



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**Aspectos epidemiológicos e moleculares da transmissão
da dengue no estado da Bahia**

PAULO ROBERTO SANTANA DE MELO

**Salvador - Bahia - Brasil
2009**



004463

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**Aspectos epidemiológicos e moleculares da transmissão
da dengue no estado da Bahia**

Paulo Roberto Santana de Melo

Orientador: Mitermayer Galvão dos Reis

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Patologia Humana e Experimental.

Salvador – Bahia – Brasil

2009



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M528a Melo, Paulo Roberto Santana de
Aspectos epidemiológicos e moleculares da transmissão da dengue na Bahia
[manuscrito] / Paulo Roberto Santana de Melo. - 2009.
102 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório de Patologia e
Biologia Molecular.

1. Dengue. 2. Epidemiologia Molecular. 3. Filogenia. 4. Vírus da Dengue. I.Título.

CDU 616.91:614.4(813.8)


“Aspectos Epidemiológicos e Moleculares da Transmissão da Dengue no Estado da Bahia”


PAULO ROBERTO SANTANA DE MELO

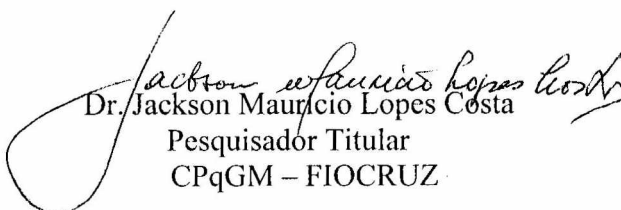
FOLHA DE APROVAÇÃO

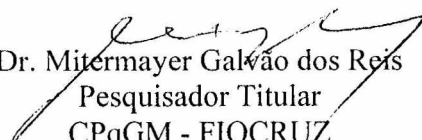
COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira
Pesquisador Titular
IOC – FIOCRUZ


Dra Maria da Conceição Chagas de Almeida
Pesquisador Assistente
CPqGM – FIOCRUZ


Dr. Edson Duarte Moreira Júnior
Pesquisador Titular
CPqGM – FIOCRUZ


Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa
Pesquisador Titular
CPqGM – FIOCRUZ


Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

*"O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto; a sabedoria é humilde
por não saber mais."*

William Cowper

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me abençoado da forma como o fez durante toda a minha vida permitindo 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 no LPBM;

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

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

Aos companheiros do LPBM com os quais dividi as bancadas, alegrias e dificuldades do dia-a-dia;

A todos do CPqGM que em diversos momentos são a única família que temos;

A FIOCRUZ, CNPq e a FAPESB 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

Lista de abreviaturas.....	i
Lista de Tabelas e figuras.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
1.0 – Introdução.....	1
1.1 - Revisão da Literatura.....	2
1.1.2 - O vírus da Dengue: Epidemiologia e dinâmica de transmissão no mundo.....	2
1.1.2.1 – Aspectos da dengue no Brasil e no estado da Bahia.....	11
1.1.3 - Importância dos Métodos Disponíveis para o Diagnóstico da Dengue.....	17
1.1.3.1 - Vigilância epidemiológica: diagnóstico sorológico, isolamento viral e técnicas moleculares.....	18
1.1.3.2 - O mosquito <i>Aedes aegypti</i> : dispersão e potencial epidemiológico.....	22
2.0 - Objetivos.....	24
3.0 - Justificativa.....	25
4.0 - Manuscritos.....	27
5.0 - Discussão e Perspectivas.....	80
6.0 – CONCLUSÕES.....	85
7.0 - Referências Bibliográficas.....	86
8.0 - Anexos.....	96

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/FD – febre da dengue

FHD/DHF – febre hemorrágica da dengue

SCD/DSS – síndrome de choque da dengue

IIP – índice de infestação predial

IB – índice de Breteau

RNA – ácido ribonucléico

DNA – ácido dextrorribonucléico

RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

F_{is} , F_{st} – coeficiente de endogamia

Lista de Tabelas e Figuras

Figura 1.0 – Tradução e processamento da poliproteína de flavivírus.....	5
Figura 2.0 - Fatores de risco para FHD/SCD: Aspecto integrado.....	7
Figura 3.0 - Casos reportados de FD/FHD pela OMS de 1992-2000.....	8
Figura 4.0 - Distribuição global dos sorotipos do vírus da dengue.....	9
Figura 5.0 - Distribuição Mundial do <i>Aedes aegypti</i> e ocorrência da dengue em 2001.....	10
Figura 6.0 – Introdução do DENV-1 e DENV-2 e dispersão destes sorotipos no território brasileiro até 1994.....	15
Figura 7.0 – Mapa do Estado da Bahia com localização dos municípios de Ipuiara e Prado.....	18
Figura 8.0 – Casos notificados por mês na Bahia entre 2002 e 2007.....	19
Figura. 9.0 – Imunofluorescência indireta em células C6/36 de <i>A. albopictus</i>	21
Figura 10 – Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> entre 1930 e 1998.....	25

Resumo

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES DA TRANSMISSÃO DA DENGUE NO ESTADO DA BAHIA. **PAULO ROBERTO SANTANA DE MELO.** Neste trabalho foram avaliados três importantes aspectos da dengue na Bahia. Inicialmente, determinamos a distribuição dos sorotipos do vírus no estado da Bahia durante 2001, 2002 e 2003 baseando-se nos isolamentos virais realizados pelo Laboratório Central do Estado (LACEN). 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). 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 de amostras da capital, Salvador, e os 5% restantes foram do município de Lauro de Freitas conurbado à mesma, onde se situa o aeroporto de Salvador. Em fevereiro de 2002, a epidemia estava distribuída em cidades onde as três principais rodovias dão acesso. A distribuição do DENV-3 em 2002 foi distintamente diferente dos sorotipos circulantes na Bahia refletindo a introdução de um novo sorotipo no estado provavelmente por Salvador. A fim de obter informações sobre as cepas de DENV circulantes foi realizada entre 2006 e 2007 vigilância molecular a partir das amostras isoladas pelo LACEN. Baseado nos resultados de sequenciamento da junção das proteínas E/NS1 de 32 amostras foram demonstrados os genótipos Indiano e Asiático para os sorotipos DENV-3 e DENV-2, respectivamente. DENV-2 apesar de em toda a América ter sido relacionado com a ocorrência de FHD, na Bahia sua introdução não causou aparecimento dessa forma da doença. Interessantemente, as amostras estudadas para DENV-3 agruparam-se com isolados de anos muito diferentes apesar de os valores de *bootstrap* significativos (acima de 70%), adicionalmente, amostras de diferentes locais do Brasil e América do Sul agruparam-se muito próximas das testadas, confirmando o potencial epidêmico deste genótipo viral. Finalmente, foi aplicada uma abordagem no estudo da estrutura genética da população de *Aedes aegypti* em Salvador através da utilização de marcadores de microssatélites. Após *primers* previamente publicados terem sido testados e falharem com nossas amostras, novos marcadores foram testados e desenvolvidos. Amostras de *Aedes aegypti* foram

coletadas no entorno da Baía de Todos os Santos. Foram definidas três regiões geográficas, Norte, Central e Sul de Salvador a fim de testarmos a hipótese de isolamento geográfico das populações de *Aedes aegypti* através do valor de *Fst*. Os valores de *Fst* foram determinados entre Norte-Central 0,0073; Sul-Norte entre 0,0182 e Central-Sul 0,0011. Apesar de um pequeno valor de *Fst*, encontrou-se uma relação direta entre distância geográfica e estes valores, indicando que distância pode ser um fator limitante para fluxo gênico desse vetor em Salvador. Os resultados indicam que outros obstáculos além da distância podem existir na cidade de Salvador evidenciado pelo valor de *Fst* entre Norte-Central. Os novos marcadores de microssatélites descritos em nosso trabalho poderão ser utilizados na composição de uma ferramenta de entomologia molecular para estudos de estrutura genética de população de *Aedes aegypti* no ambiente urbano em diferentes localidades.

Abstract

EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF DENGUE TRANSMISSION IN THE BAHIA STATE. **PAULO ROBERTO SANTANA DE MELO**. In this work were evaluated three important issues of the dengue in Bahia. It was determined the serotypes distribution between 2001, 2002 and 2003 based in the viral isolation for the State Central Laboratory (LACEN). In 2001, 169 DENV-1 were isolated and 53 of DENV-2. In 2002 123 DENV-1, 50 DENV-2 and the new appearance of the DENV-3 (273 isolating) were isolated. In January of 2002, with DENV-1 and DENV-2 been detected in all state, 95% of all isolating was from Salvador, and only 5% were from Lauro de Freitas close to the capital, where the airport is located. In February of 2002, the outbreak occurred in different cities following the main roads pattern. The DENV-3 distribution in this period was very different of the previous serotypes circulating indicating the introduction of a new virus probably through Salvador. To investigate DENV strains circulating in Bahia state, we did molecular surveillance between 2006 and 2007 of the samples analyzed by LACEN. Based in the sequencing results of the junction of the E/NS1 proteins of 32 samples were determined that Indian and Asia West genotypes for the DENV-3 and DENV-2 respectively. The relationship between this DENV-2 genotype and FHD found in all America Continent was not present in Bahia state. In other hand, of the DENV-3 samples studied were clustered with isolates from different years with high bootstrap values (higher than 70%), Additionally, samples from different places in Brazil and South America were closely related, confirming that this strain have a very high epidemic power causing outbreaks since of its introduction. Finally, was applied a strategy to study the genetic structure of

Aedes aegypti in Salvador applying microsatellite markers. After test markers previously published which failed in our hands, new markers were tested and developed and samples of *Aedes aegypti* were collected around the All Saints Bay. Three regions were defined as North, Central and South of Salvador, and the hypothesis of geographic isolation was tested based in the *Fst* values. These values were determined between North-Central 0.0073; South-North 0.018, and Central-South 0.0011, respectively. The results indicate that obstacles further distance could be present in Salvador showed by the *Fst* values. The potential of these new microsatellite markers to be applied as a molecular entomological tool in population genetic studies of *Aedes aegypti* in urban landscape like Salvador in future studies.

1.0 - INTRODUÇÃO

A dengue permanece como uma das arboviroses de maior importância para saúde pública global. Quase três bilhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de infecção pelo vírus da dengue em diferentes países, quase na sua totalidade situados em regiões tropicais ou subtropicais cujos centros urbanos sofrem com a expansão desordenada e falta de condições adequadas de moradia. O principal vetor da dengue em nosso meio é o mosquito *Aedes aegypti* que através de diversas campanhas já chegou a ser considerado erradicado de boa parte do continente Americano, entretanto, hoje quase toda a América é infestada por este mosquito (Wilder-Smith & Gubler 2008).

Estudos têm sido realizados a fim de se entender fatores epidemiológicos, genéticos (tanto do vírus quanto do hospedeiro) e ambientais os quais podem influenciar na ocorrência de epidemias com quadros graves da doença. A infecção pelo vírus da dengue pode levar a ocorrência de dengue clássica, febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD). Diversos países têm registrado casos graves como FHD. A grande epidemia de Cuba, em 1981, foi um dos primeiros episódios de FHD nas Américas seguido por outros países como Venezuela e Brasil (Pinheiro 1989). Poucos trabalhos, no entanto, têm descrito a dinâmica de circulação viral em uma dada região, os sorotipos ou cepas virais que podem estar envolvidos nessa dinâmica e como o movimento do principal vetor, *Aedes aegypti*, pode influenciar nesses diferentes aspectos. Observações deste tipo são de extrema importância pela possibilidade de antecipação do impacto decorrente da introdução e co-circulação de diferentes sorotipos em uma determinada região, pela possibilidade de em tempo real monitorar eventos

importantes como a introdução de novas cepas virais. Uma característica importante é a compreensão da complexa dinâmica de população do *Aedes aegypti* com o objetivo futuro de determinar o impacto dos programas de controle nas populações de mosquito; com o potencial de auxiliar no redimensionamento das medidas de prevenção em saúde pública.

1.1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 – O vírus da Dengue: Epidemiologia e dinâmica de transmissão no mundo

O vírus da dengue (DENV) é do gênero *Flavivirus* da família *Flaviridae* sendo agente etiológico da febre da dengue (FD) e da ameaçadora febre hemorrágica da dengue (FHD) que pode evoluir para a 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 se expandiu nos últimos anos aumentando gradativamente o número de casos em muitos países inclusive no Brasil, com conseqüências alarmantes como o crescimento do número de casos graves muito observado nas últimas epidemia ocorridas no nosso país (Rigau-Perez et al., 1998; Teixeira Mda et al., 2002; Nogueira et al., 2005; Nogueira et al., 2008).

O genoma deste vírus é composto por uma fita única de RNA (RNA positivo), com aproximadamente 11Kb (quilobases) codificando três proteínas estruturais e sete não estruturais como demonstrado na **Figura 1.0** (Whitehead et al., 2007). 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 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) 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 (Halstead et al., 1970; Kliks et al., 1989).

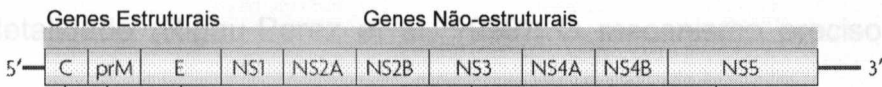


Figura 1.0 – Organização genômica de flavivírus. Adaptado de Whitehead et al., Nature Reviews 2007.

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. 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* (Wilder-Smith & Gubler 2008). O período de incubação intrínseca varia de três a quinze dias, sendo em média de cinco a seis dias, podendo ocorrer 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). A febre não diferenciada pode 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 recebam tratamento correto e oportuno, como também de se expressar com pouco ou nenhum sintoma.

A emergência da febre hemorrágica da dengue (FHD) fez com que a dengue se tornasse uma das mais importantes arboviroses nas últimas duas décadas. Tem sido estimado que ocorram cerca de 250 a 500 mil casos de FHD a cada ano, 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) 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, febre amarela entre outras viroses. 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 SCD (Lei et al., 2001).

(Rocha et al., 2002). Outros trabalhos têm avaliado diferentes aspectos, como por

exemplo. 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. O desenvolvimento das formas clínicas graves na dengue depende de múltiplos fatores como demonstrado na **Figura 2.0**.

