desde 1992 com as maiores ocorrendo em 1993 e 1995.

### **1.1.3 - Aplicações e Implicações dos Métodos Disponíveis para o Diagnóstico da Dengue**

Por diversos aspectos o diagnóstico acurado e eficiente da dengue é importante. Primeiramente para o devido cuidado clínico, suporte para vigilância dos sorotipos ou genótipos em circulação além de outras razões como estudos de patogênese e desenvolvimento de vacinas. Além do auxílio à clínica e a vigilância epidemiológica, prover às autoridades informações úteis com relação ao tempo, localização, sorotipo viral além de facilitar graduação da intensidade da doença (GUZMAN & KOURI, 2004). A forma como os testes diagnósticos são empregados é de fundamental importância para determinação de áreas com o maior risco de ocorrência de quadros graves, como também a medida da intensidade com a qual os sorotipos circulam em um determinado território. É uma ferramenta de extrema importância para estudos do vírus e do hospedeiro além de evidenciar condições epidemiológicas que podem estar influenciando na ocorrência de quadros graves da doença.

O diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue pode ser realizado através do isolamento viral, detecção do genoma ou antígeno e por estudos sorológicos. Este último é o mais utilizado em todo o mundo, sendo de extrema importância para vigilância epidemiológica em muitos países inclusive no nosso. São também de muita importância dados epidemiológicos juntamente com avaliação clínica adequada associado com o diagnóstico laboratorial.

### 1.1.3.1 - Diagnóstico Sorológico

Em indivíduos que nunca tiveram contato com o vírus da dengue, durante uma infecção primária é produzida uma resposta lenta e com baixos títulos de anticorpos. O anticorpo IgM é o primeiro isotipo de imunoglobulina a aparecer, seguida de IgG que surge em baixos títulos no final da primeira semana do início do surgimento dos sintomas. Entretanto, durante a infecção secundária os títulos de anticorpos tanto IgG quanto IgM aumentam rapidamente, este último tem seus títulos diminuídos rapidamente (INNIS *et al.*, 1989). Os níveis de IgG são altos mesmo durante a fase aguda da infecção secundária, aumentando drasticamente nas duas semanas seguintes da infecção alterando a cinética da resposta de IgM que só chega a aparecer no final do período febril da doença (GUZMAN & KOURI, 2004). A utilização do método de imuno-ensaio enzimático (ELISA) para determinação de anti-dengue IgM específico tem sido uma ferramenta de extrema importância para o diagnóstico de dengue em todo o mundo. Este tipo de diagnóstico pode ser encontrado em diferentes formatos tais como ELISA de captura, ultramicroELISA de captura, *dot*-ELISA e mesmo testes tipo "*dipstick*" têm sido desenvolvidos (VAZQUEZ *et al.*, 2003). Amostras de soro, sangue e mais recentemente saliva são utilizadas para detecção de IgM quando colhidas em tempo hábil (em torno de cinco dias após início dos sintomas característicos).

O diagnóstico de soroconversão é definido pelo aumento de quatro vezes no título de anticorpos nos soros pareados da fase aguda e coalescência por inibição da hemoaglutinação (HI), fixação do complemento (FC), técnica de redução da neutralização em placa (PRNT) ou ELISA (GUZMAN & KOURI, 1996). Devido as possíveis reações cruzadas que podem ocorrer, quando o diagnóstico preciso é



requerido a PRNT é utilizada pelo fato desta técnica ser uma das ferramentas mais específicas para o diagnóstico sorológico da dengue (MORENS *et al.*, 1985).

Diferentes linhagens e clones celulares têm sido empregados no isolamento de vírus da dengue em culturas celulares. A linhagem celular cultivada de *Aedes albopictus* (C6/36) é a mais utilizada.

### 1.1.3.2 - Detecção do Vírus

A infecção pelo vírus da dengue tem um período curto de viremia, encontrada entre três e cinco dias após o início dos sintomas, com alguma variação em infecções secundárias. Isto às vezes torna difícil a identificação do vírus por este método diagnóstico, principalmente pelo período no qual tem que ser realizado a coleta e pela dificuldade no diagnóstico clínico pelos médicos. A amostra de escolha é o soro, entretanto, leucócitos, tecidos obtidos de autópsias como fígado, pulmão, linfonodos e baço podem ser utilizados (ROSEN *et al.*, 1999). A inoculação em mosquitos é um dos sistemas de maior sensibilidade, podendo ser utilizados larvas ou mosquitos adultos. Mosquitos *Toxorhynchites* são preferencialmente usados por não serem hematófagos. Adultos machos de *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* podem ser utilizados com muita utilidade para isolamento (ROSEN & GUBLER, 1974).

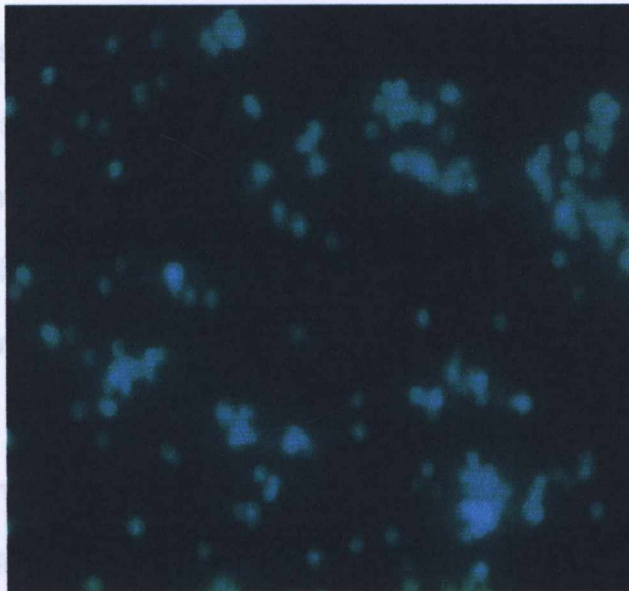


Fig. 7.0 – Imunofluorescência indireta em células C636 de *A. albopictus*.

Pelas exigências técnicas necessárias para inoculação direta em mosquitos vivos, têm sido utilizadas células de mosquitos preferencialmente para rotina diagnóstica. Diferentes linhagens e clones celulares têm sido empregados no isolamento viral, entretanto, a linhagem celular cultivada de *Aedes albopictus* (C6/36) tenha se tornado a célula hospedeira de escolha para rotina laboratorial (ver **Figura 7.0**), muito embora a linhagem celular AP61 de *Aedes pseudoscutellaris* seja útil no isolamento viral. Uma mudança ligeiramente simples na técnica utilizando células C6/36 com implemento de uma centrifugação rápida após a inoculação do vírus aumentando em até 16,6% a sensibilidade deste método e diminuindo o tempo necessário para a sorotipagem (ROCHE *et al.*, 2000). Células de mamíferos em cultura têm sido empregadas como células VERO, LL-CMK2 entre outras, embora com menor eficiência (GUZMAN & KOURI, 1996). Em geral estes testes baseiam-se na técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais anti-dengue (anticorpos dirigidos para a região NS1 do vírus). Esta técnica tem sido simplificada utilizando-se anticorpos policlonais para flavivírus e em seguida as amostras positivas são re-testadas com os anticorpos monoclonais dirigidos para os quatro sorotipos existentes. Mesmo assim, algumas cepas de vírus não são facilmente detectadas pelo nível baixo de replicação viral, neste caso alguns pesquisadores recomendam uma ou duas passagens em cultura de células para amplificar a quantidade de vírus (SOLER *et al.*, 1988). Trabalhos têm demonstrado a utilização de citometria de fluxo com desempenho muito bom para detecção de DENV-1, com esta técnica foi possível a detecção dez horas antes quando comparado com imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais dirigidos para região NS1 do vírus (KAO *et al.*, 2001).

### 1.1.3.3 - Detecção do Genoma Viral

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tornou-se uma importante ferramenta para o diagnóstico da dengue, vigilância entomológica, epidemiologia molecular e estudos de patogênese da doença. Diversos protocolos têm sido desenvolvidos aplicando várias combinações de oligonucleotídeos para identificação sorotipo-específica. Nas Américas, pesquisadores desenvolveram um método baseado na técnica de “*NESTED-PCR*” que é extremamente utilizada com uma sensibilidade muito grande (LANCIOTTI *et al.*, 1992). Neste trabalho foram desenhados oligonucleotídeos para a região conservada C/prM que amplifica um produto de 511pb no primeiro PCR, em um segundo PCR utilizando-se oligonucleotídeos tipo específicos que distinguem os sorotipos nas amostras obtendo-se fragmentos de diferentes tamanho para cada sorotipo .

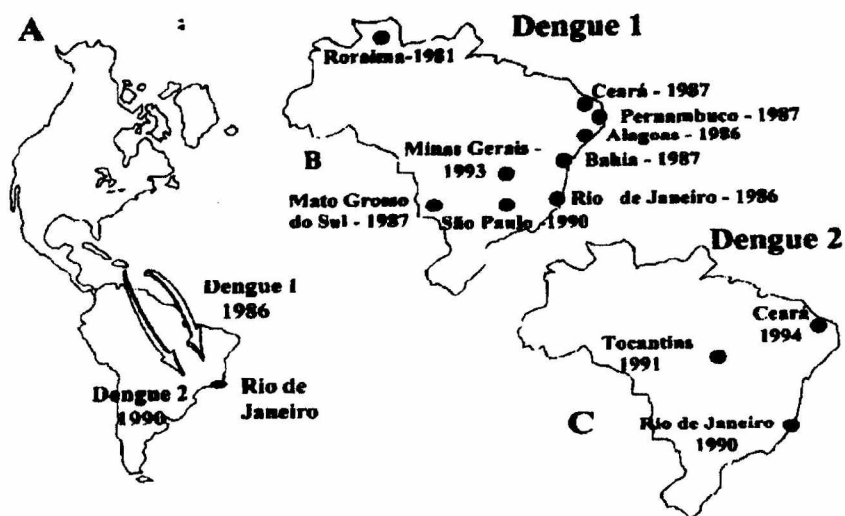
Técnicas de biologia molecular são também úteis para estudos relacionados com evolução molecular e mudanças na virulência de cepas virais relacionadas com mutações no genoma do vírus. Da mesma maneira, estudos de variabilidade genética para estudos de re-emergência e novas epidemias com possibilidade de classificação dos sorotipos em genótipos. Alguns trabalhos têm utilizado métodos para análise de genomas de DENV-2 diretamente de amostras de pacientes, eles encontraram algumas mudanças em aminoácidos no gene da proteína E e da região não traduzida (NTR) como determinantes de FHD, outros autores têm utilizado diversas linhagens celulares para inoculação de vírus e observado trocas de aminoácidos em regiões principalmente da proteína E que estariam relacionadas com alterações na estrutura desta proteína e favorecesse mecanismos patogênicos virais (RICO-HESSE *et al.*, 1997; DUARTE DOS SANTOS *et al.*, 2000). Em áreas

de alta circulação viral é indispensável a utilização de técnicas de biologia molecular para identificação de novos genótipos que podem ser introduzidos como também para vigilância entomológica de mosquitos infectados. A técnica de PCR em tempo real também tem se mostrado útil na correlação entre carga viral e gravidade da doença nos últimos anos.

#### **1.1.4 - Dinâmica do Vírus da Dengue no Brasil**

No Brasil o vírus da dengue é a principal flavivirose causadora de doença. Existe uma provável referência de que a primeira epidemia com as características da dengue, com febre, mialgia e artralgia tenha ocorrido em 1846 no Rio de Janeiro (FIGUEIREDO, 2000). Na época a doença foi denominada polca, baseado nos movimentos que os pacientes faziam quando tentavam andar. Provavelmente outras epidemias aconteceram no Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil no século XIX. Um grande surto de dengue ocorreu no Rio de Janeiro e cidades vizinhas em 1922 e 1923. A grande campanha de combate ao mosquito *A. aegypti* iniciada por Oswaldo Cruz em 1904 com o suporte da Fundação Rockefeller manteve o Brasil com ausência de epidemias entre 1923 e 1981. Em julho de 1981, seguindo a expansão de epidemias na América Central e Caribe, um surto teve início em Boa Vista, no estado de Roraima na região Amazônica (FIGUEIREDO, 2000). O início de epidemias de dengue no país pode ser correlacionado com ressurgimento do *A. aegypti* após sua erradicação. Cerca de 11.000 pessoas foram infectadas por DENV-1 e DENV-4, os quais foram isolados de humanos e mosquitos. O isolamento geográfico destas regiões juntamente com medidas de contenção impossibilitou a dispersão do DENV-4 para o restante do país, conseqüentemente hoje este sorotipo não circula no Brasil.

Nos últimos 16 anos o Brasil tem sofrido muitas epidemias de dengue com a dispersão do vírus e de seu vetor por praticamente todas as regiões, principalmente as áreas mais populosas. A primeira epidemia no Sudeste iniciou-se em uma cidade próxima ao Rio de Janeiro (com o vírus alcançando a região metropolitana rapidamente), em março de 1986. Como demonstrado na **Figura 8.0** deu-se início a uma grande epidemia causada pelo DENV-1, com o vírus encontrando uma população extremamente suscetível. Cerca de 95.000 casos foram registrados até 1987, com a possibilidade de 3.000.000 de pessoas terem se infectado com o vírus nesta epidemia (FIGUEIREDO, 2000). Após a epidemia do Rio de Janeiro, o DENV-1 alcançou a região Centro-Oeste do país, causando uma epidemia em 1987 no estado Mato Grosso. O Nordeste do Brasil também experimentou epidemias, os estados de Alagoas, em junho de 1986, e Ceará, em setembro de 1986. Cerca de 50.000 casos de dengue ocorreram no Ceará de 1986 a 1993 (VASCONCELOS *et al.*, 1995).



**Fig. 8.0** – Introdução e circulação do vírus da dengue no Brasil. A: Introdução do DENV-1 em 1986 e do DENV-2 em 1990 no Brasil; B e C: Cidades onde estes dois sorotipos circularam no território brasileiro até 1994.



Em abril de 1990 uma nova epidemia iniciou-se no Rio de Janeiro na sua região metropolitana, nesta o DENV-2 é introduzido e isolado pela primeira vez no nosso país (NOGUEIRA *et al.*, 1990). O vírus se dispersou rapidamente causando epidemias tanto na costa do Nordeste como na região Amazônica (VASCONCELOS *et al.*, 1993). Pacientes com FHD e SCD representaram 2% dos 17.000 casos registrados, incluindo um número incerto de fatalidades (DA CUNHA *et al.*, 1997). Uma provável justificativa para os casos de FHD/SCD é que eles tenham ocorrido devido à infecção secundária com DENV-2 antecedida por DENV-1 à semelhança de Cuba. Desde então DENV-1 e DENV-2 passaram a circular simultaneamente no Rio de Janeiro na década de 1990 (NOGUEIRA *et al.*, 1999). A origem dos vírus da dengue que circulam no Brasil foi determinada através de sequenciamento dos genomas virais e estudos filogenéticos. Os DENV-1 isolados pertenciam cepa Caribenha e os DENV-2 a cepa Jamaicana (NOGUEIRA *et al.*, 1991; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1998) ambos os vírus provavelmente foram introduzidos no Brasil através do Caribe como apresentado na **Figura 8.0**.

Entre março de 1986 e junho de 1996, 579.037 casos de dengue foram registrados no Brasil. Tanto DENV-1 quanto DENV-2 foram isolados em epidemias ocorridas em todas as regiões do país neste período. Em 1998, um dos piores anos em termos de epidemias, 530.578 casos foram registrados, e em 1999, 208.000 casos (FIGUEIREDO, 2000). Um dado intrigante é o fato de que a maior parte dos casos de dengue no Brasil sejam benignos, somente 795 ocorrências de FHD/SCD foram reportados até 1998 com uma letalidade de 5%. Provavelmente a maior parte dos casos de FHD/SCD deve estar associada com infecções secundárias pela dinâmica dos sorotipos circulantes no país, e com epidemias sucessivas com

sorotipos diferentes, principalmente pelas epidemias seqüenciais do DENV-1 seguido pelo DENV-2. Muitos destes casos graves ocorreram no Nordeste e Sudeste do Brasil em regiões populosas. Apesar da teoria da infecção secundária, existem relatos de infecções primárias fatais também ocorrendo no Rio de Janeiro (NOGUEIRA *et al.*, 1999).

### **1.1.5 - A Dengue como Problema de Saúde Pública na Bahia**

Em 1987, ocorreu o primeiro registro de um caso de dengue no estado da Bahia na cidade de Ipupiara, localizada na região da chapada Diamantina. Neste evento foi introduzido o DENV-1 no estado. Pelo fato de terem sido tomadas as medidas de contenção necessárias e intensas, esta epidemia permaneceu circunscrita à zona urbana deste município (VASCONCELOS *et al.*, 2000). Nesta epidemia ocorreram 623 casos que foram notificados, correspondendo a uma taxa de incidência em torno de 24.000 casos por 100.000 habitantes (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Somente após oito anos, em 1995, um novo sorotipo do vírus da dengue (DENV-2) foi introduzido no estado da Bahia a partir do extremo sul, nas regiões limítrofes com Espírito Santo e Minas Gerais. A cidade de Prado, nas proximidades desta região sofreu uma das primeiras epidemias (VASCONCELOS *et al.*, 2000). Ao contrário do acontecido no município de Ipupiara, a epidemia de Prado caracterizou-se pela rápida disseminação dos casos para outros municípios, e a partir de então o DENV-2 passou a estar distribuído por todo o estado. A **Figura 9.0** mostra a localização geográfica dos municípios de Prado e Ipupiara. Este fenômeno da dispersão do DENV-2 pelo estado é interessante quando comparado com o DENV-1

por diversos aspectos, o principal deles é o fato da introdução do DENV-2 não poder ser determinada em um ponto inicial em 1995.

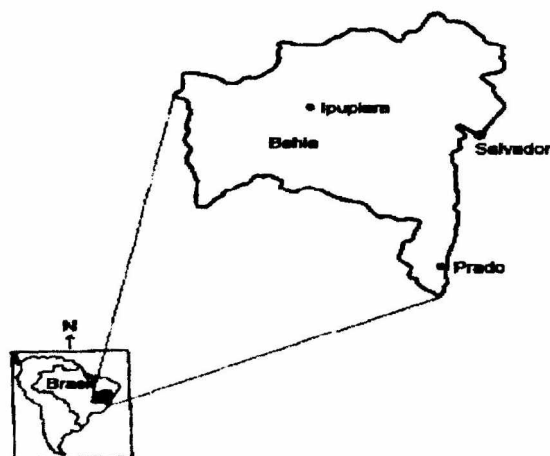


Fig. 9.0 – Mapa do estado da Bahia com localização dos municípios de Ipupiara e Prado.

Entre 1994 e 1996 o único sorotipo isolado foi o DENV-2 e, somente em 1997 o DENV-1 passou também a circular ativamente em todo o estado. A partir de então, se estabeleceu um ambiente favorável para ocorrência de epidemias e de formas graves, devido a circulação simultânea de mais de um sorotipo do vírus. Estes dois sorotipos circularam ativamente na Bahia com incidência maior do DENV-1 quando comparado com DENV-2 em diversos municípios do estado principalmente no ano de 2001. Diversos aspectos favorecem este evento como, por exemplo, uma alta taxa de infestação pelo mosquito *Aedes aegypti* em quase todas as municipalidades existentes na Bahia. Anualmente são notificados milhares de casos de FD em praticamente todas as cidades do estado como demonstrado na **Figura 10**.