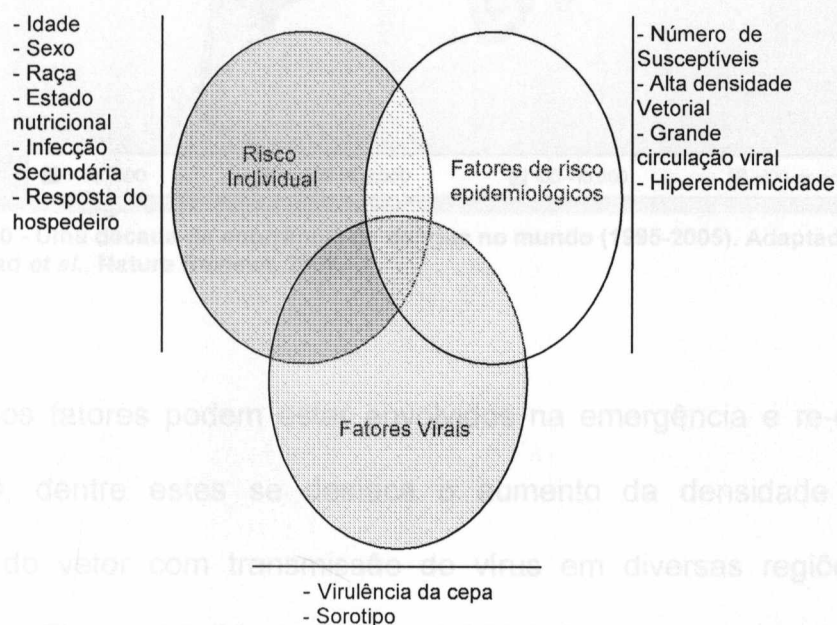


Figura 2.0 –Fatores de risco para FHD/SCD: Aspecto integrado. Adaptado de Gúzman 2002.

Nos últimos 10 anos a incidência da dengue tem crescido tanto nas áreas endêmicas, particularmente nas Américas, quanto em outras localidades do mundo com a ocorrência de casos (**Figura 3.0**). No Vietnã um estudo tipo caso-controle evidenciou variações em diferentes genes não ligados a HLA no qual evidenciou-se uma forte associação entre um alelo menos freqüente associado com proteção

(Loke et al., 2002). Outros trabalhos tem avaliado diferentes aspectos, como por exemplo ancestralidade, assim como outros genes como um fator protetor para FHD (Acioli-Santos et al., 2008; Blanton et al., 2008).

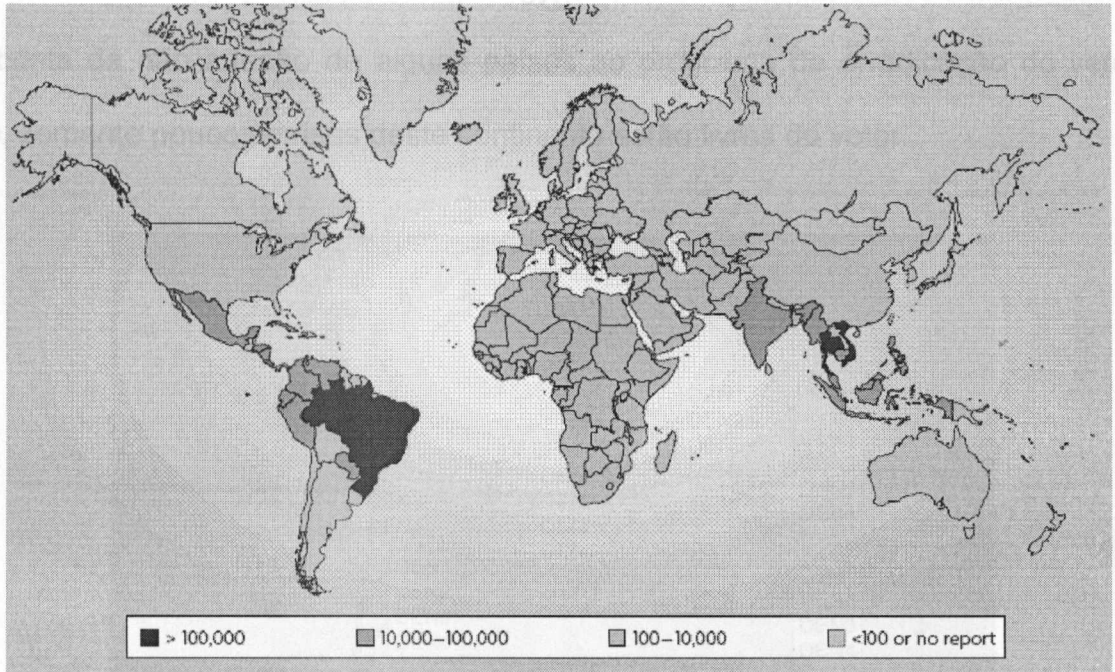


Figura 3.0 - Uma década de ocorrência de dengue no mundo (1995-2005). Adaptado de Whitehead et al., Nature Reviews 2007.

Diversos fatores podem estar envolvidos na emergência e re-emergência da FD e FHD, dentre estes se destaca o 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 demografia mundial justificam-no, particularmente com o crescimento da população global juntamente com urbanização não planejada resultando em moradias com condições inapropriadas e com inadequados sistemas de abastecimento de água.

A situação epidemiológica é mais agravada pela deterioração dos sistemas de saúde e dos programas de controle de mosquitos nos principais países endêmicos.

O continente americano oferece um exemplo singular confirmando esta 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 (Figueiredo 2000). Entretanto, durante as décadas de 60 e 70 o *Ae. aegypti* re-infestou a América Central e do Sul por conta da não adesão de alguns países ao programa de erradicação do vetor. Hoje, somente poucos países deste continente estão livres do vetor.

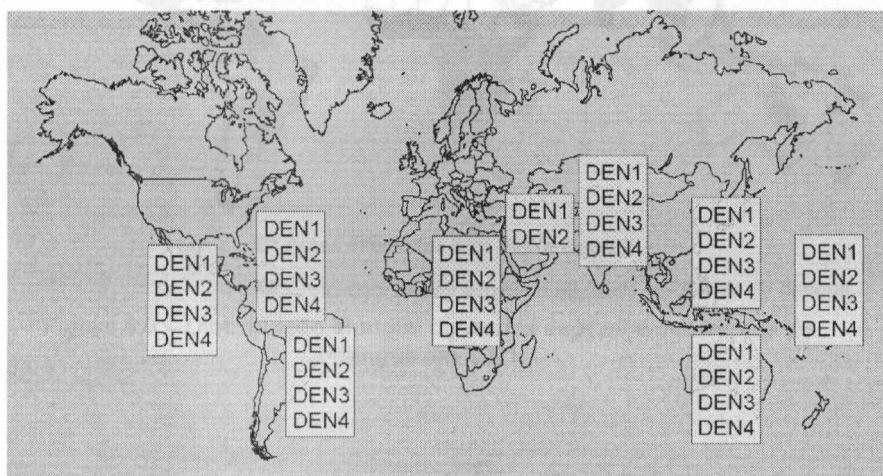


Figura 4.0 – Distribuição global dos sorotipos do vírus da dengue. Adaptado de Mackenzie et al., Nature 2004.

O aumento do transporte aéreo com a globalização, permitindo que pessoas viagem rapidamente entre grandes distâncias, tem também possibilitado o movimento de diferentes sorotipos, cepas, e até mesmo genótipos do vírus de uma região para outra (Jelinek et al., 2002). Indivíduos no período de incubação ou na fase virêmica (até o quinto dia do aparecimento dos sintomas) são capazes de introduzir um novo genótipo ou 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). Fatores que facilitam o contato entre o vetor e o hospedeiro favorecem o aumento da transmissão do

DENV, dentre estas mudanças climáticas são destacadas e importantes. A **Figura 5.0** demonstra as áreas infestadas com *Ae. aegypti* e com atividade epidêmica do vírus da dengue distribuída por todo o mundo.

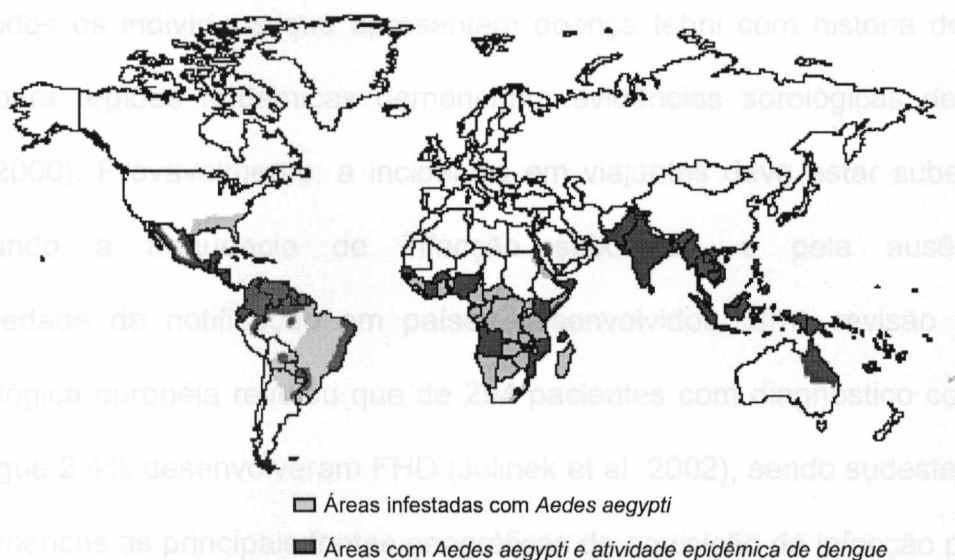


Figura 5.0 – Distribuição Mundial do *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em 2001.

A Tailândia, por exemplo, foi atingida por grandes 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 da dengue 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). Outro problema enfrentado na Tailândia é que apesar do controle vetorial ser realizado, esta estratégia tem falhado principalmente nos períodos interepidêmicos, quando diminui o interesse da população em auxiliar neste combate, o que impede o sucesso das campanhas de erradicação do vetor (Barbazan et al. 2002), um problema certamente importante no Brasil.

Países que originalmente não são afetados por esta flavivirose como Alemanha e Reino Unido, têm descrito 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). Provavelmente, a incidência em viajantes deve estar subestimada, considerando a frequência de infecção subclínica, e pela ausência 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 principais 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. Entretanto, 1981 se tornaria um marco na ocorrência de quadros graves da infecção com a experiência de Cuba. 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. Foram notificados 344.203 casos de FD e FHD/SCD, destes 10.312 casos foram classificados entre os graus II e IV de intensidade segundo a OMS. Com 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 *Ae. aegypti* implementado pelas autoridades de saúde pública em Cuba. Após esta campanha a ilha se tornou teoricamente livre do mosquito em

1997, quando outra epidemia ocorreu em Santiago de Cuba, com 2946 casos de FD, chegando a 205 casos de FHD e 12 mortes, todas em adultos.

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 (Rigau-Perez et al., 2002). No início de 1985 três sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-4) co-circularam, produzindo epidemias locais anualmente. Durante pelo menos três anos esses sorotipos co-circularam neste país, com a predominância de cada um por 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 somente voltou a ser isolado 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.

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). Em 1989 a segunda maior epidemia de dengue nas Américas ocorreu na Venezuela. Os primeiros casos foram diagnosticados em outubro daquele ano, alcançando seu pico em janeiro de 1990 declinando abruptamente a partir deste período. 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 faixa 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, e o diagnóstico 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). Entre 1990 e 1994, ocorreram pequenas epidemias na Colômbia a cada ano, mas desde 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).

1.1.2.1 – Aspectos da dengue no Brasil e no estado da Bahia

No Brasil o vírus da dengue é a principal flavivirose responsável por epidemias. 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 (Rego 1872). 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 *Ae. aegypti* iniciada por Oswaldo Cruz em 1904, com o suporte da Fundação Rockefeller a partir de 1920, 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 (Osanaí et al., 1986). 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. O início de epidemias de dengue no país pode ser correlacionado com ressurgimento do *Ae. aegypti* após sua erradicação.

Nos últimos 20 anos tem sido descritos muitas epidemias de dengue no Brasil com a dispersão do vírus e de seu vetor para praticamente todas as regiões, principalmente nas 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 6.0** deu-se início a uma grande epidemia causada pelo DENV-1, com o vírus encontrando uma população extremamente susceptível. Cerca de 95.000 casos foram registrados até 1987, com a possibilidade de 3.000.000 de pessoas terem sido infectadas 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. Uma questão importante foi a velocidade com a qual o vírus se disseminou, mesmo com necessidade imposta pela dengue de um vetor necessário para sua transmissão. Foram registradas epidemias nos estados de Alagoas, em junho de 1986, e Ceará em setembro do mesmo ano, com a ocorrência de aproximadamente 50.000 casos de dengue entre 1986 e 1993 (Vasconcelos et al., 1995).

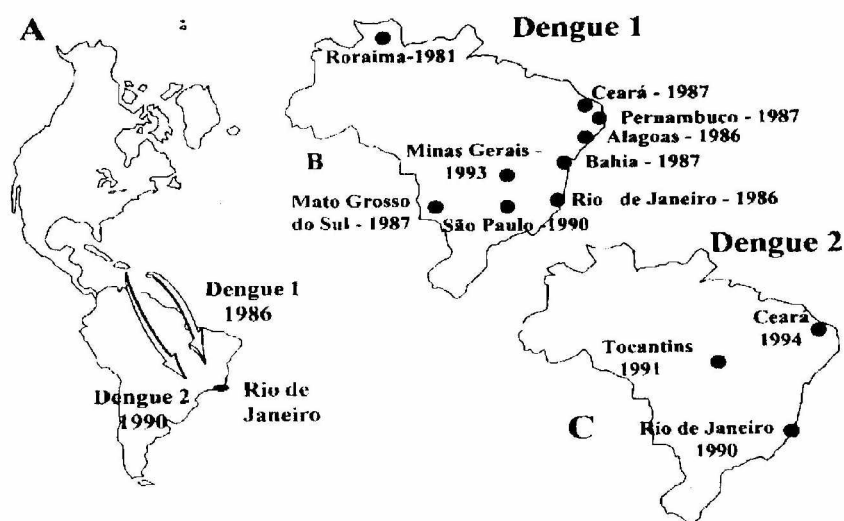


Figura 6.0 – Dinâmica de circulação do vírus da dengue no Brasil. A: Introdução do DENV-1 em 1986 e do DENV-2 em 1990 no Brasil; B e C: Cidades onde estes dois sorotipos circularam no território brasileiro até 1994. Adaptado de Figueiredo, *Microbes and Infection*, 2, 2000.

Em abril de 1990 uma nova epidemia iniciou-se na região metropolitana do Rio de Janeiro, neste evento 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. 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 circulavam nesse momento foi determinada através de sequenciamento dos genomas virais e análises filogenéticas. O DENV-1 isolado pertencia a cepa Caribenha e o DENV-2 a era uma 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 6.0**.

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 dessa década, 530.578 casos foram registrados, e em 1999, 208.000 casos (Figueiredo 2000). Um dado intrigante é o fato da maior parte dos casos de dengue no Brasil até esse momento não tinham sido notificados casos graves da doença, somente 795 ocorrências de FHD/SCD foram reportados até 1998 com uma letalidade de 5%, provavelmente associado com a subnotificação dos casos graves, ou a influência do *background* genético de nossa população com relação a nossa ancestralidade (Loke et al. 2002; Blanton et al. 2008). Provavelmente, a maior parte dos casos de FHD/SCD estivesse associada com infecções secundárias pela dinâmica dos sorotipos circulantes no país, e com epidemias sucessivas com diferentes sorotipos, 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).