## Casos Notificados de Dengue na Bahia entre 2001 e 2003

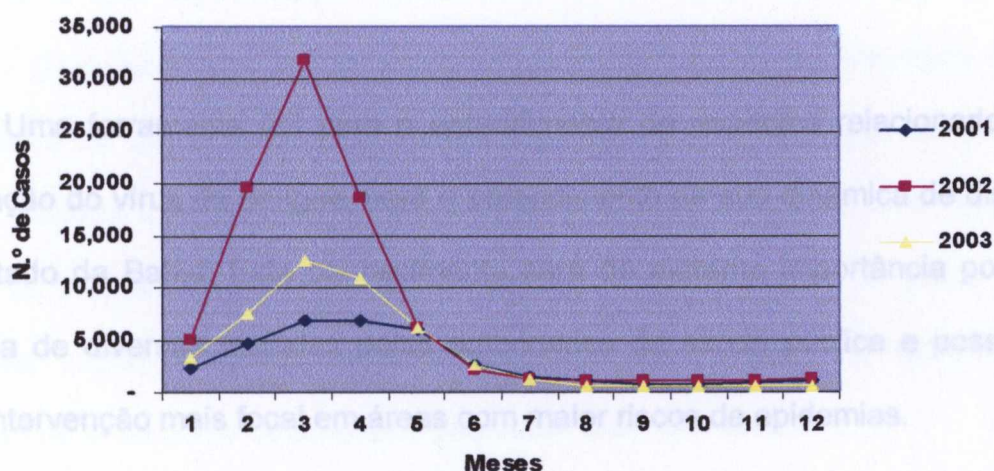


Fig. 10 – Casos notificados por mês entre 2001 e 2003.

Fonte: SESAB – Diretoria de Informação e Comunicação em Saúde.

Antes de 2002 não tinham ocorrido casos graves de infecção pelo vírus da dengue na Bahia, este fenômeno só ocorreu em 2002 quando pela primeira vez foi isolado o DENV-3 no estado. Os primeiros casos foram registrados no mês de janeiro deste ano com ocorrência de milhares de casos de FD e quase uma centena de casos de FHD em diversos bairros da capital, Salvador (além de outras cidades do estado apresentando casos de FHD em menor número). Esta epidemia teve seu maior sítio em Salvador onde ocorreram todos os casos graves de FHD. O surto teve seu maior pico no mês de março quando cerca de 32.000 casos de FD foram registrados em todo o estado. O DENV-3 passou a ser o sorotipo predominante em quase todos os municípios a partir de sua introdução em 2002. Desde então, a Bahia passou a se enquadrar na classe de regiões como algumas ilhas do Caribe, Porto Rico que possuem um risco muito grande da ocorrência de epidemias. A Bahia, assim como outras regiões do Brasil, apresenta muitos fatores relacionados com surtos tais como mais de um sorotipo circulando, indivíduos suscetíveis e altas

taxas de densidade vetorial, sendo fundamental o conhecimento de potenciais mudanças na epidemiologia da doença que possam ocorrer por estes aspectos.

Uma ferramenta útil para o entendimento de aspectos relacionados com a circulação do vírus da dengue, será o entendimento de sua dinâmica de distribuição no estado da Bahia. Este conhecimento será de extrema importância por permitir tomada de diversas medidas pelas autoridades de saúde pública e possibilitarem uma intervenção mais focal em áreas com maior riscos de epidemias.

## **Objetivos**

### **Geral**

Determinar dinâmica de circulação dos sorotipos do vírus da dengue existentes no estado da Bahia entre 2001 e 2003.

### **Específicos**

- 1 – Avaliar dinâmica de circulação dos sorotipos da dengue ocorrentes na Bahia;
- 2 - Determinar se existe um padrão de dispersão do vírus após sua introdução no estado;
- 3 – Descrever a introdução do sorotipo 3 (DENV-3) não existente na Bahia antes de 2002;
- 4 - Gerar dados para modelagem matemática através do padrão de dispersão do DENV-3 que possam ser utilizados na antecipação da possível introdução do sorotipo 4 do vírus da dengue (DENV-4) no estado.

## **Racional e Relevância**

A dengue tem emergido como uma das principais arboviroses ao redor do mundo. Determinar um padrão na dinâmica de circulação dos sorotipos existentes no estado da Bahia é de fundamental importância para definição de políticas de saúde pública. Com a introdução do DENV-3 em 2002 criou-se uma oportunidade única de avaliar a introdução de um sorotipo não circulante na Bahia a fim de observar como esta introdução é modulada pela existência de sorotipos já circulantes, e de como os sorotipos passaram a circular em 2003.

A obtenção dessas informações possibilitará o desenvolvimento de ferramentas que possam ser utilizadas em modelagem matemática que possivelmente auxiliarão na prevenção de epidemias direcionando as tomadas de decisão no combate a possíveis surtos com o potencial de antecipar a provável introdução do DENV-4. Este tipo de estudo oferece condições de prever com elevada margem de acerto quais áreas em uma dada região apresentam maior risco de sofrer epidemias da dengue. Além da possibilidade dos conhecimentos adquiridos neste trabalho serem aplicados em outras doenças infecciosas que apresentem um padrão de disseminação parecido com o observado neste trabalho.

**THE DYNAMICS OF DISPERSION OF THE *Dengue virus* (DENV) IN BAHIA WITH THE INTRODUCTION OF THE SEROTYPE 3 (DENV-3) IN THE STATE.** Melo P.R.S.<sup>1</sup>; Ciuffo A. I.<sup>2</sup>; Reis E.<sup>1</sup>, Blanton R. E.<sup>3</sup> and Reis M. G.<sup>1</sup>.  
(<sup>1</sup>Gonçalo Moniz Center of the Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, BA; <sup>2</sup> State of Center Laboratory, Salvador, BA; <sup>3</sup>Case Western Reserve University, Cleveland, EUA). Email: [miter@cpqgm.fiocruz.br](mailto:miter@cpqgm.fiocruz.br)

### **Abstract**

The dengue virus constitutes a serious global public health problem. Since 1987, with the introduction of the serotype 1 (DENV-1) the State of Bahia has been facing annual epidemics with the concentration of cases during the first four months of the year (from January to April). After the introduction of the DENV-2, probably in 1994 through the south region, Bahia has become an area of intense circulation of this flavivirus, which circulate in almost the whole State. In 2002 the DENV-3 was introduced in Bahia through Salvador (capital of the State), producing the first cases of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), with the occurrence of thousands of cases of Dengue Fever (DF). According to our results, the introduction of the DENV-3 was given through the city of Salvador, being rapidly disseminated for the other cities of the State, following the flow of the main roads out of the capital. We have obtained a mathematical model where distance from the capital, flow of vehicles and DENV-1 explained in 24% the intensity of variation of DENV-3 ( $p=0,001$  ANOVA). These data will help to generate a mathematical model for the anticipation of the probable DENV-4 and could be possibly applied to other infectious diseases.

**Keywords: dengue virus, dynamics, dissemination, mathematical models.**

## Introduction

Dengue viruses are mosquito-borne RNA viruses of the family Flaviviridae. There are four closely related serotypes (DENV-1–4) that are thought to represent at least three independent introductions into humans from sylvatic primates, the most recent (DENV-1) occurring within the last century (WANG *et al.*, 2000). Dengue is one of the most important re-emergent infectious diseases of the last century and one of the most serious health problems affecting tropical and subtropical regions of the Americas (MCBRIDE & BIELEFELDT-OHMANN, 2000). All four serotypes cause dengue fever (DF), a relatively mild febrile illness, and in some cases, the potentially fatal dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). The broad distribution of the mosquito vector *Aedes aegypti* in the tropics and subtropics results in the exposure of approximately 2.5 billion individuals to dengue infection (MACKENZIE *et al.*, 2004).

Dengue viruses are the most important flavivirus causing human disease in Brazil (FIGUEIREDO *et al.*, 1998). In the last 14 years Brazil has suffered many dengue epidemics (FIGUEIREDO, 2000). Virus and vector spread in the country and dengue outbreaks occurred in all regions, including the most populated areas of Brazil, such as in the state of Bahia. At the end of 2001, Brazil had only experienced epidemics with DENV-1 and DENV-2. Both were actively circulating when DENV-3 was introduced in 2002, and produced the first cases of dengue hemorrhagic fever in the state of Bahia. Since 1987 the state of Bahia has been going through epidemics caused by the dengue virus. This year, the DENV-1 was isolated for the first time in the state, in the city of Ipupiara, in the Chapada Diamantina region. A second serotype, the DENV-2, was only introduced in the year of 1995 by the extreme south



of the state, however its initial point of introduction was not identified, despite Prado (in the extreme south littoral) having suffered one of its first epidemics (VASCONCELOS et al., 2000). Because of the situation of the public health authorities in the first epidemic moments, in Ipupiara and Prado, the dynamics developed by the virus introduced in the state of Bahia, both in 1987 and in the 1990s, was not observed in either of these opportunities. In this study, we assessed the dynamics of circulation of dengue virus in Bahia with the introduction of a new serotype (DENV-3) in the State.

## **Methods**

### **Study site**

Bahia is the fifth-largest state in the country in territorial extension and corresponds to 6.64% of the total area of Brazil and 36.34% of the total area of Brazil's Northeastern Region. Within its area of 564,692.67 square kilometers, approximately 68.7% of it is located in the semi-arid region. Its 1,183 km long coastline hosts various types of ecosystems and is favorable for dengue infections. The Bahian urbanization process is marked by the concentration of an expressive part of the urban population in the capital, thus making it the only city in the state to exceed the level of 500,000 inhabitants. On the other hand, it is characterized by the dispersion of the population in hundreds of small-sized urban centers. In the last decades, the expressive growth of some medium-sized centers has contributed towards the strengthening of Bahia's urban network with individual movement.

### **Isolation of virus**

All samples between 2001–2003 were sent to the State Center Laboratory in Salvador - Bahia for virus isolation by the mosquito cell inoculation technique, using infection of line derived from *A. albopictus* cells (C6/36 cells) grown in Eagle's minimum essential medium supplemented with 5% fetal calf serum. The C6/36 cells were infected with 50  $\mu$ L of undiluted acute serum (<5 days of infection), stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ , and were then incubated for seven days between  $25^{\circ}\text{C}$  and  $32^{\circ}\text{C}$ . Cells were fixed to slides with cold buffered acetone and infecting virus was identified by IFA using serotype-specific monoclonal antibodies (GUBLER *et al.*, 1984).

### **Identification of epidemic months**

Information about the number of notified cases was provided by the Health Secretary of the State of Bahia (SESAB) through the Health Communication and Information Directory (DICS) for observation of whether the occurrence of cases is reciprocal with the frequencies of samples and isolations by the municipal district (see **Figure 1.0**).