Na Bahia, em 1987 foi registrado o primeiro caso de dengue do estado na cidade de Ipuíara, localizada na região da chapada Diamantina. Neste evento foi introduzido o DENV-1. Provavelmente, pela rápida mobilização das autoridades de saúde pública com relação as medidas de contenção necessárias, esta epidemia permaneceu circunscrita à zona urbana deste município (Vasconcelos et al., 2000). Neste surto ocorreram 623 casos que foram notificados, correspondendo a uma taxa de incidência em torno de 24 casos por 100 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, na cidade de Prado, nas regiões limítrofes com Espírito Santo e Minas Gerais (Vasconcelos et al. 2000). Em contraste com evento de Ipuíara, a epidemia de Prado caracterizou-se pela rápida disseminação do vírus com a ocorrência de casos em outros municípios, e a partir desse evento o DENV-2 passou a estar presente em todo o estado. A **Figura 7.0** demonstra a localização geográfica destes dois municípios. 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.

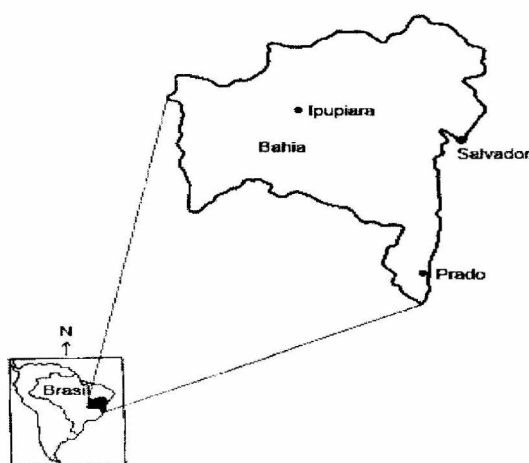


Figura 7.0 – Mapa do estado da Bahia com localização dos municípios de Ipuíara e Prado. Adaptado de Vasconcelos et al., Rev Soc Bras Med Trop. 2000.

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, provavelmente este sorotipo deve ter sido re-introduzido. A partir de então, se estabeleceu um ambiente favorável para ocorrência de epidemias com formas graves da doença, devido a circulação simultânea de mais de um sorotipo do vírus. Estes dois sorotipos circularam ativamente na Bahia com prevalência maior do DENV-1 quando comparado com DENV-2 em diversos municípios principalmente no ano de 2001 (SESAB). Aspectos como alta taxa de infestação pelo mosquito *Aedes aegypti* em quase todas as municipalidades existentes na Bahia e grande número de indivíduos susceptíveis ao DENV-1 favorecem essa intensa circulação da dengue na Bahia. Anualmente são notificados milhares de casos de FD em praticamente todas as cidades do estado como apresentado na **Figura 8.0**.

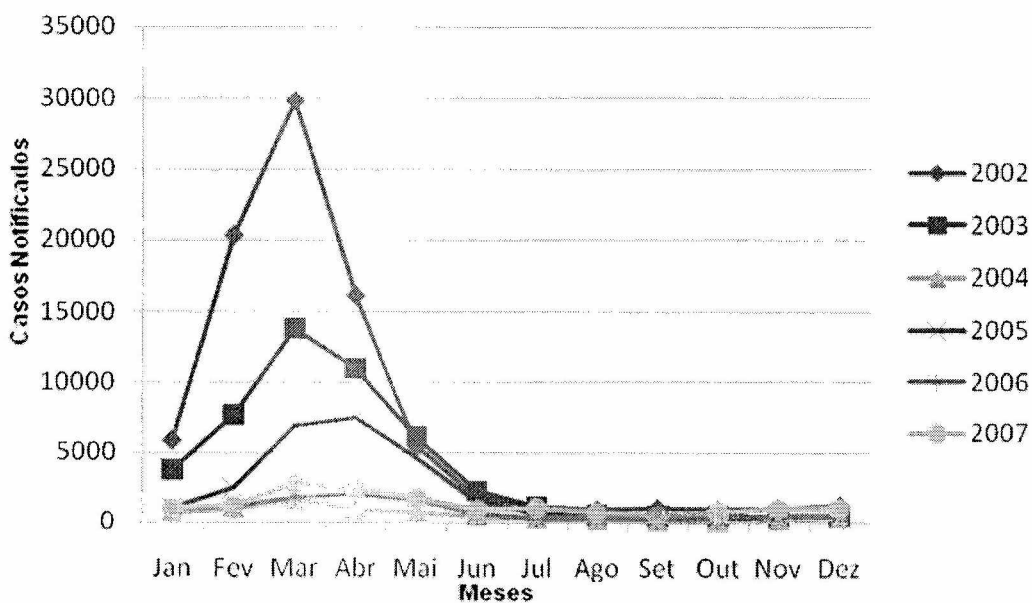


Figura 8.0 – Casos notificados por mês entre 2002 e 2007.

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

Antes de 2002 não foram notificados 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 epicentro em Salvador onde ocorreram praticamente 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 entre outras, que possuem um risco para a ocorrência de epidemias de FHD. A Bahia, assim como outras regiões do Brasil, apresenta fatores relacionados com surtos tais como mais de um sorotipo circulando, indivíduos susceptíveis e alta densidade vetorial.

1.1.3 - Importância dos Métodos Disponíveis para o Diagnóstico da Dengue

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 Brasil. São também de extrema importância os dados epidemiológicos juntamente com avaliação clínica adequada associada com o diagnóstico laboratorial.

1.1.3.1 – Vigilância epidemiológica: diagnóstico sorológico, isolamento viral e técnicas moleculares

Em indivíduos que nunca tiveram contato com o vírus da dengue, durante uma infecção primária é produzido 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 elevados mesmo durante a fase aguda da infecção secundária, aumentando nas duas semanas seguintes, 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 IgM anti-dengue 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 (que surge a partir do quinto dia após início dos sintomas tendo seu pico no 11º dia).

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).

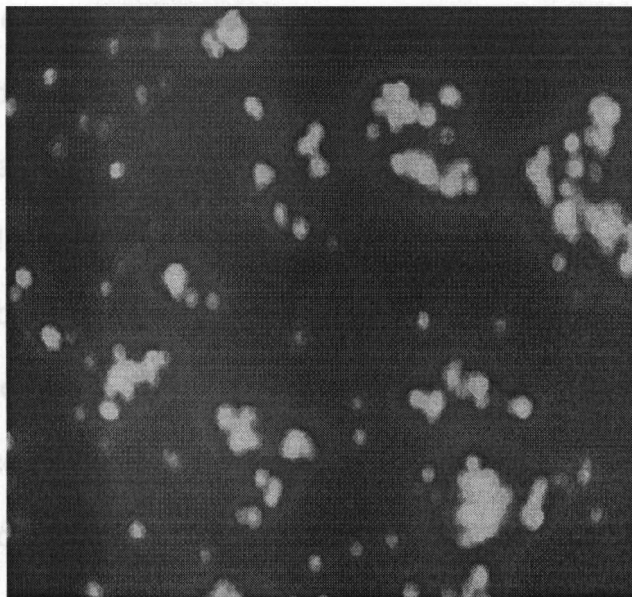


Figura 9.0 – Imunofluorescência indireta em células C6/36 de *A. albopictus*.

Pelos riscos existentes utilizando-se inoculação direta em mosquitos vivos, têm sido preferencialmente empregadas linhagens celulares de mosquitos para rotina diagnóstica de isolamento viral. Diferentes clones celulares podem ser usados no isolamento viral, entretanto, a linhagem celular cultivada de *Aedes albopictus* (C6/36) se tornou a célula hospedeira de escolha para rotina laboratorial (ver **Figura 9.0**), muito embora a linhagem celular AP61 de *Aedes pseudoscutellaris* também seja útil no isolamento viral. Uma mudança simples na técnica utilizando células C6/36 com adição de uma centrifugação rápida após a inoculação do vírus pode aumentar em até 16,6% a sensibilidade deste método diminuindo o tempo necessário para a sorotipagem (Roche et al., 2000). Células de mamíferos em cultura podem ser empregadas tais como células VERO, LLC-MK2 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 (Gubler et al., 1984). Mesmo assim, algumas cepas de vírus não são facilmente detectadas pelo nível baixo de replicação viral, neste caso é recomendado uma ou duas passagens em cultura de células para amplificar a quantidade de vírus (Soler et al., 1988). Trabalhos têm demonstrado também 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).

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 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.

As ferramentas de biologia molecular são também úteis para estudos relacionados com evolução e mudanças na virulência de cepas virais relacionadas com mutações no genoma do vírus. Alguns trabalhos têm utilizado métodos para análise de genomas de DENV-2 diretamente de amostras de pacientes e 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 favorecendo 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, além disso, aumenta a sensibilidade para a detecção do vírus.

As técnicas moleculares permitem identificar diferentes genótipos em um mesmo sorotipo e isso pode ser exemplificado com o evento de 1981 em Cuba. Naquele momento, a cepa asiática do DENV-2 (subtipo III ou Ásia-América) foi introduzido nas Américas (Twiddy et al., 2002). Outro exemplo são as Filipinas onde dois genótipos de DENV-2 foram detectados circulando simultaneamente (Salda et al., 2005). Vigilância em nível molecular permite a determinação de marcadores de virulência viral. Diferentes trabalhos investigaram a relação entre alterações no genoma viral que podem se correlacionar com variações na patogênese da doença (Leitmeyer et al., 1999). Essas alterações podem modificar diferentes aspectos da

dinâmica viral no organismo como capacidade de invasão celular, replicação viral e evasão do sistema imunológico.

1.1.3.2 – O mosquito *Aedes aegypti*: dispersão e potencial epidemiológico

A história das epidemias de dengue em todo mundo, e consequentemente no Brasil, revela como uma doença que mesmo tendo a necessidade de um vetor em seu ciclo de transmissão possui uma alta atividade. Essa característica da dengue pode ser atribuída a alta adaptação do *Aedes aegypti* ao ambiente de desorganização urbana encontrado em países em desenvolvimento, como Brasil e países do Sudeste Asiático, dando à dengue um poder epidêmico confirmado pelas inúmeras epidemias ocorridas nos últimos anos. A transição demográfica com a migração maciça da população do campo para as grandes cidades, junto com o abandono dos programas de controle em diferentes países por falta de recursos, somando-se à desorganização ou ineficácia dos sistemas de saúde, permitiu que em cerca de 60 anos o *Aedes aegypti* reinfestasse a América como demonstrado na

Figura 10.



Figura 10 – Distribuição do *Aedes aegypti* entre 1930 e 1998.
Adaptado de Gubler, *Clinical Microbiology Review* 1998.

Atualmente o Brasil possui um programa de combate a dengue, conhecido como PNCD (Programa Nacional de Combate a Dengue), como a maior parte dos países nas Américas. Dentre as diferentes diretrizes desse plano está o combate ao mosquito *Aedes aegypti* com diferentes abordagens. Entretanto, todas elas têm o objetivo fundamental de redução populacional do vetor da doença no domicílio e peridomicílio – principais locais nos quais ocorre a transmissão. Um aspecto interessante e lacunar do programa é a falta de informações acerca do impacto dos programas de controle na população do *Aedes aegypti* e como o potencial de reinfestação do mosquito influencia na expansão do vetor para novas áreas. O acesso a esse tipo de informação é virtualmente difícil pelas ferramentas utilizadas como índice de infestação predial (IIP) ou índice de Breteau (IB). Diferentes aspectos podem ter impacto na estrutura populacional do *Aedes aegypti*, como, por exemplo, ações do programa de controle, pluviosidade, temperatura ou pela troca de genes entre diferentes subpopulações (Paupy et al., 2004; Yebakima et al., 2004).

Muitos trabalhos têm aplicado diferentes ferramentas de biologia molecular para estudos de dinâmica de população de *Aedes aegypti* e outros insetos. Eles aplicaram polimorfismos de isoenzimas, RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) e marcadores de microssatélites (Huber et al., 1999; Chambers et al., 2007; da Costa-Ribeiro et al., 2007). Dentre estes marcadores, podemos destacar a aplicação dos microssatélites como uma das mais interessantes. Estes marcadores são úteis por serem altamente polimórficos, neutros e de herança mendeliana, representando assim uma ferramenta poderosa para estudos genéticos de população (Bruford & Wayne 1993; Viard et al., 1996). Eles foram utilizados com êxito para estudos genéticos de

população em insetos domésticos (Gertsch et al., 1995; Estoup et al., 1996) e em vetores de importância médica tal como *Anopheles* (Lanzaro et al., 1995), *Glossina* (Solano et al., 1997; Solano et al., 2000), *Simulium* (Dumas et al., 1998) e em um outro estudo com *Ae. aegypti* (Ravel et al., 2001).

Diferentes abordagens podem ser empregadas utilizando microssatélites como marcadores genéticos de diferenciação populacional. Um estudo avaliou a influência de criadouros na estrutura genética de populações de *Ae. aegypti* no Camboja (Paupy et al. 2004). No Rio de Janeiro diferença genética entre populações de mosquitos foi detectada utilizando microssatélites e isoenzimas (da Costa-Ribeiro et al., 2006). Variação temporal em populações de *Ae. Aegypti* também foi investigada a partir de marcadores genéticos no Vietnã (Huber et al., 2002).

2.0 - Objetivos

2.1 - Geral

Avaliar aspectos epidemiológicos e moleculares da transmissão do vírus da dengue no estado da Bahia.

2.1.2 - Específicos

- 1 - Avaliar a dinâmica de introdução e disseminação do DENV-3 e dos demais sorotipos previamente existentes na Bahia em 2002;
- 2 - Determinar genótipos circulantes do vírus da dengue no estado da Bahia entre 2006 e 2007;
- 3 – Estudar a existência de estrutura genética de população de *Aedes aegypti* na cidade de Salvador.

3 - Justificativa

A dengue atualmente se constitui a arbovirose de maior impacto na saúde pública em diferentes países de todo o mundo. Epidemias têm ocorrido de forma cíclica atingindo milhões de pessoas como a observada no Rio de Janeiro mais recentemente. Diferentes lacunas ainda existem no entendimento dessa doença. Uma delas diz respeito a como o vírus se dissemina em diferentes regiões. Determinar um padrão na dinâmica de circulação seguida por um dado sorotipo é uma oportunidade ímpar em saúde pública pelo potencial deste tipo de informação. Com a introdução do DENV-3 na Bahia em 2002, criou-se uma possibilidade de avaliar a introdução de um sorotipo não circulante no estado a fim de observar como este evento pode ser modulado pela existência de sorotipos já circulantes, e de como os sorotipos passaram a circular no ano seguinte. A obtenção dessas informações pode auxiliar no desenvolvimento de ferramentas que possam ser utilizadas em modelagem matemática, além de possivelmente auxiliar na prevenção ou orientação diante de epidemias.