### **Statistical analysis**

Municipalities differed in their efficiency of submitting samples, and a factor was calculated for each community and used to correct the number of positive isolates for these differences. The corrected number of isolates is given per 100,000 population.

The spatial distribution of isolates was plotted using the program Tabwin v. 3.01 (<http://www.datasus.gov.br/tabwin/download.htm>). Traffic flow data (mean number of vehicles passing per day) and distances from Salvador were obtained from the National Department of Infrastructure and Transportation (DNIT at <http://www.dner.gov.br/index.asp>).

Multiple linear regressions were used to test models using traffic flow, distance from Salvador (putative site of introduction), and other viral serotypes as factors that explain the intensity of DENV3 circulation. Viral intensities were normalized by log transformation.

## **Results**

### **Spatial analyses**

In 2001 samples were received from most municipalities during the year. This year, as shown in **Figure 2.0**, DENV-1 circulated intensely in various municipal districts with different intensities, having its highest circulation peak in April. There are multiple foci of maximal intensity. DENV-2 circulated with much lower intensity and no DENV-3 was isolated. There is no indication that either might have a single common source of initiation.

The first isolation of DENV-3, in 2002, was in the capital Salvador. DENV-3 circulates in many of the same municipalities as DENV-1 (**Figure 3.0**), but Salvador is the clear concentration for cases and the intensity of circulation generally decreases inversely to distance from Salvador. There are no other centers with equal intensity of circulation throughout the entire year (**Figure 4.0**). This suggests that Salvador is a point of dissemination for the virus.

DENV-1 and DENV-3 in 2003 continue to circulate in generally overlapping areas, except that DENV-3 continues to be more associated with Salvador than DENV-1 and DENV-2 has stopped circulating (data not shown). There is no single predominant region for intensity of circulation.



## **Temporal analyses DENV-3 2002**

In addition to the spatial associations with Salvador as a point of dissemination, the first isolation of DENV-3 was in a suburb of Salvador on January 18<sup>th</sup> (**Figure 3.0**). All but one of the isolates in January was from Salvador. There is the rapid appearance of DENV-3 in parts of the state progressively more distant from the capital and more distant from major transportation routes (see **Figure 5.0**). Salvador remains the focus of the most intense circulation throughout the rest of this quarter.

## **Multiple linear regression**

This analysis found that a model that included, in order of significance, distance from Salvador, traffic flow and DENV-1 intensity explained 24% of the variability in DENV-3 isolation ( $p=0.001$  see **Table 1.0 and 2.0**). The coefficients were all positive, except for distance from Salvador. When DENV-1 or DENV-2 was used as dependent variables, neither showed any significant correlations (data not showed). This reinforces identification of the capital as the main point of introduction and dissemination. Variability in the earliest appearance for DENV-3 was best explained by the intensity of DENV-3 and traffic flow (adjusted  $R^2=0.182$ ,  $p=0.022$ ).

## **Discussion**

This is the first temporal space analysis of the dengue virus circulation on the State of Bahia. After the introduction of the DENV-1 in Ipujiara in 1987 little has been studied about the dynamics of viral circulation in this region of Brazil (VASCONCELOS *et al.*, 2000). It is possible to observe that between 2001 and 2003 Bahia has become an area of intense activity of the dengue virus similarly to other regions from America, such as Porto Rico (KEATING, 2001) and Nicaragua (HARRIS

*et al.*, 2000) with an annual seasonality for the occurrence of dengue epidemics. Other important issue is that the Bahia is actually more spread for *Aedes aegypti* mosquito, an easy condition for occurrence of epidemics and dissemination of new virus.

In 2001 there was an intense circulation of the DENV-1 in almost all Bahia's territory (**Figure 2.0**), which when compared to the DENV-2 is visibly higher both in the spatial distribution as in the intensities of circulation in the first serotype. The circulation of DENV-1 and DENV-2 were possibly directed mainly by the immunological profile of the susceptible individuals, which is, in the cities where there was a higher number of people who have never had DENV-1 this serotype circulated more intensity, this probably too was important for DENV-2 circulate. This probably reflects an intense circulation of DENV-2 previously, in a higher portion of the State.

The co-circulation of other DENV did not lead to relative inhibition of DENV3 circulation as might be predicted from the brief period of general immunity following infection. On the other hand there were no cases of dual infections (despite of the difficult for IFA in determine dual infection), suggesting possibly some interference due to immunity. The conditions that allowed DENV-1 to circulate successfully may have also promoted DENV-3 circulation despite some degree of cross-immunization and thus lead to a correlation.

DENV-3 was probably introduced into Salvador (capital of Bahia) in 2002 and dispersed too much of the rest of the state in less than 30 days. Given the correlation with distance from the site of introduction and vehicle traffic (**see Table 2.0**), the

mechanism for dissemination was likely to be human traffic out of Salvador. This outbreak is, therefore, a fair approximation of an epidemic disease with person-to-person spread.

This model of dissemination of the DENV can be used in other infectious diseases that present the same dispersion pattern observed in our results. A mathematical model for the anticipated introduction of DENV-4 and for the effect of different intensities of other simultaneously circulating serotypes can now be developed from these data.

**Acknowledgments: We are extremely grateful to Isolina A. Ciuffo (State of Center Laboratory) for virus isolation and serology data, Emanuel Araújo and Jesuina Costa (SESAB) for epidemiologic data and other staff members in the SESAB.**

## References

BARBAZAN, P.; YOKSAN, S.; GONZALEZ, J. P. "Dengue Hemorrhagic Fever Epidemiology in Thailand: Description and Forecasting of Epidemics." **Microbes Infect** 4(7): 699-705, 2002.

BRISENO-GARCIA, B.; GOMEZ-DANTES, H.; ARGOTT-RAMIREZ, E.; MONTESANO, R.; VAZQUEZ-MARTINEZ, A. L.; IBANEZ-BERNAL, S.; MADRIGAL-AYALA, G.; RUIZ-MATUS, C.; FLISSER, A.; TAPIA-CONYER, R. "Potential Risk for Dengue Hemorrhagic Fever: The Isolation of Serotype Dengue-3 in Mexico." **Emerg Infect Dis** 2(2): 133-5, 1996.

DA CUNHA, R. V.; MASPERO, R. C.; MIAGOSTOVICH, M. P.; DE ARAUJO, E. S.; LUZ DDA, C.; NOGUEIRA, R. M.; SCHATZMAYR, H. G. "Dengue Infection in Paracambi, State of Rio De Janeiro, 1990-1995." **Rev Soc Bras Med Trop** 30(5): 379-83, 1997.

DUARTE DOS SANTOS, C. N.; FRENKIEL, M. P.; COURAGEOT, M. P.; ROCHA, C. F.; VAZEILLE-FALCOZ, M. C.; WIEN, M. W.; REY, F. A.; DEUBEL, V.; DESPRES, P. "Determinants in the Envelope E Protein and Viral Rna Helicase Ns3 That

Influence the Induction of Apoptosis in Response to Infection with Dengue Type 1 Virus." **Virology** 274(2): 292-308, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. "The Brazilian Flaviviruses." **Microbes Infect** 2(13): 1643-9, 2000.

FIGUEIREDO, L. T.; BATISTA, W. C.; KASHIMA, S.; NASSAR, E. S. "Identification of Brazilian Flaviviruses by a Simplified Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Method Using Flavivirus Universal Primers." **Am J Trop Med Hyg** 59(3): 357-62, 1998.

FIGUEROA, R.; RAMOS, C. "Dengue Virus (Serotype 3) Circulation in Endemic Countries and Its Reappearance in America." **Arch Med Res** 31(4): 429-30, 2000.

GUBLER, D. J. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." **Clin Microbiol Rev** 11(3): 480-96, 1998.

GUBLER, D. J. "The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases as Public Health Problems." **Arch Med Res** 33(4): 330-42, 2002.



GUBLER, D. J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. "Mosquito Cell Cultures and Specific Monoclonal Antibodies in Surveillance for Dengue Viruses."

Am J Trop Med Hyg 33(1): 158-65, 1984.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. "Advances in Dengue Diagnosis." Clin Diagn Lab

Immunol 3(6): 621-7, 1996.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. "Dengue: An Update." Lancet Infect Dis 2(1): 33-42, 2002.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. "Dengue Diagnosis, Advances and Challenges." Int J Infect Dis 8(2): 69-80, 2004.

HARRIS, E.; VIDEA, E.; PEREZ, L.; SANDOVAL, E.; TELLEZ, Y.; PEREZ, M. L.; CUADRA, R.; ROCHA, J.; IDIAQUEZ, W.; ALONSO, R. E.; DELGADO, M. A.; CAMPO, L. A.; ACEVEDO, F.; GONZALEZ, A.; AMADOR, J. J.; BALMASEDA, A. "Clinical, Epidemiologic, and Virologic Features of Dengue in the 1998 Epidemic in Nicaragua." Am J Trop Med Hyg 63(1-2): 5-11, 2000.

INNIS, B. L.; NISALAK, A.; NIMMANNITYA, S.; KUSALERDCHARIYA, S.;  
CHONGSWASDI, V.; SUNTAYAKORN, S.; PUTTISRI, P.; HOKE, C. H. "An Enzyme-  
Linked Immunosorbent Assay to Characterize Dengue Infections Where Dengue and  
Japanese Encephalitis Co-Circulate." Am J Trop Med Hyg 40(4): 418-27, 1989.

JELINEK, T. "Dengue Fever in International Travelers." Clin Infect Dis 31(1): 144-7,  
2000.

JELINEK, T.; MUHLBERGER, N.; HARMS, G.; CORACHAN, M.; GROBUSCH, M.  
P.; KNOBLOCH, J.; BRONNER, U.; LAFERL, H.; KAPAUN, A.; BISOFFI, Z.;  
CLERINX, J.; PUENTE, S.; FRY, G.; SCHULZE, M.; HELLGREN, U.; GJORUP, I.;  
CHALUPA, P.; HATZ, C.; MATTEELLI, A.; SCHMID, M.; NIELSEN, L. N.; DA  
CUNHA, S.; ATOUGUIA, J.; MYRVANG, B.; FLEISCHER, K. "Epidemiology and  
Clinical Features of Imported Dengue Fever in Europe: Sentinel Surveillance Data  
from Tropneteurop." Clin Infect Dis 35(9): 1047-52, 2002.