Uma questão importante com relação a vigilância epidemiológica contra a dengue é saber quais os sorotipos e genótipos circulantes em uma dada região. Tem sido demonstrado em diferentes locais no mundo que as cepas do vírus da dengue podem variar com relação ao seu potencial epidêmico. Isso foi demonstrado pela total expansão do genotipo III do DENV-3 (Sri Lanka/Índia) em diferentes países se estabelecendo e substituindo genótipos pré-existentes. É fundamental a implementação de vigilância molecular, com uma abordagem epidemiológica, considerando que a introdução de novas variantes virais em uma área com outros sorotipos circulantes constitui-se em um fator de risco importante para a ocorrência

de epidemias de FHD/SCD (Domingo et al., 2004). Nesse sentido, uma metodologia de vigilância molecular em tempo-real deve estar disponível em regiões como a Bahia, onde uma situação de hiperendemicidade foi estabelecida com um alto índice de infestação vetorial e mais de um sorotipo circulante. Um passo importante para o estabelecimento de um protocolo rápido de vigilância é a descentralização dos laboratórios de referência, que levam muito tempo para responder às necessidades da rede de vigilância por estarem distantes geograficamente, além da sobrecarga de amostras em casos de surtos, inviabilizando uma resposta efetiva das autoridades de saúde pública.

No momento, devido a inexistência de uma vacina, a arma mais efetiva de combate a dengue é o controle do mosquito transmissor, o *Aedes aegypti*. O controle da população de mosquitos deve ser mantido para que epidemias possam ser evitadas ou pelo menos que as autoridades de saúde pública tenham conhecimento dos riscos da ocorrência de epidemias. Uma questão pouco estudada é como a população de mosquito se comporta diante dessas ferramentas de controle epidemiológico, além de como obstáculos geográficos e distância podem interferir nas possíveis movimentações ocorridas entre diferentes subpopulações em uma região. O conhecimento das variações da estrutura genética populacional de *Aedes aegypti* pode prover uma série de conhecimentos potenciais no auxílio para as campanhas de controle vetorial. Um aspecto importante é como populações de insetos se dispersam em diferentes situações geográficas. A utilização de marcadores genéticos tipo microssatélites pode permitir o acesso a esse tipo de conhecimento (da Costa-Ribeiro et al. 2006; da Costa-Ribeiro et al. 2007). Potencialmente podem ser identificadas populações divergentes, medir

indiretamente fluxo gênico, como também, no futuro avaliar o impacto dos programas de controle na estrutura genética de população de *Aedes aegypti*. É uma alternativa inovadora a utilização de uma ferramenta de biologia molecular na orientação de uma medida de controle importante contra a dengue.

4 - Manuscritos

4.1 - The dynamics of dengue virus serotype 3 introduction and dispersion in the state of Bahia, Brazil **Este trabalho foi desenvolvido através dos isolamentos do vírus da dengue nos anos de 2001, 2002 e 2003.**

Baseado na frequência de isolamentos padronizada, data do isolamento e localidade foi determinado o provável padrão de introdução e disseminação do DENV-3 em 2002. Com a capacidade de vôo do *Aedes aegypti* limitada a rápida disseminação viral foi provavelmente devido ao movimento humano de indivíduos infectados a partir de Salvador. Os resultados encontrados neste trabalho podem indicar o potencial padrão diante da introdução do DENV-4 por Salvador.

4.2 - Molecular surveillance of dengue virus in Bahia State, Brazil.

Neste trabalho são apresentados dados referentes a vigilância molecular para o vírus da dengue no estado da Bahia entre 2006 e 2007. Através da aplicação de primers degenerados para DENV, sequenciamento (junção entre proteínas E/NS1) e análise filogenética foram determinadas as cepas circulantes para os sorotipos DENV-2 e DENV-3. Baseado nos resultados de sequenciamento de 31 amostras foi demonstrado o genótipo Asiático para DENV-2 (Asian/American), e genótipo Indiano para o DENV-3 (genótipo III, Sri Lanka/India).

4.3 - *Aedes aegypti* gene flow in an urban setting based on new microsatellite markers.

Neste manuscrito são apresentados os resultados na determinação da existência de estrutura genética de população de *Aedes aegypti* na cidade de Salvador aplicando novos marcadores de microssatélites. Para o número de marcadores aplicados e o tamanho da amostra que foi estudada não foi determinada grande estrutura genética de população de *Ae. aegypti* na cidade de Salvador.

The dynamics of dengue virus serotype 3 introduction and dispersion in the state of Bahia, Brazil

Paulo Roberto Santana de Melo/*, Eliana Almeida Gomes Reis, Isolina Allen Ciuffo**,
Mônica Góes, Ronald Edward Blanton***, Mitermayer Galvão dos Reis/+

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-Fiocruz, R. Valdemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, BA, Brasil *Universidade Estadual de Santa Cruz, BA, Brasil **Laboratório Central do Estado da Bahia, Salvador, BA, Brasil ***Case University, Cleveland, OH, USA

By 2002, dengue virus serotype 1 (DENV-1) and DENV-2 had circulated for more than a decade in Brazil. In 2002, the introduction of DENV-3 in the state of Bahia produced a massive epidemic and the first cases of dengue hemorrhagic fever, based on the standardized frequency, timing and location of viral isolations by the state's Central Laboratory, DENV-3 probably entered Bahia through its capital, Salvador, and then rapidly disseminated to other cities, following the main roads. A linear regression model that included traffic flow, distance from the capital and DENV-1 circulation ($r^2 = 0.24$, $p = 0.001$) supported this hypothesis. This pattern was not seen for serotypes already in circulation and was not seen for DENV-3 in the following year. Human population density was another important factor in the intensity of viral circulation. Neither DENV-1 nor DENV-2 fit this model for 2001 or 2003. Since the vector has limited flight range and vector densities fail to correlate with intensity of viral circulation, this distribution represents the movement of infected people and to some extent mosquitoes. This pattern may mimic person-to-person spread of a new infection.

Key words: dengue - emerging diseases - surveillance - *Aedes aegypti* - public health - modeling

Dengue viruses are mosquito-borne RNA viruses of the Flaviviridae family. The four closely related serotypes (DENV-1-4) are thought to represent at least three independent introductions into human populations 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 and one of the most serious health problems affecting tropical and subtropical regions of the Americas (McBride & Bielefeldt-Olmann 2000, Guzman & Kouri 2002). All four serotypes cause dengue fever (DF), a febrile illness characterized by severe joint and muscle pains, and in some cases, the potentially fatal dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). The wide 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 yearly (Mackenzie et al. 2004).

Consistent with this, dengue viruses are the most common, important *Flavivirus* causing human disease in Brazil (Guglielmo 2000). In the last 14 years, Brazil has accounted for nearly 70% of the 3,141,850 reported cases of DF in the Americas in the last five years (PAHO 2003). Some viral serotypes and the mosquito vector are now distributed throughout the country, and dengue outbreaks occur in all regions, especially the most populated areas, such as in the state of Bahia (BA). By the

end of 2001, BA had only experienced epidemics with DENV-1 and DENV-2. Both of which were actively circulating when DENV-3 was introduced in 2002 and produced the first cases of DHF in BA. In 1987, DENV-1 was isolated for the first time in BA in the city of Ipupiara, located in the center of the state (the Chapada Diamantina region) (Vasconcelos et al. 2000). A second serotype, DENV-2, was introduced in 1995 in the extreme south of the state, although its exact point of introduction was not identified. During these initial epidemics in BA, the dynamics of introduction and subsequent spread of the infection could not be followed state-wide, since the necessary public health protocols and the mechanism for viral isolation were not available. These were introduced in 1995 with development of a special unit at the state of Bahia's Central Laboratory (LACEN) for DENV isolation. In this study, we used the information from viral isolations at the LACEN from 2001 to 2003 to assess the dynamics of circulation of DENV serotypes in BA before, during and after the first introduction of DENV-3.

MATERIALS AND METHODS

Study site - BA is the fifth-largest Brazilian state in territorial extension and comprises 6.64% of the total area of the country. BA has 13,323,212 inhabitants with nearly 25% concentrated in the metropolitan area close to Salvador, the state's capital. Approximately 69% of the state is considered arid or semi-arid. By contrast, the 1,183 km long coastline is generally tropical and humid. Urbanization in BA is marked by concentration of the overwhelming part of the urban population in the capital, thus making Salvador the only city in the state whose population exceeds 500,000. Nevertheless, the state is also characterized by the dispersion of the population in hundreds of smaller urban centers. In the last two de-

Financial support: Fiocruz/PDTSP, CNPq, NIH(AI056263-01)

Corresponding author: mitermayer@cpqgm.fiocruz.br

Received 29 May 2007

Accepted 28 November 2007

ades, there has been explosive growth of medium-sized urban centers (cities with more than 100,000 inhabitants). This has strengthened interurban networks and facilitated individual movements for commerce and migration. Although the majority of the state's territory is agricultural, there is a good level of infrastructure with electricity and paved roads throughout most of its area.

Sampling - For administrative and epidemiologic purposes, the state is divided into municipalities, which are the basic reporting unit for the State Secretariat of Health (SSH). Dengue is a reportable disease in Brazil. The secretary of health in each municipality is responsible for collecting serum from each suspected case of dengue within five days of onset of symptoms, and sending this on to the LACEN for viral isolation and serology. All data were obtained directly from the LACEN or online public databases of the Brazilian government in 2004. In the analysis, the simplifying assumptions were made that the only difference between municipalities was the frequency with which serum was collected from suspected cases, and errors were not systematic, but random.

Viral isolation - Viral isolation was performed by inoculation of an *Aedes albopictus* C6/36 cell line with 25 μ l of undiluted acute serum. The cell line was then incubated for seven days at 32 °C in Leibovitz's medium supplemented with 5% fetal calf serum. After fixation to slides in quadruplicate with cold buffered acetone, the cells were incubated with serotype-specific monoclonal antibodies for each of the four serotypes followed by fluorescein conjugated anti-mouse antibodies. The slides were then scored as positive or negative by fluorescent microscopy (Camier et al. 1984).

Statistical analysis - Since municipalities differed in their efficiency of submitting samples, a correction factor was calculated for each community for each month. The efficiency with which each municipality would send samples was calculated as the number of serum samples submitted for viral isolation divided by the number of cases notified for the month. The median efficiency for all municipalities was used to correct the

total number of isolates per 100,000 populations. Serum samples were to be collected within the first five days of presentation and transported to Salvador within 24 h. This was clearly not always possible, and cases often were identified after more than five days of symptoms. Availability of roads is not an obstacle to transportation of serum samples. In order to compare the numbers of DENV isolates obtained from different municipalities, the efficiency of sample submission was calculated as in the following equation:

$$\text{efficiency} = \text{frequency}/\text{median}$$

where frequency is the ratio between number of sample submitted for viral isolation and the number of dengue cases registered by the SSH, and median is the median ratio for all municipalities submitting samples. The efficiency of sample collection was then used to standardize the number of isolates per 100,000 population as calculated in the following equation:

$$\text{standardized number of isolates} = \text{efficiency} \times \text{recorded number of isolates} \times (\text{population} \times 10^{-5})$$

For this analysis, the standardized number of isolates/100,000 will be a proxy for the intensity of serotype-specific viral circulation. Log transformation was used to normalize the viral circulation intensity per municipality, the number of cases of dengue, number of samples arriving at the LACEN and the number of viral isolates. Distance from Salvador was normally distributed as assessed by probability-probability plots.

Viral circulation was plotted using the program Tabwin V. 3.0.1 (<http://www.datasus.gov.br/tabwin/download.htm>) from the Brazilian Ministry of Health. Data on the number of notified cases, municipal population sizes and *Ae. aegypti* infestation indices were provided by the BA-SSH through the Health Communication and Information Directorate (DICS). Demographic data for the state and municipalities was obtained from the National Census Bureau (IBGE, <http://www.ibge.gov.br>). Traffic flow data (mean number of vehicles passing per day), and distances from Salvador were obtained from the National Department of Infrastructure and Transportation. In BA, there are six electronic counting stations installed along the most important federal highways (Table 1). The data from municipalities that were directly on these routes were analyzed separately from those that were located nearby. Since no qualitative differences were noted in the results, data on traffic flow for municipalities on and near (< 20 km) the major highways was used.

Multiple linear, forward stepwise regression analysis was conducted to identify predictor variables with an inclusion criterion of $p < 0.15$. Traffic flow, distance from Salvador (putative site of introduction), other viral serotypes, population size and vector infestation indices (Surveillance Epidemiology Division from SSH) were used as independent variables to explain the intensity of DENV-3 circulation. The plot of the standardized residuals against the standardized predicted values showed no patterns by visual inspection, and the probability-probability plots were essentially linear for all regression analyses.

TABLE 1

Dengue virus serotype 3 (DENV-3) circulation^a in 2002 was associated with distance from Salvador, traffic flow and DENV-1 circulation in the state of Bahia

Model	Adjusted r ²	(p)	ANOVA
Distance from Salvador	0.138	0.001	0.001
Distance from Salvador, traffic flow ^b	0.202	0.032	0.002
Distance from Salvador, traffic flow, DENV-1	0.235	0.087	0.001

a: linear multiple regression on log-normalized circulation intensity for DENV-3 (standardized isolates/100,000 per municipality for 2002). Distance from Salvador, traffic flow on main highway and log-normalized circulation intensity for DENV-1 were independent variables; *b*: for communities > 50 km away from a monitored highway provided by the National Department of Infrastructure and Transportation measured as mean daily number of passing vehicles.

RESULTS

Characteristics of reporting - In 2002, the LACEN received samples from 58 of 417 municipalities in BA that also reported cases of dengue (Table II). DENV-1 or DENV-3 was isolated from 8% of the 4,711 samples received. DENV-3 isolates comprised 69% of the total. The number of samples per municipality arriving at the LACEN did not correlate with distance from Salvador ($r^2 = 0.01$), but the number of samples did correlate with the number of cases ($r^2 = 0.56$), and the number of cases correlated with the number of viral isolates ($r^2 = 0.54$). This analysis was performed with the values for Salvador removed. The inclusion of Salvador produced higher correlations (data not shown).

Temporal analyses - There was very active DENV-1 and DENV-2 transmission reflected in the number of viral isolates in January through April of 2001. This fell from a high of 403 in March to 23 by June (Fig. 1). Uneven and sporadic isolations continued through the end of the year. In January of 2002, there was a small rise in the total number of samples submitted (193), and only DENV-1 and DENV-2 were isolated early in the month. Significantly, on January 18, the first recorded isolation of DENV-3 in BA was obtained from an individual living in a suburb of Salvador. Later in the month, there was a single isolation from the municipality of Valença, 100 km south along the coast from Salvador. Isolation of all circulating serotypes continued to increase during February and March, but isolation of DENV-3 clearly reached epidemic proportions relative to the other serotypes. Viral isolations as well as dengue cases declined steeply in April 2002.