KAO, C. L.; WU, M. C.; CHIU, Y. H.; LIN, J. L.; WU, Y. C.; YUEH, Y. Y.; CHEN, L. K.;  
SHAIO, M. F.; KING, C. C. "Flow Cytometry Compared with Indirect

Immunofluorescence for Rapid Detection of Dengue Virus Type 1 after Amplification in Tissue Culture." J Clin Microbiol **39**(10): 3672-7, 2001.

KEATING, J. "An Investigation into the Cyclical Incidence of Dengue Fever." Soc Sci Med **53**(12): 1587-97, 2001.

KLIKS, S. C.; NISALAK, A.; BRANDT, W. E.; WAHL, L.; BURKE, D. S. "Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Growth in Human Monocytes as a Risk Factor for Dengue Hemorrhagic Fever." Am J Trop Med Hyg **40**(4): 444-51, 1989.

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." J Clin Microbiol **30**(3): 545-51, 1992.

LEI, H. Y.; YEH, T. M.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; CHEN, S. H.; LIU, C. C. "Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection." J Biomed Sci **8**(5): 377-88, 2001.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. "Emerging Flaviviruses: The Spread and Resurgence of Japanese Encephalitis, West Nile and Dengue Viruses."

**Nat Med** 10(12 Suppl): S98-S109, 2004.

MCBRIDE, W. J.; BIELEFELDT-OHMANN, H. "Dengue Viral Infections; Pathogenesis and Epidemiology." **Microbes Infect** 2(9): 1041-50, 2000.

MIAGOSTOVICH, M. P.; NOGUEIRA, R. M.; SCHATZMAYR, H. G.; LANCIOTTI, R. S. "Molecular Epidemiology of Den-2 Virus in Brazil." **Mem Inst Oswaldo Cruz** 93(5): 625-6, 1998.

MORENS, D. M.; HALSTEAD, S. B.; LARSEN, L. K. "Comparison of Dengue Virus Plaque Reduction Neutralization by Macro and 'Semi-Micro' Methods in Llc-Mk2 Cells." **Microbiol Immunol** 29(12): 1197-205, 1985.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; CUNHA, R. V.; ZAGNE, S. M.; GOMES, F. P.; NICOL, A. F.; COELHO, J. C.; SCHATZMAYR, H. G. "Fatal Primary Dengue Infections in Brazil." **Trans R Soc Trop Med Hyg** 93(4): 418, 1999.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; SCHATZMAYR, H. G.

"Isolation of Dengue Virus Type 2 in Rio De Janeiro." Mem Inst Oswaldo Cruz

**85(2): 253, 1990.**

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G.; DOS SANTOS,

F. B.; DE ARAUJO, E. S.; DE FILIPPIS, A. M.; DE SOUZA, R. V.; ZAGNE, S. M.;

NICOLAI, C.; BARAN, M.; TEIXEIRA FILHO, G. "Dengue in the State of Rio De

Janeiro, Brazil, 1986-1998." Mem Inst Oswaldo Cruz **94(3): 297-304, 1999.**

NOGUEIRA, R. M.; ZAGNER, S. M.; MARTINS, I. S.; LAMPE, E.; MIAGOSTOVICH,

M. P.; SCHATZMAYR, H. G. "Dengue Haemorrhagic Fever/Dengue Shock

Syndrome (Dhf/Dss) Caused by Serotype 2 in Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz

**86(2): 269, 1991.**

PINHEIRO, F. P. "Dengue in the Americas. 1980-1987." Epidemiol Bull **10(1): 1-8,**

**1989.**

PINHEIRO, F. P. (1998). Emergence of Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas.

Pan American Health Organization. Washington, D.C.



PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. "Global Situation of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, and Its Emergence in the Americas." **World Health Stat Q** 50(3-4): 161-9, 1997.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; DE MESA, M. T.; NOGUEIRA, R. M.; DA ROSA, A. T. "Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas." **Virology** 230(2): 244-51, 1997.

RIGAU-PEREZ, J. G.; AAYALA-LOPEZ, A.; VORNDAM, A. V.; CLARK, G. G. "Dengue Activity in Puerto Rico During an Interepidemic Period (1995-1997)." **Am J Trop Med Hyg** 64(1-2): 75-83, 2001.

RIGAU-PEREZ, J. G.; AYALA-LOPEZ, A.; GARCIA-RIVERA, E. J.; HUDSON, S. M.; VORNDAM, V.; REITER, P.; CANO, M. P.; CLARK, G. G. "The Reappearance of Dengue-3 and a Subsequent Dengue-4 and Dengue-1 Epidemic in Puerto Rico in 1998." **Am J Trop Med Hyg** 67(4): 355-62, 2002.

RIGAU-PEREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P.; SANDERS, E. J.;  
VORNDAM, A. V. "Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever." Lancet **352**(9132):  
971-7, 1998.

ROCHE, R. R.; ALVAREZ, M.; GUZMAN, M. G.; MORIER, L.; KOURI, G.  
"Comparison of Rapid Centrifugation Assay with Conventional Tissue Culture Method  
for Isolation of Dengue 2 Virus in C6/36-Ht Cells." J Clin Microbiol **38**(9): 3508-10,  
2000.

ROSEN, L.; DROUET, M. T.; DEUBEL, V. "Detection of Dengue Virus Rna by  
Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in the Liver and Lymphoid  
Organs but Not in the Brain in Fatal Human Infection." Am J Trop Med Hyg **61**(5):  
720-4, 1999.

ROSEN, L.; GUBLER, D. "The Use of Mosquitoes to Detect and Propagate Dengue  
Viruses." Am J Trop Med Hyg **23**(6): 1153-60, 1974.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. "Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic  
Fever." Virology **257**(1): 1-6, 1999.

SHURTLEFF, A. C.; BEASLEY, D. W.; CHEN, J. J.; NI, H.; SUDERMAN, M. T.;  
WANG, H.; XU, R.; WANG, E.; WEAVER, S. C.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K. L.;

BARRETT, A. D. "Genetic Variation in the 3' Non-Coding Region of Dengue Viruses."

**Virology 281(1): 75-87, 2001.**

SOLER, M.; GUZMAN, M. G.; MUNE, M.; KOURI, G. "[Identification Using Indirect Immunofluorescence Technic of Various Strains of Dengue Isolated During the Epidemic of Nicaragua in 1985]." **Rev Cubana Med Trop 40(3): 5-12, 1988.**

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C.; BARRETO, M. L.; BARRETO, F. R. "[Epidemiology of Dengue in Salvador-Bahia, 1995-1999]." **Rev Soc Bras Med Trop 34(3): 269-74, 2001.**

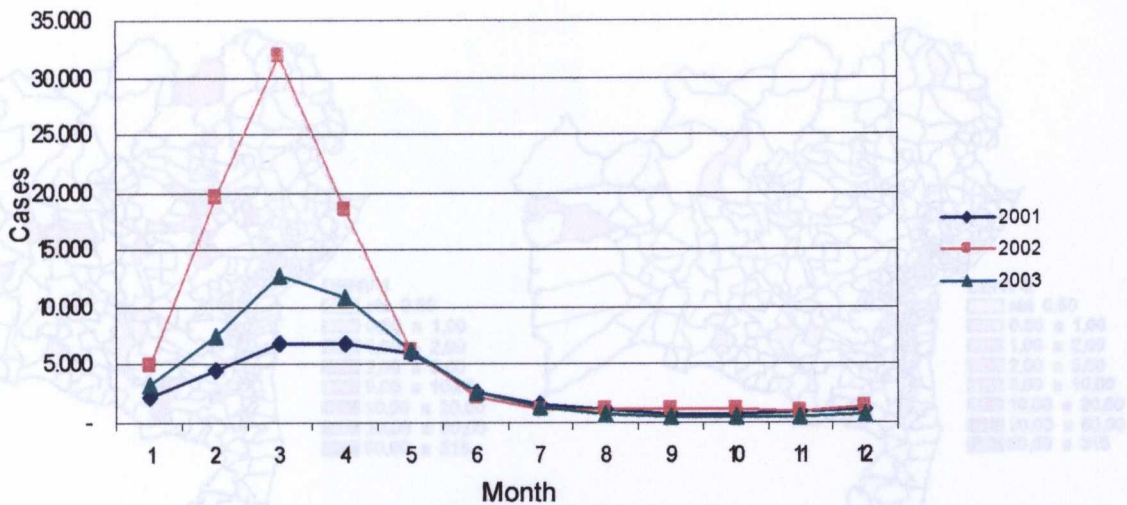
VASCONCELOS, P. F.; DE MENEZES, D. B.; MELO, L. P.; PESSO, E. T.; RODRIGUES, S. G.; DA ROSA, E. S.; TIMBO, M. J.; COELHO, I. C.; MONTENEGRO, F.; DA ROSA, J. F.; ET AL. "A Large Epidemic of Dengue Fever with Dengue Hemorrhagic Cases in Ceara State, Brazil, 1994." **Rev Inst Med Trop Sao Paulo 37(3): 253-5, 1995.**

VASCONCELOS, P. F.; MOTA, K.; STRAATMANN, A.; SANTOS-TORRES, S.; DA ROSA, A. P.; TAVARES NETO, J. "[a Dengue Epidemic in Ipujiara and Prado, Bahia. A Seroepidemiologic Survey]." **Rev Soc Bras Med Trop 33(1): 61-7, 2000.**

VASCONCELOS, P. F.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; DE FREITAS, R. B.; DEGALLIER, N.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. "[Outbreak of Classical Fever of Dengue Caused by Serotype 2 in Araguaiana, Tocantins, Brazil]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **35**(2): 141-8, 1993.

VAZQUEZ, S.; LEMOS, G.; PUPO, M.; GANZON, O.; PALENZUELA, D.; INDART, A.; GUZMAN, M. G. "Diagnosis of Dengue Virus Infection by the Visual and Simple Auidot Immunoglobulin M Capture System." Clin Diagn Lab Immunol **10**(6): 1074-7, 2003.