In 2003, the initial DENV-3 isolates appeared in February instead of January. Prior to obtaining a positive sample from Salvador at the end of March 2003, the virus was isolated from eight small communities (mean population $29,000 \pm 26,000$ each) on average ± 500 km from Salvador.

Spatial analyses - Samples were received for isolation from 15% (66/417) and 65% (417) of municipalities for both 2001 and 2002, while cases of dengue were reported from 81% (352/417) and 94% (391/417), respectively. In 2001, DENV-1 circulated as intensely in some distant municipalities as in Salvador (Fig. 2). DENV-2 circulated with much lower intensity and no

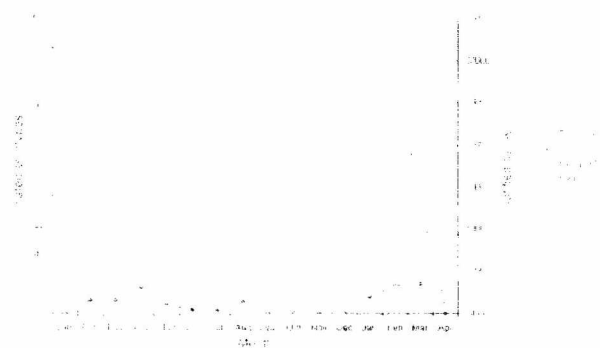


Fig. 1: monthly profile of dengue viral isolates and cases notified 2001 - 2003 in Bahia, Brazil.

DENV-3 was isolated. There is no indication that either virus might be distributed from a common source. Following its appearance in BA, DENV-3 circulated in many of the same municipalities as DENV-1 (Fig. 2), but Salvador is located at the center of this subsequent diffusion with the intensity of circulation generally decreasing inversely with distance from Salvador.

Following the initial isolation of DENV-3 near Salvador in January 2002, all but one of the DENV-3 isolates for the month were from Salvador as well. By February, DENV-3 was isolated from some of the most distant municipalities from Salvador (Fig. 3). The capital remained one of the most important foci throughout the rest of this quarter and remained a focus of circulation even as the epidemic waned in April. The pattern of isolations for DENV-1 and DENV-2 did not conform to this pattern in any year studied. The pattern of appearance of DENV-3 did not appear as an enlarging concentric ring around the capital, nor did it appear random within the state. An overlay of the principal highways of the state shows that these roadways extend through the municipalities from which DENV-3 was most isolated in 2002 (Fig. 4).

DENV-1 and DENV-3 in 2003 continued to circulate in generally overlapping areas, except that DENV-3 continued to be more intensely associated with Salvador than DENV-1. DENV-2 did not circulate in 2003 (data not shown), and there was no single predominant region for intensity of DENV-1 or DENV-3 circulation.

Relationship of traffic volume and distance to DENV-3 circulation - Since *Ae. aegypti*, the vector of the dengue virus, has a very short flight range, human movement is the principal method for spread of the disease by either taking infected individuals to uninfected mosquitoes or humans carrying infected mosquitoes to where there are uninfected people (McDonald 1977, Trpis & Hausermann 1986, Reiter et al. 1995, Getis et al. 2003, Huber et al. 2004, Harrington et al. 2005). If Salvador represented the initial focus and point of dissemination, the intensity of circulation in the state should be a function of distance from Salvador modified by the degree of human movement (migration and commercial) in the area. Linear regression was used to test this hypothesis. The log normalized intensity DENV-3 circulation was modeled with traffic flow along the main highway, distance from Salvador, log-normalized DENV-1 circulation intensity and DENV-2 circulation (Table III). The stepwise analysis revealed that a model that included (in order of significance) traffic flow and distance from Salvador produced an adjusted $r^2 = 0.278$ when direct traffic flow was used ($p = 0.031$, Table D). The model worsened with the addition of any other variable, and the r^2 was also reduced when flow estimates were assigned to municipalities near but not directly on routes with counting stations. The coefficients for traffic flow were positive, while those for distance from Salvador were negative. The inverse square of distance was also tested, but did not improve the correlation. When DENV-1 or DENV-2 was used as the dependent variable, neither showed any significant correlations with distance or traffic volume in 2001 or 2002 (Table IV). In 2003, DENV-2 did not circulate, and isolation of DENV-1 or DENV-3 did not correlate with any of the tested variables.

TABLE II
Origin and characteristics of samples sent to Bahia's Central Laboratory (LACEN), 2002

Municipality	Population	Distance ^a	Cases ^b	Samples ^c	Isolates	
					DENV-1 ^d	DENV-3 ^e
Alagoinhas	132873	107	546	59	2	6
Anguera	9039	146	119	21	0	1
Antônio Cardoso	11181	139	11	3	1	1
Apuarema	7268	353	65	3	0	1
Barra do Choça	44179	537	128	38	17	0
Barreiras	129321	857	223	29	10	1
Brumado	62616	654	41	12	7	0
Cachoeira	29863	119	103	6	0	1
Caculé	20871	762	16	4	1	0
Cairu	10609	308	22	2	0	0
Camaçari	171845	41	718	15	0	2
Cândido Sales	29557	595	144	19	1	1
Capela do Alto Alegre	19797	208	3	2	1	0
Cícero Dantas	31719	302	4	1	1	0
Coaraci	27176	442	44	5	0	0
Conceição da Feira	17818	119	35	8	2	1
Coração de Maria	24214	104	748	169	1	9
Cruz das Almas	51562	111	39	30	0	2
Feira da Mata	6212	964	8	23	10	2
Feira de Santana	496625	109	3214	809	12	13
Gandu	27307	290	41	6	1	0
Iebu	4964	181	7	4	1	0
Ipirá	12279	255	51	11	1	2
Ipirá	61551	202	69	7	1	1
Itaeté	13945	381	88	14	1	0
Itapetinga	58868	571	67	7	0	1
Ituaçu	17515	524	27	8	1	0
Ituberá	21886	308	58	21	1	0
Jaguarari	26627	398	179	1	0	1
Jequié	147713	358	591	16	1	1
Jitauna	21103	387	15	9	0	1
Juazeiro	184204	500	148	49	1	4
Laura de Freitas	122858	22	575	30	1	5
Macaúbas	43120	682	39	19	2	1
Miguel Calmon	28900	368	64	10	1	0
Monte Santo	55240	352	89	18	0	1
Morro do Chapéu	35068	386	43	8	1	0
Munizópolis	19257	291	19	21	2	0
Mutunópolis	20456	241	11	1	0	1
Piripá	17330	630	17	19	0	0
Poções	45555	444	5	1	0	0
Pojuca	26960	67	35	25	0	2
Prado	27311	787	37	2	0	0
Salvador	2520504	0	29309	2723	34	183
Salinas da Margarida	13154	229	60	3	0	2
Santo Antônio de Jesus	80111	185	0	16	0	1
São Miguel das Matas	10169	224	11	5	0	1
São Sebastião do Passé	19620	58	217	39	2	2
Sítio Dias	18003	205	12	5	0	0
Saúde	11509	353	7	1	0	1
Simões Filho	98598	22	1061	55	0	3
Taperoá	15699	282	15	4	1	0
Unaí	26710	116	8	5	0	1
Ubatuba	24411	369	28	3	1	0
Valença	79735	262	172	45	0	2
Vera Cruz	31382	289	143	20	0	3
Vitória da Conquista	270364	509	714	154	1	3
Wagner Pinheiro	15632	377	0	0	0	0

a: distance from Salvador in km; b: cases of dengue officially reported to the State Secretariat of Health; c: samples is the number of samples sent to the LACEN for processing; d: DENV-1 isolates is the number of samples producing this serotype; e: DENV-3 isolates is the number of samples producing this serotype. There were no DENV-2 isolates in 2002.

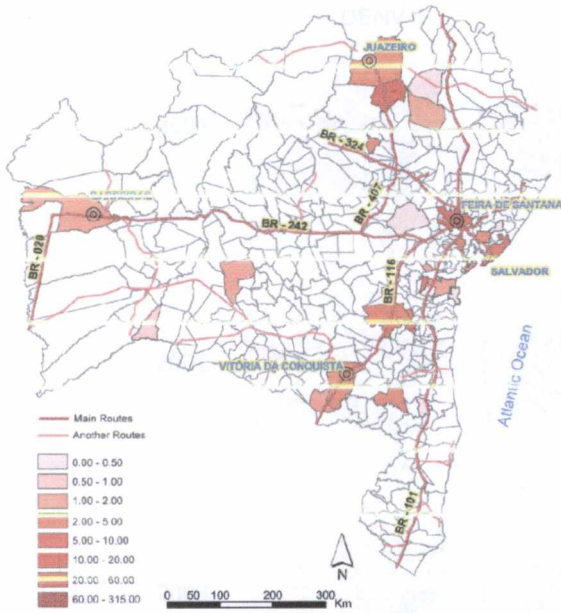


Fig. 4: main transportation routes and spatial distribution of dengue serotype 3 (DENV-3) intensity (standardized isolates/100,000) in Bahia, 2002.

fections. Thus, prior to the introduction of DENV-3, 69% of the population of Salvador was seropositive for at least one dengue virus (Teixeira et al. 2002). Viral isolation from clinical samples was instituted in the LACEN after DENV-1 and DENV-2 began to circulate, so that the 2002 epidemic was the first that could be tracked state-wide from its introduction. The institution of state-wide viral isolations was an essential tool in the epidemiology of this disease, since the registration of dengue cases alone does not allow for a reconstruction of what was occurring and how it occurred in the presence of multiple circulating serotypes.

Both time and space place the introduction of DENV-3 infection in Salvador in January 2002. For two weeks this serotype was only isolated from infected individuals in Salvador despite continued receipt of samples and isolation of other serotypes from all corners of BA. The next site for the dissemination of the virus was the transportation hub of Feira de Santana, 40 km west of the capital. In less than 30 days this virus was distributed to the rest of the state. Even after its introduction and dissemination, the capital remained the site of the most intense circulation of DENV-3, but not necessarily the other serotypes. The significant positive correlation with traf-

TABLE III
Distance and estimated traffic volume used for municipalities with DENV isolations, 2002

City	Traffic ^a	Distance ^b	City	Traffic	Distance
Alagoinhas	2357 ^c	107	Jequié	6863	358
Anguera	9525	146	Jitaúna	4530	387
Antônio Cardoso	9525	139	Juazeiro	3712	500
Apurema	7961	353	Lauro de Freitas	9525	22
Barra do Choça	6863	537	Macaúbas	3712	682
Barreiras	817	857	Miguel Calmo	-	368
Brumado	- ^d	654	Monte Santo	-	352
Cachoeira	2357	110	Morro do Chapeu	-	386
Caculé	-	762	Mundo Novo	3712	294
Cairu	2357	308	Mutuípe	2357	241
Camacan	2196	526	Piripá	-	630
Camaçari	9525	41	Poções	6863	444
Cândido Sale	6863	595	Pojuca	-	67
Capela do Alto Alegre	3712	208	Prado	-	787
Cícero Dantas	-	302	Salinas da Margarida	2357	229
Coaraci	2196	442	Salvador	9525	0
Conceição da Feira	2357	119	Santo Antônio DJ	2357	185
Coração de Maria	2357	104	São Miguel das Matas	2357	224
Cruz das Almas	2357	146	São Sebastião	9525	58
Dom Basílio	817	709	Sátiro Dias	-	205
Feira da Mata	817	964	Saúde	3712	353
Feira de Santana	9525	109	Simões Filho	9525	22
Gandu	2357	290	Taperoá	2357	282
Ichu	-	181	Uauá	-	416
Ipiaú	7961	355	Ubatuba	2196	369
Ipirá	817	202	Valença	2357	262
Itaeté	-	381	Varzedo	2357	189
Itapetinga	-	571	Vera Cruz	9525	289
Ituaçu	-	524	Vitória da C	6863	509
Ituberá	2357	308	Xique-Xique	-	577
Jaguarari	3712	398			

^a: mean daily volume as measured in 2001 by fixed electronic sensors at six stations (Table I); ^b: distance from Salvador; ^c: values in bold indicate municipalities directly on the monitored routes; ^d: municipalities too distant from monitored routes to estimate traffic flow.

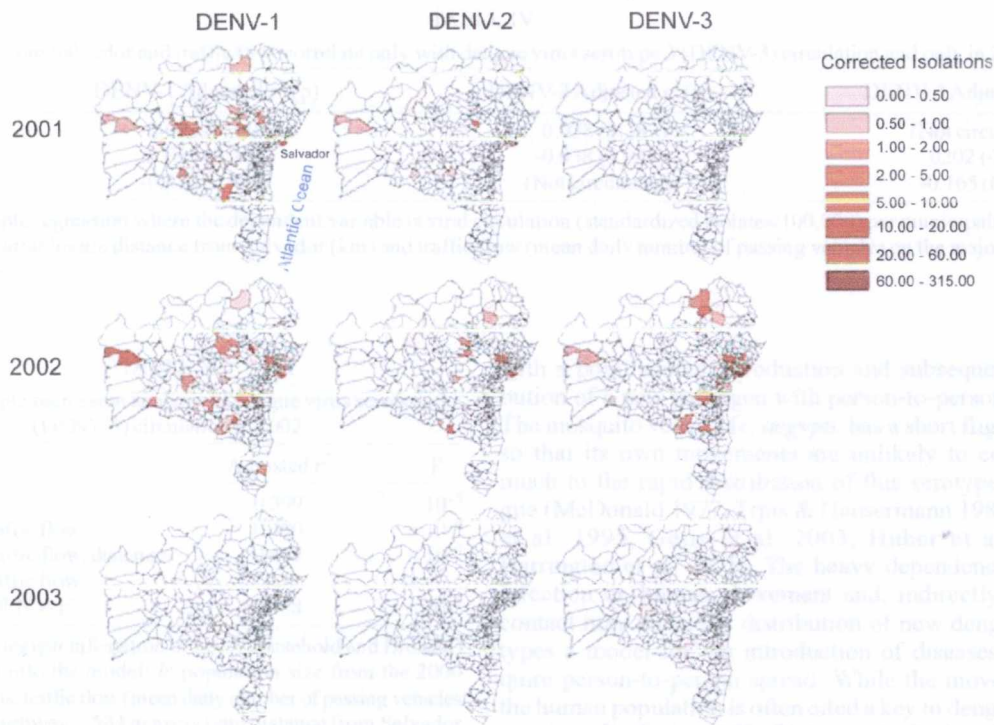


Fig. 2: comparison of yearly intensity of dengue virus serotypes circulation (DENV-1, 2 and 3) 2001 - 2003 in Bahia, Brazil. Maps of state of Bahia municipalities (www.datasus.gov.br/tabwin/tabwin.htm) by year and by serotype showing intensity of viral circulation (standardized number of viral isolations) indicated in legend.