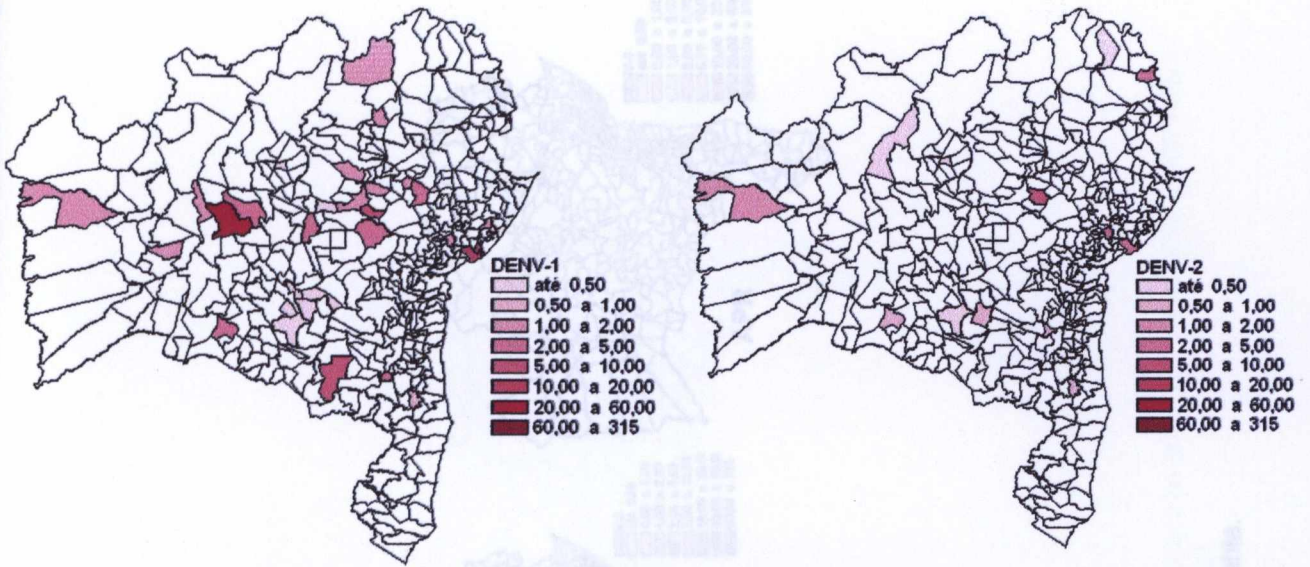
WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A. D.; WATOWICH, S. J.; GUBLER, D. J.; WEAVER, S. C. "Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses." J Virol **74**(7): 3227-34, 2000.



**Figure 1.0 – Notified cases monthly in Bahia State’s between 2001-2003.**

Figure 2.0 -- Circulation DENV-1 and DENV-2 virus in 2001 (DENV-3 was not isolated) within municipalities in Bahia, 2001. Intensity of viral circulation was determined by viral isolation. Colors represent positive isolates/100 000 population adjusted for local efficiency of submitting samples. Rates are cumulative for jan-apr. Municipal units are outlined on the map.





**Figure 2.0** – Circulation DENV-1 and DENV-2 virus in 2001 (DENV-3 was not isolated) within municipalities in Bahia, 2001. Intensity of viral circulation was determined by viral isolation. Colors represent positive isolates/100,000 population adjusted for local efficiency of submitting samples. Rates are cumulative for jan-apr. Municipal units are outlined on the map.

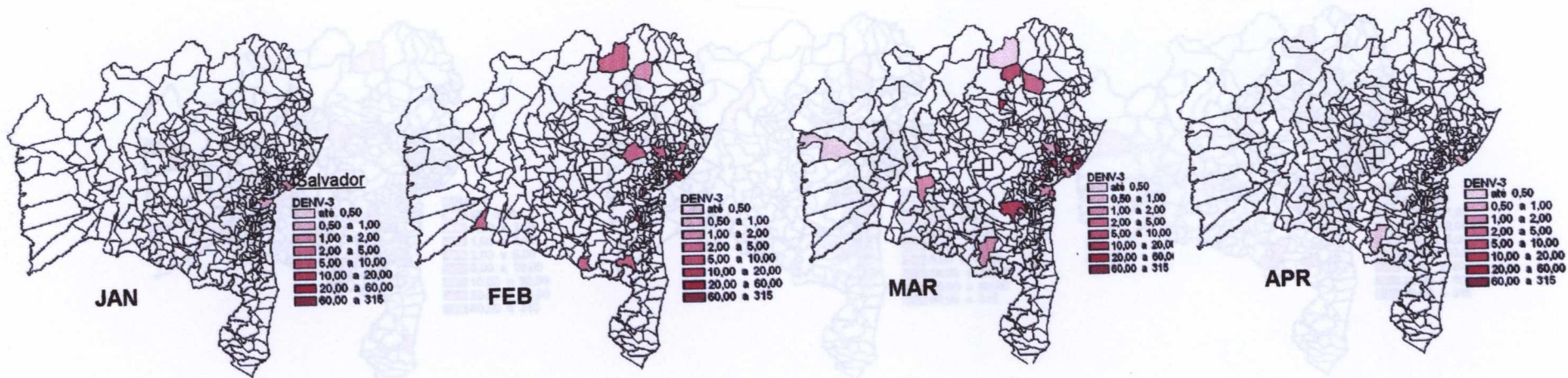
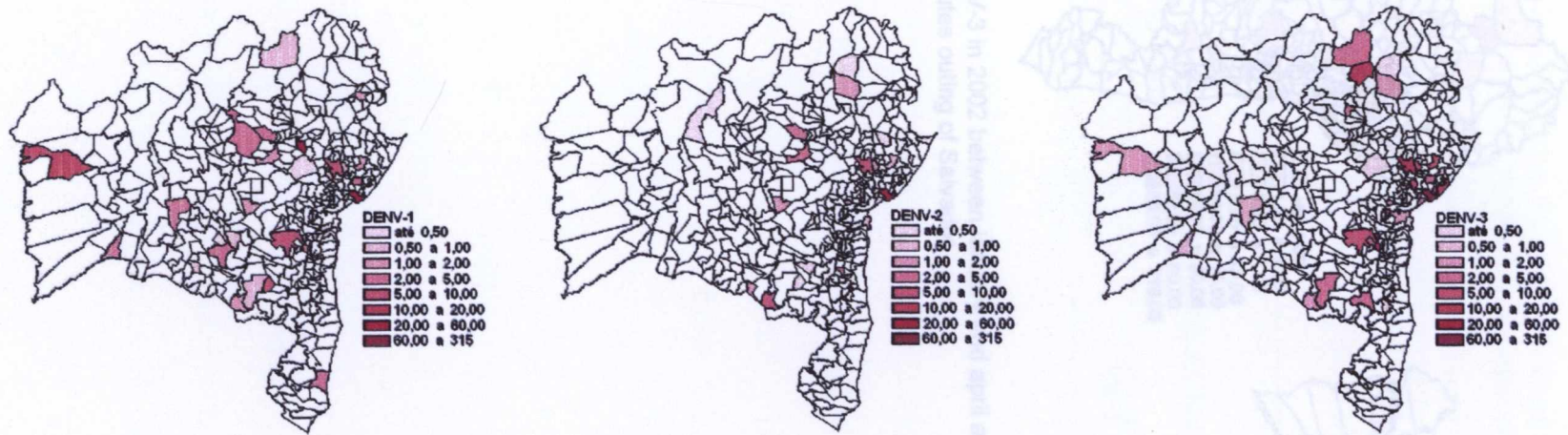


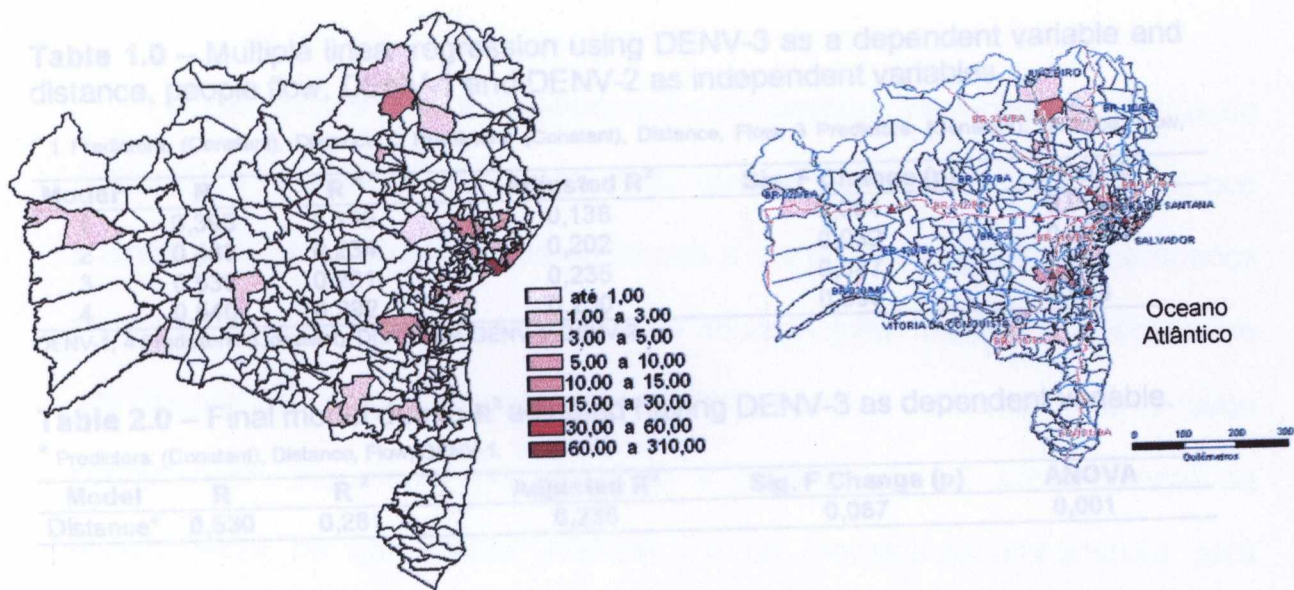
Figure 4.0 – Circulation DENV-1 and DENV-2 virus in 2002 with the introduction of DENV-3 in January beginning at Salvador and extending to other municipalities in Bahia. Viral isolations corrected for efficiency of admission/100,000 by Jan-Apr.