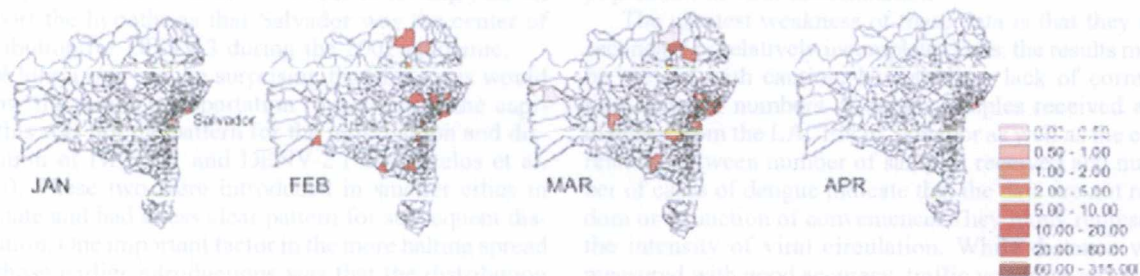


Fig. 3: comparison of monthly intensity of dengue serotype 3 (DENV-3) circulation (standardized isolates/100,000), Jan-Apr 2002 in Bahia, Brazil.

Additional factors associated with intensity of DENV-3 circulation - Traffic volume and distance from Salvador explain approximately 27% of the variation in DENV-3 circulation intensities in 2002. To assess the contribution of other factors, both population size and municipal vector infestation indices (household and Breteau) were included in the model. The size of the population had the largest effect of any variable, and produced a model with $r^2 = 0.565$, $p = 0.0003$ (Table V). The variables traffic volume, distance from Salvador and log of the standardized DENV-1 circulation also entered into the model, but neither of the infestation indices contributed. The r^2 was reduced when traffic volume was removed ($r^2 = 0.431$) or the estimated traffic volume for municipalities not directly on monitored routes was

used ($r^2 = 0.488$). Collinearity diagnostics showed that population and traffic volume were independent, and thus traffic volume was not merely a surrogate for population size. For this epidemic: $\text{DENV-3 circulation} = 0.663 + (0.574) \text{ population size} + (0.190) \text{ traffic volume} + (-0.266) \text{ distance from Salvador} + (0.158) \log_{10} \text{ other viral circulation}$.

DISCUSSION

The dengue epidemic of 2002 was the most severe yet experienced BA. The first recorded cases of DHF occurred during this period. Although the epidemic spike was clearly due to the introduction of DENV-3, the stage was set by a previous decade of spreading *Ae. aegypti* infestation and DENV-1 and DENV-2 in-

TABLE IV

Distance from Salvador and traffic flow correlate only with dengue virus serotype 3 (DENV-3) circulation and only in 2002

Year	DENV-1 Adjusted r ² (p)	DENV-2 Adjusted r ² (p)	DENV-3 Adjusted r ² (p)
2001	0,001 (0,388)	0,038 (0,287)	(Not circulating)
2002	0,015 (0,262)	-0,038 (0,923)	0,202 (0,002)
2003	-0,310 (0,949)	(Not circulating)	-0,165 (0,666)

a: linear multiple regression where the dependent variable is viral circulation (standardized isolates/100,000) per municipality and the independent variables are distance from Salvador (km) and traffic flow (mean daily number of passing vehicles on the major highway - 50 km away).

TABLE V

Linear multiple regression analysis of dengue virus serotype 3 (DENV-3) circulation in 2002

Model ^a	Adjusted r ²	P
Population ^b	0,399	10 ⁻⁵
Population, traffic flow	0,490	10 ⁻⁶
Population, traffic flow, distance	0,487	10 ⁻⁶
Population, traffic flow, log-normalized circulation intensity of DENV-1 and DENV-3 were used	0,488	10 ⁻⁵

a: both of, *ie. aegypti* infestation indices (household and Breteau) fell, *b*: *aegypti* enter into the model. *b*: population size from the 2000 National Census, traffic flow (mean daily number of passing vehicles on the major highway - 50 km away) and distance from Salvador (km). *c*: log-normalized circulation intensity of DENV-1 and DENV-3 were used.

flow, the negative correlation with distance from Salvador, the absence of this pattern for the serotypes already present and for DENV-3 in the following year all support the hypothesis that Salvador was the center of distribution for DENV-3 during the 2002 epidemic.

While it may not be surprising that this virus would follow the major transportation routes out of the capital, this was not the pattern for the introduction and distribution of DENV-1 and DENV-2 (Vasconcelos et al. 2000). These two were introduced in smaller cities in the state and had a less clear pattern for subsequent distribution. One important factor in the more halting spread for those earlier introductions was that the distribution of *ie. aegypti* was less extensive. From the time of first introduction of dengue in the state (1987) up to 2001, the number of municipalities reporting *ie. aegypti* infestation in Brazil increased by 800% (Teixeira et al. 2001). Infected individuals traveling to a new area in the 1980s and 1990s were not as likely to encounter a vector as in 2002.

The low percent of municipalities sending samples for viral isolation may have produced a bias toward collections from population and transportation centers and this might have explained the pattern for isolations in 2002. However, no such pattern was observed for 2001 when there was a similar percentage of municipalities providing samples. In addition, those collecting samples had no idea of the serotype of the infecting virus, but only DENV-3 laboratory results. Its distribution associated with distance from Salvador and traffic flow.

Although a vector-borne disease, the pattern of spread of DENV-3 in BA in 2002 has some features in common

with a point source introduction and subsequent distribution of a new pathogen with person-to-person spread. The mosquito vector, *ie. aegypti*, has a short flight range, so that its own movements are unlikely to contribute much to the rapid distribution of this serotype of dengue (McDonald 1977, Trpis & Hausermann 1986, Reiter et al. 1995, Getis et al. 2003, Huber et al. 2004, Harrington et al. 2005). The heavy dependence of this infection on human movement and, indirectly, human contact may make the distribution of new dengue serotypes a model for the introduction of diseases that require person-to-person spread. While the movement of the human population is often cited a key to dengue transmission (Rodhain 1992, Pinheiro & Corber 1997, de Costa-Ribeiro et al. 2006), models of dengue transmission, however, often fail to include human mobility as an explanatory factor (Newton & Reiter 1992, Focks et al. 1995, 2000, Lilson 1996, Atkinson et al. 2007). Our findings further support the central role of the human population in viral dissemination.

The greatest weakness of these data is that they are secondary or relatively incomplete. Thus, the results must be viewed with caution. Nonetheless, lack of correlation between numbers of serum samples received and distance from the LACEN in Salvador as well as the correlation between number of samples received and number of cases of dengue indicate that the data are not random or a function of convenience. They likely represent the intensity of viral circulation. While distance was measured with good accuracy, traffic volume was sometimes assigned based on some distant point of measurement. Since misspecification lowers the power and significance of analyses, it is likely that more accurate measurements would produce even stronger correlations. Distance and traffic flow, however, only explained 28% of the variance. Clearly there were other factors that could influence this pattern. One of these was population size. The intensity of viral circulation was strongly dependent on density and availability of susceptible individuals. Vector density did not correlate well with intensity of viral circulation in this study.

One issue related to this being a "new" virus for this population was the active circulation of two other dengue serotypes. There is a brief period of two months following acute infection in which immunity develops to all dengue serotypes (Sabin 1952), so co-circulation of two serotypes might interfere with the spread of a third serotype. From the regression analysis, however, the co-circulation of other DENV did not lead to rela-

ive inhibition of DENV-3, DENV-1 circulation was in fact positively correlated with DENV-3 circulation. This might suggest that the factors that allowed DENV-1 to circulate successfully may have also promoted DENV-3 circulation to overcome whatever degree of cross-immunization that might have existed. On the other hand, no cases of dual infection were detected, which may suggest some interference, albeit the viral isolation method may be insensitive to dual infection.

Finally, the analysis of new introductions is very important to the study of the dynamics of viral diseases, since even one year after the introduction, understanding the pattern of dissemination becomes more complex. The level of immunity in the population must be accounted for. Thus, the opportunity to analyze this circumstance again any time soon in Brazil will only present itself with the introduction of DENV-4 or another new disease.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Biomedical Section of the State Central Laboratory of Bahia (LACTEN) as well as the Council of Management, Security of Costs and other staff members in SESAB for epidemiologic data. To Dr. M. Glória Teixeira for her useful information on patterns of vector distribution within the state.

REFERENCES

- Atkinson MP, Su Z, Alphey N, Alphey LS, Coleman PG, Wein LM 2007. Analyzing the control of mosquito-borne diseases by a dominant lethal genetic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9540-9545.
- da Costa-Ribeiro MC, Lourenco-de-Oliveira R, Failloux AB 2006. Geographic and temporal genetic patterns of *Aedes aegypti* populations in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Med Int Health* 11: 1276-1285.
- Figueiredo IT 2000. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect* 2: 1643-1649.
- Focks DA, Brenner RJ, Hayes J, Daniels J 2000. Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. *Am J Trop Med Hyg* 62: 11-18.
- Focks DA, Daniels J, Hails DG, Keesling JF 1995. A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. *Am J Trop Med Hyg* 53: 489-506.
- Getis A, Morrison AC, Gray K, Scott TW 2003. Characteristics of the spatial pattern of the dengue vector, *Aedes aegypti*, in Iquitos, Peru. *Am J Trop Med Hyg* 69: 494-505.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GF, Velez M, Oliver A 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 33: 158-165.
- Guzman MG, Kouri G 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2: 33-42.
- Harrington LC, Scott TW, Ferdthunee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG, Jones JJ, Kithawee S, Kityavong P, Sithiprasasna R, Edman JD 2005. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *Am J Trop Med Hyg* 72: 209-220.
- Huber K, Loan LJ, Chantha N, Failloux AB 2004. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Am J Trop* 69: 23-29.
- Litson AR 1996. Mosquitoes, models, and dengue. *Lancet* 347: 1201-1202.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen J R 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10: S98-109.
- McDade WJ, Bielefeldt-Olmann H 2000. Dengue viral infections: pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2: 1041-1050.
- McDonald PT 1977. Population characteristics of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in villages on the Kenya Coast I. Adult survivorship and population size. *J Med Entomol* 14: 42-48.
- Newton EA, Reiter P 1992. A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. *Am J Trop Med Hyg* 47: 709-720.
- PAHO - Pan American Health Organization 2005. Surveillance-featured surveillance items. <http://www.paho.org/english/ad/dpc/ed/dengue.html> [cited 2003 Nov 23].
- Pinheiro FP, Corber SJ 1997. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 50: 161-169.
- Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG 1995. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am J Trop Med Hyg* 52: 111-119.
- Rodhain F 1992. Recent data on the epidemiology of dengue fever. *Bull Acad Natl Med* 116: 223-236.
- Sabin AB 1952. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1: 30-50.
- Teixeira MG, Barreto MJ, Costa M da C, Ferreira LD, Vasconcelos PL, Carneiro S 2002. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health* 7: 757-762.
- Teixeira MG, Costa MC, Barreto MJ, Barreto FR 2001. Epidemiology of dengue in Salvador, Bahia, 1995-1999. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 269-274.
- Tripl M, Hantschmann W 1986. Dispersal and other population parameters of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. *Am J Trop Med Hyg* 35: 1263-1279.
- Vasconcelos PE, Mota K, Straatmann A, Santos-Torres S, Travasso da Rosa AP, Tavares Neto J 2000. A dengue epidemic in Ipupiara and Prado, Bahia. A seroepidemiologic survey. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 61-67.
- Wang F, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC 2003. Evolutionary relationships of endemic epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 74: 3227-3234.

LRH: MELO AND OTHERS

RRH: DENGUE SURVEILLANCE

Molecular surveillance of dengue virus in Bahia State, Brazil

MELO^{1,2}, P. R. S., DOMINGO³, C., CIUFFO⁴, I. A., TENÓRIO, A⁵., BLANTON⁶,
R. E. and REIS¹, M. G.

¹*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil*

²*Santa Cruz State University, Ilhéus, Bahia, Brazil*

³*Robert Koch-Institut (ZBS-1), Berlin, Germany*

⁴*Laboratório Central do Estado da Bahia (LACEN), Salvador, Bahia, Brazil*

⁵*Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain*

⁶*Case Western Reserve University, OHIO, Cleveland, USA*

Abstract

Dengue is one of the most important emerging viruses, posing a threat to one-third of the global human population. In 2002, the introduction of DENV-3 in the state of Bahia produced a massive epidemic (with 35,000 cases detected) and the first cases of dengue hemorrhagic fever. To gain a better understanding of the nature of the virus circulating at Bahia, E/NS1 sequence was determined for 32 DENV viruses isolated in Bahia during the 2006 and 2007 transmission season, from patients presenting with different degrees of disease severity. The carboxi-terminal region of the E gene (220 nt) of 32 viruses, isolated from dengue patients with a clinical diagnosis of dengue infection between 2006 to 2007, were used to determine the genetic variability of dengue 2 (DENV-2) and dengue 3 (DENV-3). Sequence data were used in phylogenetic comparisons with global samples of DENV-2 and DENV-3. DENV-2 sample was grouped in the South East Indian genotype, while DENV-3 samples were grouped within Indian genotype. This study is the first report on Bahia isolates during two transmission seasons for dengue virus. Our data also confirms reports from other parts of Brazil and different countries showing that the DENV-3 strains currently circulating in the Americas are closely related, and cluster within the genotype that has been associated with DHF epidemics in different continents.

Keywords: Dengue, dengue hemorrhagic fever, molecular surveillance, DENV genotypes, E/NS1 junction.

Introduction

Dengue fever, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome are considered to be the most important arthropod-borne viral diseases due to its high prevalence, and significant morbidity and mortality. The global incidences of dengue has now increased enormously and about 50-100 million dengue infections are now reported annually from more than 100 tropical and subtropical countries of the world (Mackenzie et al., 2004). Infection with any of the dengue viruses can be manifested in a range of symptoms from a relatively mild flu-like syndrome with rash (dengue fever, DF) to a severe and potentially fatal disease characterized by capillary leakage, thrombocytopenia, and sometimes hypovolemic shock (dengue hemorrhagic fever, DHF/dengue shock syndrome, DSS). Immune enhancement mechanisms following a second heterologous dengue virus infection have been associated with a higher risk of developing DHF/DSS (Halstead et al., 1970), however, cases of DHF/DSS in confirmed primary infections have been observed (Barnes & Rosen 1974). Different studies have shown that changes in the viral genetic structure may contribute to shifts in the epidemic potential or pathogenicity of dengue virus serotypes (Gubler et al., 1981; Leitmeyer et al., 1999). These observations point to the importance of viral factors in determining disease severity. In addition, some strains have been associated with increased pathogenic potential (Dash et al., 2006).

DENV-3 re-appeared in Latin American in 1994 after an absence of 17 years (CDC 1995). Before, serotypes DENV-1 and DENV-2 were circulating for more than a decade in Brazil. In 2002, the introduction of DENV-3 in the state of

Bahia produced the first cases of DHF. This event transformed Bahia into a hiperendemic area with three serotypes circulating at the same time (Melo et al., 2007). DENV-3 continue to be the serotype responsible for the majority of infections in both Brazil and in Bahia, but only few DENV-3 isolates from another parts of Brazil have been analyzed with respect to their genetic variability. Here we report the analysis of a genomic interval spanning the E/NS1 junction of the dengue genome used for molecular surveillance of this flavivirus and to determine which strains of dengue virus for DENV-2 and DENV-3 were circulating in Bahia state during the 2006-2007 transmission seasons.

Materials and Methods

Sampling - For administrative and epidemiologic purposes, the state is divided into municipalities, which are the basic reporting unit for the State Secretariat of Health (SSH). Dengue is a reportable disease in Brazil. The secretary of health in each municipality is responsible for collecting serum from each suspected case of dengue within five days of onset of symptoms, and sending this on to the Bahia State Central Laboratory (LACEN) for viral isolation and serology. Officially, all cases of dengue in the state should send samples the LACEN-Bahia for viral serotyping. Between 2006 and 2007, 4018 samples were sent to LACEN to be serotyped. 32 positive samples were further analyzed by RT-PCR and sequencing.

Viral isolation and serotyping- Viral isolation was performed in all samples (in 4018 samples) by inoculation of an *Aedes albopictus* C6/36 cell line with 25 µL

of undiluted acute serum. The cell line was then incubated for seven days at 32°C in Leibovitz's medium supplemented with 5% fetal calf serum. After fixation to slides in quadruplicate with cold buffered acetone, the cells were incubated with serotype-specific monoclonal antibodies for each of the 4 serotypes followed by fluorescein conjugated anti-mouse antibodies. The slides were then scored as positive or negative by fluorescent microscopy (Gubler et al., 1984).

RNA extraction, amplification and sequencing - Viral RNA was extracted from serum of infected patients of all positive samples for cell culture using QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, CA) following the manufacturer's instructions. A Mastercycle Eppendorf (model 5331) was used throughout. Five µl of viral RNA solution were added to 45 µl of a medium compatible with both the reverse transcription and PCR amplification steps of the QIAGEN® OneStep RT-PCR kit. The RT-PCR reactions were carried out using an initial reverse transcription step at 41 °C for 45 minutes followed by a denaturation and Hot Star Taq polymerase activation step (94 °C, 15 minutes) and 40 cycles of denaturation (94 °C, 30 seconds), primer annealing (55 °C, 1 minute), and primer extension (72 °C, 30 seconds). A final incubation was carried out at 72 °C for 5 minutes. A second amplification reaction (nested PCR) was seeded with 1 µl of the initial amplification product. The reaction mixture contained 1× buffer B (60 mM Tris-HCl pH 8.5, 2 mM MgCl₂, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 40 pmol of each sense and antisense primer (Domingo et al., 2004) and 2.5 U of DNA Taq Polymerase (Invitrogen). The samples were subjected to a denaturation step (94 °C, 2 minutes) followed by 40 cycles of denaturation (94 °C, 30 seconds), primer

annealing (57 °C, 4 minutes), and primer extension (72 °C, 30 seconds) and a further extension step at 72 °C for 5 minutes.

Sequence analysis – Sequencing reactions were performed as recommended in the BigDye Dideoxy Terminator sequencing kit (ABI Prism, Foster City, CA) and the products were analyzed using an automated 3100 DNA sequencer (ABI Prism, Applied Biosystems). Original sequence data were first analyzed by the CHROMAS software (version 1.3, McCarthy 1996; School of Biomolecular and Biomedical Science, Faculty of Science and Technology, Griffith University, Brisbane, Queensland, Australia); forward and reverse sequence data of each sample were aligned using the EDITSEQ program (DNASTAR Inc. Software, Madison, Wisconsin, USA). The consensus sequence was compared and aligned to other samples and DNA database sequences using the software CLUSTAL X, version 1.83 (Thompson et al., 1997). Program from MEGA package (Kumar et al., 2001) were used to produce phylogenetic trees using neighbor joining as the method to reconstruct the phylogeny and Kimura-2p as nucleotide substitution calculation method. The statistical significance of a particular tree topology was evaluated by bootstrap resampling of the sequences 1,000 times. Published sequences used in the comparisons were obtained from the GenBank databases (75 DENV-2 and 73 DENV-3 sequences).

Results

Outbreak molecular surveillance

Dengue in Brazil is a notified disease, in 2002 (when DENV-3 was introduced) almost 80,000 cases were notified in all Bahia State (data not showed), and being the first time that DHF cases occurred in this region. After four years, between 2006 and 2007, about 25,000 cases were notified (Figure 1). The most important variable influencing this action is the number of cases (Melo et al. 2007), this agree that during outbreaks the system became more sensitive to detect disease than in inter-epidemic periods. For example, in 2006 Buritirama, a small city in Bahia with 20,495 inhabitants, between September and December notified about 300 cases of dengue, comparing with Salvador with almost 3,000,000 people that notified for all year just 664 cases. Despite that the surveillance is weak, the outbreaks could be detected, and even in municipalities far from the State Central Laboratory (LACEN) the number of cases remains as the more important aspect to a sample be collected and sent to LACEN.

Isolation and typing of the viruses

Between 2006 and 2007 were analyzed 4018 samples by fluorescent microscopy. Only in 108 samples the serotype had been determined. RT-PCR was attempted directly in the serum of the patients from all 32 viruses isolated in C6/36 cells, the positive samples and the RNA isolation was confirmed. The results indicated that 31 samples were positive for DENV-3, and 1 sample was positive for DENV-2 specific RNA.

Nucleotide sequence analysis

We have determined the nucleotide sequences of the E-NS1 gene junction (220 bp) of 32 dengue viruses in the present study. Pair-wise sequence analysis using Needleman-Wunsch global alignment was carried out on the 220 bp sequence for comparison. As expected, comparisons between serotypes showed a low sequence similarity and could be easily grouped (Figure 2). The results were consistent between distance and character-based methods, with minimal differences in topologies. Samples from different years, for DENV-3, were grouped in the same genotype (INDIA genotype III) with 2006 samples showing more strong clustering (Figure 3). This genotype has been implicated in DHF outbreaks in American and Asian continents. DENV-2 segregated into South East Asia genotype, as Brazilian samples in the last ten years. In both analyzes the bootstraps values were satisfactory, with higher values showed by DENV-2 sample.

Discussion

Dengue circulation in Bahia (Brazil) from 2006 to 2007 has consisted mainly of a mixture of DENV serotypes. Between two serotypes (DENV-2 and DENV-3), the former has been consistently detected in outbreaks/epidemics since its introduction 2002. Before this work, dengue virus genotyping in Bahia state were not available or few samples have been analyzed. In this report, we analyzed 32 local DENV isolates collected in a span of two years to further understand the ecology and dynamics of this virus in the region. As known, the potential for causing severe disease has been described for all four serotypes of DENV, and the main factors considered to explain its pathogenicity are host genetic susceptibility (Blanton et al., 2008), antibody dependent enhancement

and differences in virulence among strains (Holmes & Burch 2000), in this way determinants of virulence have been located in three genomic regions (Leitmeyer et al. 1999) and have been tested *in vitro* (Cologna & Rico-Hesse 2003), so the genotypes have been more or less related with potential to cause DHF. Different studies concluded that the spread of genotype III of DENV-3 from the Indian subcontinent to Africa and then consequently to Americas was correlated with an increase in severe cases of dengue disease in this region (Guzman et al., 1996; Messer et al., 2003).

The routine laboratory diagnosis of dengue virus infection is primarily achieved by the isolation of virus, detection of IgM/IgG antibodies by serodiagnosis and/or molecular detection by the demonstration of viral RNA by RT-PCR (Wu et al., 1997; Guzman & Kouri 2004). RT-PCR is one of the most important confirmatory tests in dengue infection. But, it is only positive when sample is collected during the viraemic phase of the patient (within first five days of onset of the symptoms). The lower rate of the virus isolation may be attributed to the absence of live virus in the sample. This must be due to misclassification of the cases by epidemiological staff and others factors as improper maintenance or storage system. All positive cell culture isolations were confirmed and identified by RT-PCR and nested PCR (32 available samples). Still, we have carried out the molecular epidemiology and genotyping study of the detected DENV-2 and DENV-3 viruses, during 2006 and 2007 circulation seasons. We have studied the sequence of these dengue viruses, directly from patient serum sample, as recently advocated by several researchers (Leitmeyer et al. 1999; Dash et al., 2004). Various genomic regions of dengue viruses have been selected for

molecular phylogenetic analysis (Uzcategui et al., 2003). However, we have selected the E-NS1 gene junction as it also harbours epidemiologically important sequence information and sensitive for surveillance application (Domingo et al. 2004).

Despite that we have analyzed only one sample of DENV-2, an important question is why after the introduction of this serotype in Bahia state in 1995 DHF have not been notified? The genotype of this virus was the South East Asia genotype. This agree with the idea that when DENV-1 was introduced, in 1987 through Ipupiara at the Chapada Diamantina region, could not spread to others cities in the Bahia state to infect many people (Vasconcelos et al., 2000). Otherwise, DENV-2 spread to different cities after have been introduced in 1995 possibly the number of people with previous antibodies to DENV-1 was very low after 1987.

The results obtained for DENV-3 in this study bring some interesting findings how can samples from two years, 2006 and 2007, display a high identity with isolated from Peru in 2002? And in the same time samples from 2007 showed a high similarity with samples from different countries in all American continent. Other important finding was that almost all clusters were with samples from the same geographical area in Bahia state. In some way, the microregion where the virus circulate in any level determine how they become grouped. During 2006 and 2007, the main serotype circulating in Bahia state was DENV-3, in agreement with the displacement of serotypes 1 and 2 of DENV after DNV-3 introduction in Brazil in 2002 (Nogueira et al., 2005). A study made in Rondônia and Acre found both genotype I and V (Nogueira et al., 2008), while we found

just genotype III after two years of surveillance. This confirm the epidemic potential of this genotype by the displacement of serotypes 1 and 2 of DENV when a highly virulent genotype of DENV-3 was introduced in Brazil in 2002 (Nogueira et al. 2005). Since its introduction this genotype have been related with severe disease in Bahia and Brazil (Miagostovich et al., 2006; Melo et al. 2007).

In conclusion, the effective worldwide control of dengue virus into Bahia and consequently in all Brazil, requires the definition of the epidemical viral sources, and the precise identification of virus genotypes. A key objective of DF and DHF surveillance programmes is early detection of outbreaks to permit the implementation of control measures by the public health authorities. DHF outbreaks can be anticipated by monitoring the emergence of new genotypes in a region like Bahia state.

Acknowledgments

This project was funded by FAPESB (PPSUS 8837/2006), CNPq and FIOCRUZ.

References

- Barnes, W. J.; Rosen, L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. **Am J Trop Med Hyg**, v. 23, n. 495-506, 1974.
- Blanton, R. E.; Silva, L. K.; Morato, V. G.; Parrado, A. R.; Dias, J. P.; Melo, P. R.; Reis, E. A.; Goddard, K. A.; Nunes, M. R.; Rodrigues, S. G.;

- Vasconcelos, P. F.; Castro, J. M.; Reis, M. G.; Barreto, M. L.; Teixeira, M. G. Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. **Eur J Hum Genet**, v. 16, n. 762-5, 2008.
- CDC. Dengue type 3 infection. Nicaragua and Panama, October-November 1994. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 70, n. 41-43, 1995.
- Cologna, R.; Rico-Hesse, R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. **J Virol**, v. 77, n. 3929-38, 2003.
- Dash, P. K.; Parida, M. M.; Saxena, P.; Abhyankar, A.; Singh, C. P.; Tewari, K. N.; Jana, A. M.; Sekhar, K.; Rao, P. V. Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: implications for increased incidence of DHF & DSS. **Virol J**, v. 3, n. 55, 2006.
- Dash, P. K.; Parida, M. M.; Saxena, P.; Kumar, M.; Rai, A.; Pasha, S. T.; Jana, A. M. Emergence and continued circulation of dengue-2 (genotype IV) virus strains in northern India. **J Med Virol**, v. 74, n. 314-22, 2004.
- Domingo, C.; Palacios, G.; Niedrig, M.; Cabrerizo, M.; Jabado, O.; Reyes, N.; Lipkin, W. I.; Tenorio, A. A New Tool for the Diagnosis and Molecular Surveillance of Dengue Infections in Clinical Samples. **Dengue Bulletin**, v. 28, n. 87-95, 2004.
- 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**, v. 33, n. 158-65, 1984.
- Gubler, D. J.; Suharyono, W.; Lubis, I.; Eram, S.; Gunarso, S. Epidemic dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. **Am J Trop Med Hyg**, v. 30, n. 1094-9, 1981.

- Guzman, M. G.; Kouri, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis**, v. 8, n. 69-80, 2004.
- Guzman, M. G.; Vazquez, S.; Martinez, E.; Alvarez, M.; Rodriguez, R.; Kouri, G.; de los Reyes, J.; Acevedo, F. [Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas]. **Bol Oficina Sanit Panam**, v. 121, n. 102-10, 1996.
- Halstead, S. B.; Nimmannitya, S.; Cohen, S. N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **Yale J. Biol. Med** v. 42, n. 311-328, 1970.
- Holmes, E. C.; Burch, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends Microbiol**, v. 8, n. 74-7, 2000.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. B.; Nei, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 1244-5, 2001.
- Leitmeyer, K. C.; Vaughn, D. W.; Watts, D. M.; Salas, R.; Villalobos, I.; de, C.; Ramos, C.; Rico-Hesse, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **J Virol**, v. 73, n. 4738-47, 1999.
- 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**, v. 10, n. S98-109, 2004.
- Melo, P. R.; Reis, E. A.; Ciuffo, I. A.; Goes, M.; Blanton, R. E.; Reis, M. G. The dynamics of dengue virus serotype 3 introduction and dispersion in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 905-12, 2007.

- Messer, W. B.; Gubler, D. J.; Harris, E.; Sivananthan, K.; de Silva, A. M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 800-9, 2003.
- Miagostovich, M. P.; dos Santos, F. B.; Fumian, T. M.; Guimaraes, F. R.; da Costa, E. V.; Tavares, F. N.; Coelho, J. O.; Nogueira, R. M. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 307-13, 2006.
- Nogueira, M. B.; Stella, V.; Bordignon, J.; Batista, W. C.; Borba, L.; Silva, L. H.; Hoffmann, F. G.; Probst, C. M.; Santos, C. N. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 483-8, 2008.
- Nogueira, R. M.; Schatzmayr, H. G.; de Filippis, A. M.; dos Santos, F. B.; da Cunha, R. V.; Coelho, J. O.; de Souza, L. J.; Guimaraes, F. R.; de Araujo, E. S.; De Simone, T. S.; Baran, M.; Teixeira, G., Jr.; Miagostovich, M. P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 1376-81, 2005.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 4876-82, 1997.
- Uzcategui, N. Y.; Comach, G.; Camacho, D.; Salcedo, M.; Cabello de Quintana, M.; Jimenez, M.; Sierra, G.; Cuello de Uzcategui, R.; James, W. S.; Turner, S.; Holmes, E. C.; Gould, E. A. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. **J Gen Virol**, v. 84, n. 1569-75, 2003.