**Figure 3.0** – Adjusted DENV-3 isolates/100,000 by municipality, Jan-Apr 2002 among the municipalities of Bahia.





**Figure 4.0** – Circulation DENV-1 and DENV-2 virus in 2002 with the introduction of DENV-3 in January beginning at Salvador and extending to other municipalities in Bahia. Viral isolations corrected for efficiency of submission/100,000 for Jan-Apr.



**Figure 5.0** – Circulation of DENV-3 in 2002 between January and April at left. In the right a crude map of the principal land commercial routes outing of Salvador.

**Table 1.0** – Multiple linear regression using DENV-3 as a dependent variable and distance, people flow, DENV-1 and DENV-2 as independent variables.

\* 1 Predictors: (Constant), Distance; 2 Predictors: (Constant), Distance, Flow; 3 Predictors: (Constant), Distance, Flow, DENV-1; 4 Predictors: (Constant), DIST, Flow, DENV-1, DENV-2.

Model*	R	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Sig. F Change (p)	ANOVA
1	0,395	0,156	0,138	0,004	0,004
2	0,483	0,234	0,202	0,032	0,002
3	0,530	0,281	0,235	0,087	0,001
4	0,540	0,292	0,230	0,398	0,003

DENV-1; 4 Predictors: (Constant), DIST, Flow, DENV-1, DENV-2.

**Table 2.0** – Final model due to R<sup>2</sup> adjusted having DENV-3 as dependent variable.

\* Predictors: (Constant), Distance, Flow, DENV-1.

Model	R	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Sig. F Change (p)	ANOVA
Distance*	0,530	0,281	0,235	0,087	0,001

## DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

A identificação de determinantes da circulação e transmissão do vírus da dengue em uma dada população pode auxiliar na geração de modelos que possam prever a ocorrência de epidemias e até mesmo a gravidade de doença existente. Ainda hoje, a disseminação de doenças infecciosas permanece como um dos grandes problemas para saúde pública mundial e mais atualmente como conhecimento importante em biodefesa e bioterrorismo. O conhecimento da disseminação de um agente infeccioso é de fundamental importância para medidas de contenção, prevenção de surtos e dimensionamento de investimentos em assistência necessária nos serviços de atendimento à saúde e a população. Estudos para entendimento da dinâmica de agentes infecciosos têm ainda sido limitados e pouco robustos. Esta área da epidemiologia é de importância muito grande pelo potencial retorno que pode trazer para as autoridades de saúde e diretamente para a sociedade.

Um estudo realizado na Tailândia determinou que a mobilidade da população ou o movimento individual pode ser responsável pela introdução e ocorrência de múltiplos sorotipos em uma dada região e conseqüentemente sua disseminação para localidades próximas (ENDY *et al.*, 2002). Em adição, o aumento do tráfego aéreo, e o avanço deste tipo de transporte, juntamente com a globalização podem levar humanos infectados no período de incubação a introduzir novos sorotipos e até mesmo novos genótipos em novas regiões (GIBBONS & VAUGHN, 2002). Trabalhos têm proposto modelos interessantes



para a transmissão do vírus da dengue em uma população humana constante e população variável de vetor onde eles determinaram que a redução da população de vetor é a forma mais eficaz de combater a transmissão e disseminação do vírus da dengue (ESTEVA & VARGAS, 1998; 1999).

Desde sua introdução na Bahia em 1987 (VASCONCELOS *et al.*, 2000), o DENV tem se constituído como sério problema de saúde pública sendo necessário o conhecimento de quais fatores podem estar influenciando sua circulação no estado.

Um aspecto de extrema importância é a possibilidade dos conhecimentos adquiridos com este trabalho serem aplicados no entendimento da disseminação de outros agentes infecciosos auxiliando na contenção de epidemias que possam ter impacto importante na saúde pública de um modo geral. A oportunidade oferecida por este trabalho é única pela possibilidade de testar o padrão de disseminação do DENV-3 em outras regiões com dimensões similares as da Bahia. Aparentemente a co-circulação de outro sorotipo não influencia a introdução de um novo, já que não observamos infecções mistas (apesar deste fenômeno ser de difícil determinação por **IFA**) pelo método que utilizamos. Este aspecto constitui um fato de importância muito grande de acordo com a principal teoria de patogênese da FHD, pois a co-circulação de mais de um sorotipo implica na chance aumentada de ocorrência de quadros graves de infecção pelo vírus da dengue (HALSTEAD, 1988).

A introdução e disseminação do DENV-3 no estado da Bahia se iniciou provavelmente pela cidade de Salvador, sendo seguida por uma dispersão rápida para outras cidades influenciada principalmente pelo fluxo de pessoas e pela distância da capital.

Os sorotipos DENV-1 e DENV-2 não se correlacionaram de maneira significativa com distância e fluxo, este fato reforça a hipótese de que Salvador possivelmente foi o ponto de introdução ou disseminação do DENV-3 em 2002. Os sorotipos que já circulavam antes de 2002 sofriam influência principalmente do perfil imune da população onde eles circulavam não apresentando um padrão que pudesse ser interpretado. Como já foi dito, com a introdução do DENV-3 ocorreu um padrão claramente visível que se disseminava de forma radial tendo como Salvador como ponto inicial.

Estudos como este são de fundamental importância para o melhor entendimento de como agentes infecciosos se disseminam em nosso meio. A possibilidade de geração de um modelo matemático que possa antecipar a provável introdução do DENV-4 terá uma utilidade muito grande pela potencialidade de poder ser utilizado em outras doenças infecciosas.

Em conclusão, nossos dados demonstram um possível padrão de disseminação de um dado agente infeccioso que eventualmente seja introduzido pela capital do estado da Bahia (Salvador). É importante destacar que este tipo de conhecimento pode ter um impacto muito grande em nível global principalmente

pelo aumento no transporte de pessoas por conta de mudanças sócio-econômicas como globalização, guerras e etc., podendo oferecer uma grande contribuição para epidemiologia local e global.

## CONCLUSÕES

1. A introdução do DENV-3 ocorreu possivelmente por Salvador com uma disseminação para outras cidades do Estado em menos que 30 dias;
2. Dada sua correlação com distância do sítio de introdução e fluxo de veículos o mecanismo de disseminação foi possivelmente o movimento de pessoas saindo de Salvador;
3. Aparentemente outros sorotipos circulantes não inibem a introdução de um novo sorotipo, apesar de infecções mistas não terem sido encontradas;
4. Um modelo para a antecipação da possível introdução do DENV-4 e para o efeito de diferentes intensidades de outros sorotipos circulantes pode agora ser desenvolvido.

## Referências Bibliográficas

BARBAZAN, P.; YOKSAN, S.; GONZALEZ, J. P. "Dengue Hemorrhagic Fever Epidemiology in Thailand: Description and Forecasting of Epidemics." **Microbes Infect** 4(7): 699-705, 2002.

BRISENO-GARCIA, B.; GOMEZ-DANTES, H.; ARGOTT-RAMIREZ, E.;  
MONTESANO, R.; VAZQUEZ-MARTINEZ, A. L.; IBANEZ-BERNAL, S.;  
MADRIGAL-AYALA, G.; RUIZ-MATUS, C.; FLISSER, A.; TAPIA-CONYER, R.  
"Potential Risk for Dengue Hemorrhagic Fever: The Isolation of Serotype Dengue-3 in Mexico." **Emerg Infect Dis** 2(2): 133-5, 1996.

DA CUNHA, R. V.; MASPERO, R. C.; MIAGOSTOVICH, M. P.; DE ARAUJO, E. S.; LUZ DDA, C.; NOGUEIRA, R. M.; SCHATZMAYR, H. G. "Dengue Infection in Paracambi, State of Rio De Janeiro, 1990-1995." **Rev Soc Bras Med Trop** 30(5): 379-83, 1997.

DUARTE DOS SANTOS, C. N.; FRENKIEL, M. P.; COURAGEOT, M. P.; ROCHA, C. F.; VAZEILLE-FALCOZ, M. C.; WIEN, M. W.; REY, F. A.; DEUBEL, V.; DESPRES, P. "Determinants in the Envelope E Protein and Viral Rna Helicase Ns3 That Influence the Induction of Apoptosis in Response to Infection with Dengue Type 1 Virus." **Virology** 274(2): 292-308, 2000.

ENDY, T. P.; NISALAK, A.; CHUNSUTTIWAT, S.; LIBRATY, D. H.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L.; VAUGHN, D. W.; ENNIS, F. A. "Spatial and Temporal Circulation of Dengue Virus Serotypes: A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand." **Am J Epidemiol** 156(1): 52-9, 2002.

ESTEVA, L.; VARGAS, C. "Analysis of a Dengue Disease Transmission Model." **Math Biosci** 150(2): 131-51, 1998.

ESTEVA, L.; VARGAS, C. "A Model for Dengue Disease with Variable Human Population." **J Math Biol** 38(3): 220-40, 1999.



FIGUEIREDO, L. T. "The Brazilian Flaviviruses." **Microbes Infect** 2(13): 1643-9, 2000.

FIGUEIREDO, L. T.; BATISTA, W. C.; KASHIMA, S.; NASSAR, E. S. "Identification of Brazilian Flaviviruses by a Simplified Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Method Using Flavivirus Universal Primers." **Am J Trop Med Hyg** 59(3): 357-62, 1998.

FIGUEROA, R.; RAMOS, C. "Dengue Virus (Serotype 3) Circulation in Endemic Countries and Its Reappearance in America." **Arch Med Res** 31(4): 429-30, 2000.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. "Dengue: An Escalating Problem." **Bmj** 324(7353): 1563-6, 2002.

GUBLER, D. J. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." **Clin Microbiol Rev** 11(3): 480-96, 1998.

GUBLER, D. J. "The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases as Public Health Problems." **Arch Med Res** 33(4): 330-42, 2002.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. "Mosquito Cell Cultures and Specific Monoclonal Antibodies in Surveillance for Dengue Viruses." **Am J Trop Med Hyg** 33(1): 158-65, 1984.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. "Advances in Dengue Diagnosis." **Clin Diagn Lab Immunol** 3(6): 621-7, 1996.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. "Dengue: An Update." **Lancet Infect Dis** 2(1): 33-42, 2002.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. "Dengue Diagnosis, Advances and Challenges." **Int J Infect Dis** 8(2): 69-80, 2004.

HALSTEAD, S. B. "Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology." **Science** 239(4839): 476-81, 1988.

HARRIS, E.; VIDEA, E.; PEREZ, L.; SANDOVAL, E.; TELLEZ, Y.; PEREZ, M. L.;  
CUADRA, R.; ROCHA, J.; IDIAQUEZ, W.; ALONSO, R. E.; DELGADO, M. A.;  
CAMPO, L. A.; ACEVEDO, F.; GONZALEZ, A.; AMADOR, J. J.; BALMASEDA, A.  
"Clinical, Epidemiologic, and Virologic Features of Dengue in the 1998 Epidemic in  
Nicaragua." **Am J Trop Med Hyg** 63(1-2): 5-11, 2000.

INNIS, B. L.; NISALAK, A.; NIMMANNITYA, S.; KUSALERDCHARIYA, S.;  
CHONGSWASDI, V.; SUNTAYAKORN, S.; PUTTISRI, P.; HOKE, C. H. "An  
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Characterize Dengue Infections Where  
Dengue and Japanese Encephalitis Co-Circulate." **Am J Trop Med Hyg** 40(4):  
418-27, 1989.

JELINEK, T. "Dengue Fever in International Travelers." **Clin Infect Dis** 31(1): 144-  
7, 2000.

JELINEK, T.; MUHLBERGER, N.; HARMS, G.; CORACHAN, M.; GROBUSCH, M.  
P.; KNOBLOCH, J.; BRONNER, U.; LAFERL, H.; KAPAUN, A.; BISOFFI, Z.;

CLERINX, J.; PUENTE, S.; FRY, G.; SCHULZE, M.; HELLGREN, U.; GJORUP, I.;  
CHALUPA, P.; HATZ, C.; MATTEELLI, A.; SCHMID, M.; NIELSEN, L. N.; DA  
CUNHA, S.; ATOUGUIA, J.; MYRVANG, B.; FLEISCHER, K. "Epidemiology and  
Clinical Features of Imported Dengue Fever in Europe: Sentinel Surveillance Data  
from Tropneteurop." **Clin Infect Dis** **35**(9): 1047-52, 2002.

KAO, C. L.; WU, M. C.; CHIU, Y. H.; LIN, J. L.; WU, Y. C.; YUEH, Y. Y.; CHEN, L.  
K.; SHAIQ, M. F.; KING, C. C. "Flow Cytometry Compared with Indirect  
Immunofluorescence for Rapid Detection of Dengue Virus Type 1 after  
Amplification in Tissue Culture." **J Clin Microbiol** **39**(10): 3672-7, 2001.

KEATING, J. "An Investigation into the Cyclical Incidence of Dengue Fever." **Soc  
Sci Med** **53**(12): 1587-97, 2001.

KLIKS, S. C.; NISALAK, A.; BRANDT, W. E.; WAHL, L.; BURKE, D. S. "Antibody-  
Dependent Enhancement of Dengue Virus Growth in Human Monocytes as a Risk  
Factor for Dengue Hemorrhagic Fever." **Am J Trop Med Hyg** **40**(4): 444-51, 1989.

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." **J Clin Microbiol** **30**(3): 545-51, 1992.

LEI, H. Y.; YEH, T. M.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; CHEN, S. H.; LIU, C. C. "Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection." **J Biomed Sci** **8**(5): 377-88, 2001.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. "Emerging Flaviviruses: The Spread and Resurgence of Japanese Encephalitis, West Nile and Dengue Viruses." **Nat Med** **10**(12 Suppl): S98-S109, 2004.

MCBRIDE, W. J.; BIELEFELDT-OHMANN, H. "Dengue Viral Infections; Pathogenesis and Epidemiology." **Microbes Infect** **2**(9): 1041-50, 2000.

MIAGOSTOVICH, M. P.; NOGUEIRA, R. M.; SCHATZMAYR, H. G.; LANCIOTTI, R. S. "Molecular Epidemiology of Den-2 Virus in Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **93**(5): 625-6, 1998.

MORENS, D. M.; HALSTEAD, S. B.; LARSEN, L. K. "Comparison of Dengue Virus Plaque Reduction Neutralization by Macro and 'Semi-Micro' Methods in Llc-Mk2 Cells." Microbiol Immunol **29**(12): 1197-205, 1985.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; CUNHA, R. V.; ZAGNE, S. M.; GOMES, F. P.; NICOL, A. F.; COELHO, J. C.; SCHATZMAYR, H. G. "Fatal Primary Dengue Infections in Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg **93**(4): 418, 1999.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; SCHATZMAYR, H. G. "Isolation of Dengue Virus Type 2 in Rio De Janeiro." Mem Inst Oswaldo Cruz **85**(2): 253, 1990.



NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G.; DOS SANTOS, F. B.; DE ARAUJO, E. S.; DE FILIPPIS, A. M.; DE SOUZA, R. V.; ZAGNE, S. M.; NICOLAI, C.; BARAN, M.; TEIXEIRA FILHO, G. "Dengue in the State of Rio De Janeiro, Brazil, 1986-1998." Mem Inst Oswaldo Cruz **94**(3): 297-304, 1999.

NOGUEIRA, R. M.; ZAGNER, S. M.; MARTINS, I. S.; LAMPE, E.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. "Dengue Haemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome (Dhf/Dss) Caused by Serotype 2 in Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **86**(2): 269, 1991.

PINHEIRO, F. P. "Dengue in the Americas. 1980-1987." Epidemiol Bull **10**(1): 1-8, 1989.

PINHEIRO, F. P. (1998). Emergence of Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas. Pan American Health Organization. Washington, D.C.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. "Global Situation of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, and Its Emergence in the Americas." World Health Stat Q **50**(3-4): 161-9, 1997.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; DE MESA, M. T.; NOGUEIRA, R. M.; DA ROSA, A. T. "Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas." Virology **230**(2): 244-51, 1997.

RIGAU-PEREZ, J. G.; AAYALA-LOPEZ, A.; VORNDAM, A. V.; CLARK, G. G. "Dengue Activity in Puerto Rico During an Interepidemic Period (1995-1997)." Am J Trop Med Hyg **64**(1-2): 75-83, 2001.

RIGAU-PEREZ, J. G.; AYALA-LOPEZ, A.; GARCIA-RIVERA, E. J.; HUDSON, S. M.; VORNDAM, V.; REITER, P.; CANO, M. P.; CLARK, G. G. "The Reappearance of Dengue-3 and a Subsequent Dengue-4 and Dengue-1 Epidemic in Puerto Rico in 1998." Am J Trop Med Hyg **67**(4): 355-62, 2002.

RIGAU-PEREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P.; SANDERS, E. J.; VORNDAM, A. V. "Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever." **Lancet** **352**(9132): 971-7, 1998.

ROCHE, R. R.; ALVAREZ, M.; GUZMAN, M. G.; MORIER, L.; KOURI, G. "Comparison of Rapid Centrifugation Assay with Conventional Tissue Culture Method for Isolation of Dengue 2 Virus in C6/36-Ht Cells." **J Clin Microbiol** **38**(9): 3508-10, 2000.

ROSEN, L.; DROUET, M. T.; DEUBEL, V. "Detection of Dengue Virus Rna by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in the Liver and Lymphoid Organs but Not in the Brain in Fatal Human Infection." **Am J Trop Med Hyg** **61**(5): 720-4, 1999.

ROSEN, L.; GUBLER, D. "The Use of Mosquitoes to Detect and Propagate Dengue Viruses." **Am J Trop Med Hyg** **23**(6): 1153-60, 1974.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. "Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever." **Virology** 257(1): 1-6, 1999.

SHURTLEFF, A. C.; BEASLEY, D. W.; CHEN, J. J.; NI, H.; SUDERMAN, M. T.; WANG, H.; XU, R.; WANG, E.; WEAVER, S. C.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K. L.; BARRETT, A. D. "Genetic Variation in the 3' Non-Coding Region of Dengue Viruses." **Virology** 281(1): 75-87, 2001.

SOLER, M.; GUZMAN, M. G.; MUNE, M.; KOURI, G. "[Identification Using Indirect Immunofluorescence Technic of Various Strains of Dengue Isolated During the Epidemic of Nicaragua in 1985]." **Rev Cubana Med Trop** 40(3): 5-12, 1988.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C.; BARRETO, M. L.; BARRETO, F. R. "[Epidemiology of Dengue in Salvador-Bahia, 1995-1999]." **Rev Soc Bras Med Trop** 34(3): 269-74, 2001.

VASCONCELOS, P. F.; DE MENEZES, D. B.; MELO, L. P.; PESSO, E. T.; RODRIGUES, S. G.; DA ROSA, E. S.; TIMBO, M. J.; COELHO, I. C.;

MONTENEGRO, F.; DA ROSA, J. F.; ET AL. "A Large Epidemic of Dengue Fever with Dengue Hemorrhagic Cases in Ceara State, Brazil, 1994." **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **37**(3): 253-5, 1995.

VASCONCELOS, P. F.; MOTA, K.; STRAATMANN, A.; SANTOS-TORRES, S.; DA ROSA, A. P.; TAVARES NETO, J. "[a Dengue Epidemic in Ipupiara and Prado, Bahia. A Seroepidemiologic Survey]." **Rev Soc Bras Med Trop** **33**(1): 61-7, 2000.

VASCONCELOS, P. F.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; DE FREITAS, R. B.; DEGALLIER, N.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. "[Outbreak of Classical Fever of Dengue Caused by Serotype 2 in Araguaiana, Tocantins, Brazil]." **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **35**(2): 141-8, 1993.

VAZQUEZ, S.; LEMOS, G.; PUPO, M.; GANZON, O.; PALENZUELA, D.; INDART, A.; GUZMAN, M. G. "Diagnosis of Dengue Virus Infection by the Visual and Simple Aubiodot Immunoglobulin M Capture System." **Clin Diagn Lab Immunol** **10**(6): 1074-7, 2003.

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A. D.; WATOWICH, S. J.; GUBLER, D. J.;

WEAVER, S. C. "Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic

Dengue Viruses." **J Virol** **74**(7): 3227-34, 2000.