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**, v. 33, n. 61-7, 2000.

Wu, S. J.; Hanson, B.; Paxton, H.; Nisalak, A.; Vaughn, D. W.; Rossi, C.; Henchal, E. A.; Porter, K. R.; Watts, D. M.; Hayes, C. G. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue virus. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 4, n. 452-7, 1997.

Figure Legends

Figure 1. Monthly profile of dengue viral isolates and cases notified 2006 - 2007 in Bahia, Brazil.

Figure 2. Serotyping of 32 DENV Bahia samples using the carboxi-terminal fragment of the gE (220 nt, 65 sequences) for comparison. The statistical significance of the phylogenies constructed was estimated by bootstrap analysis with 1,000 pseudo-replicate data sets, only values over 70 are showed. Strains are denoted by name/number, country and year of isolation.

Figure 3. Evolutionary relationships among a) 1 DENV-2 and b) 31 DENV-3 Bahia viruses generated by Neighbour - joining method based on the nucleotide sequence of E/NS1 gene junction. Bootstrap values (>70) are indicated at the major branch points.

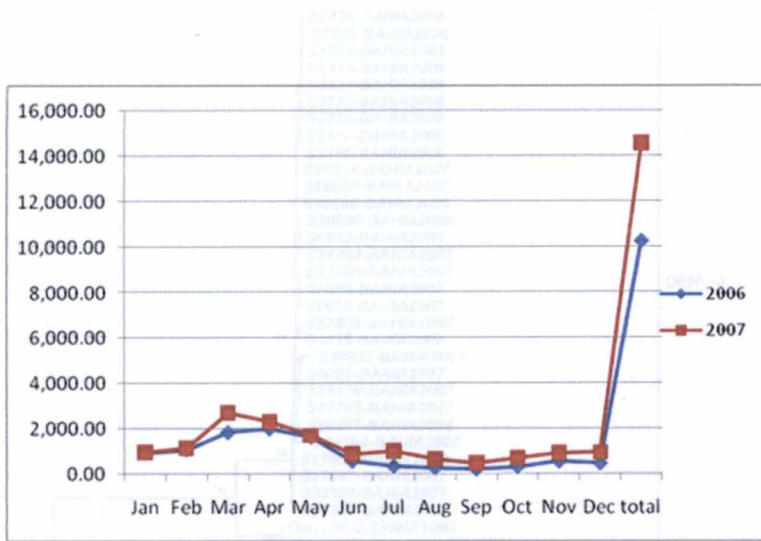


Figure 1

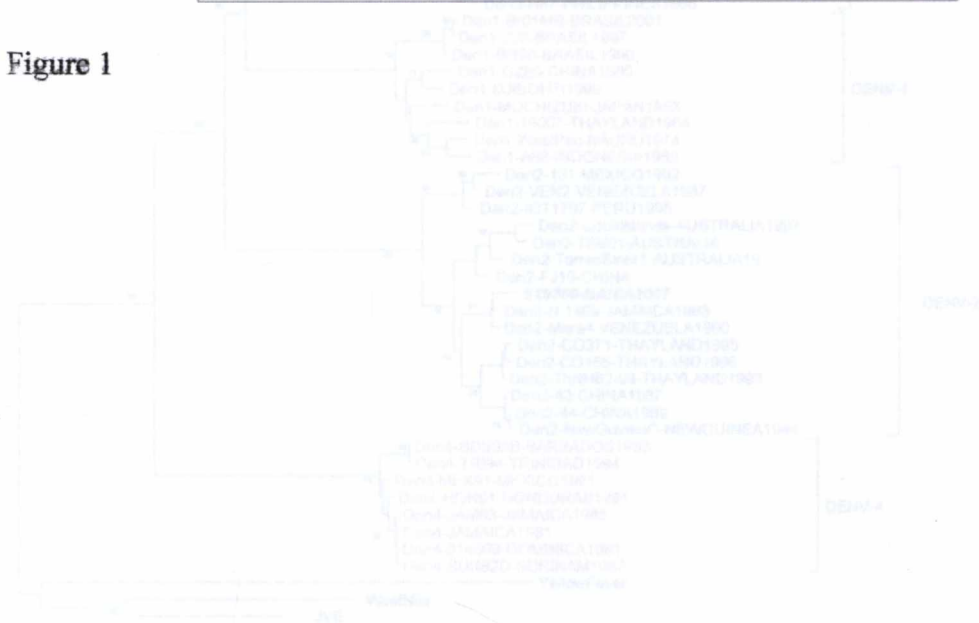


Figure 2

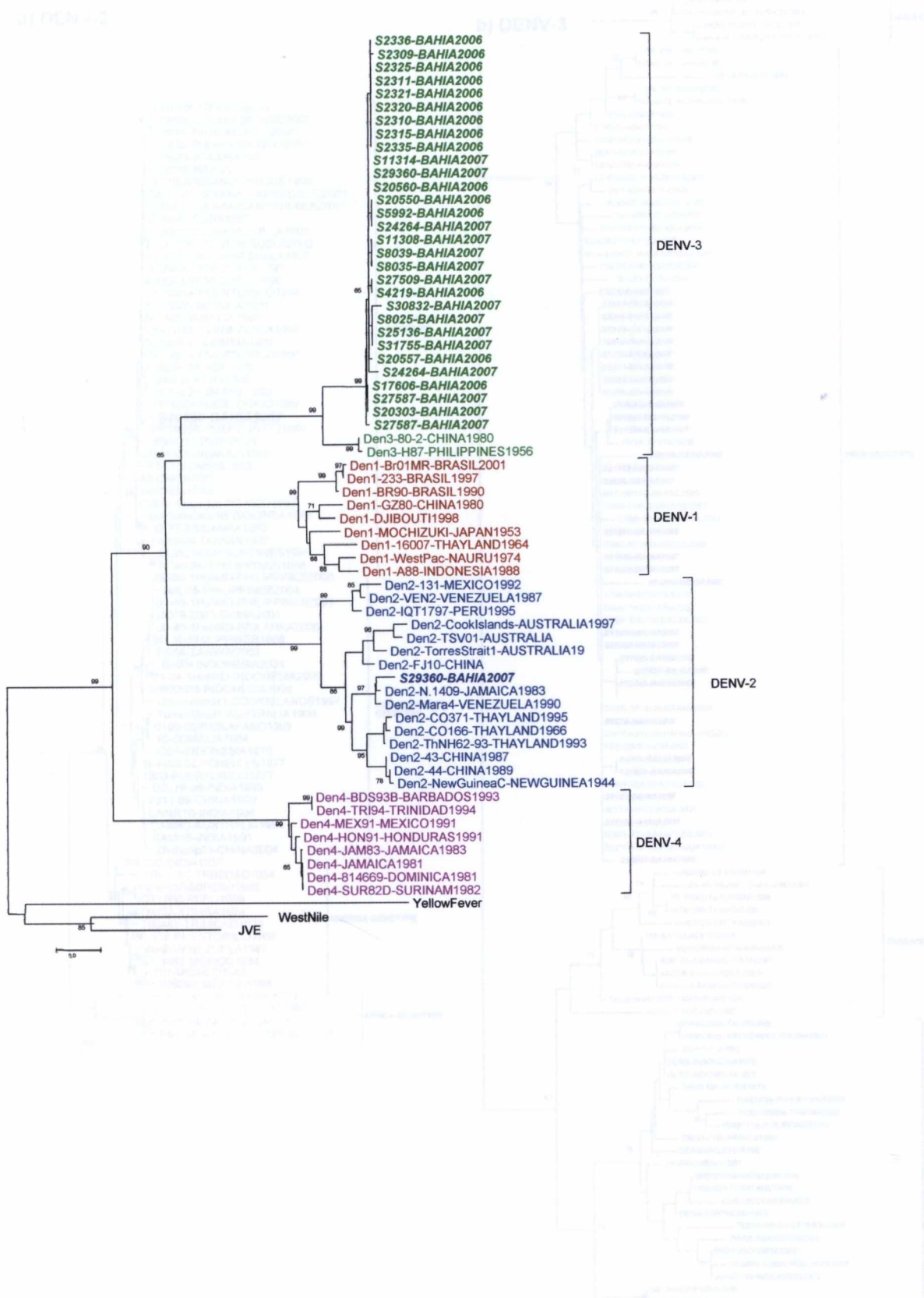
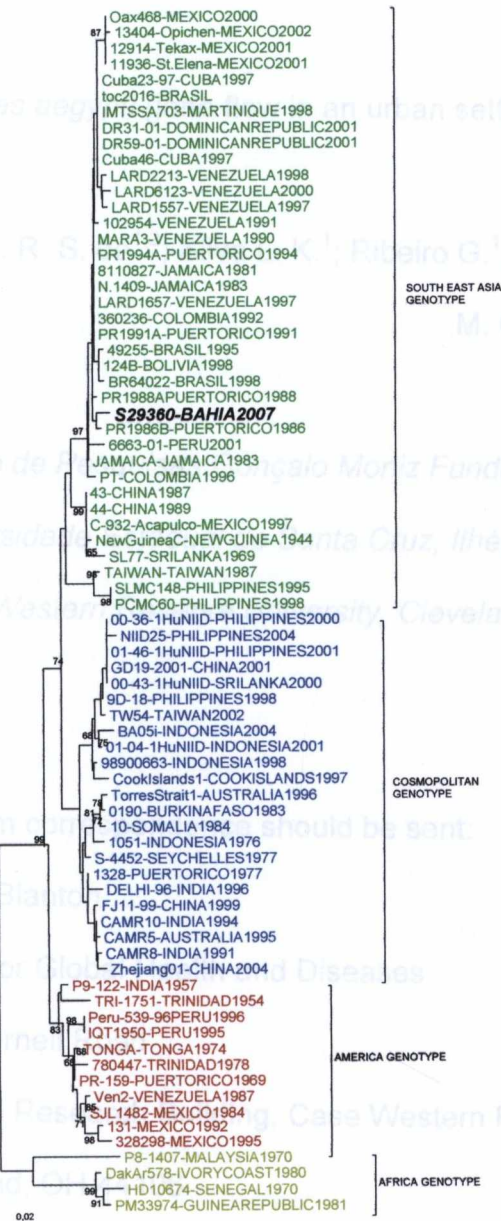


Figure 2

a) DENV-2



b) DENV-3

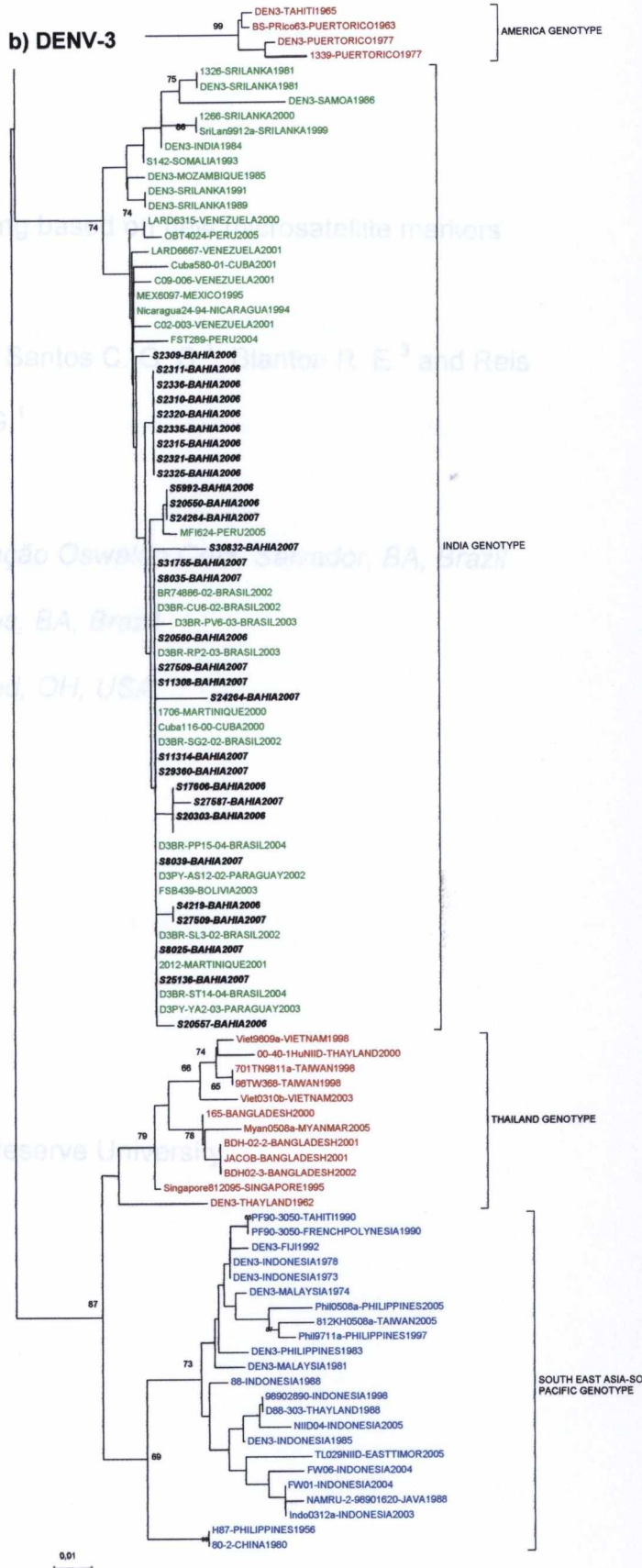


Figure 3

LRH: Melo and Others

RRH: Gene flow *Aedes aegypti*

Aedes aegypti gene flow in an urban setting based on new microsatellite markers

Melo P. R. S. de^{1,2}; Silva L. K.¹; Ribeiro G.¹; Santos C. G. S.¹; Blanton R. E.³ and Reis
M. G.¹

¹ *Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil*

² *Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil*

³ *Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA*

To whom correspondence should be sent:

Ronald Blanton

Center for Global Health and Diseases

2103 Cornell Road

Wolstein Research Building, Case Western Reserve University

Cleveland, OH 44106

Telephone: 216-368-4814

Fax: 216-368-4825

e-mail: reb6@case.edu

Paulo R. S. Melo

Address

Gonçalo Moniz Research Center
Oswaldo Cruz Foundation
R. Valdemar Falcao, 121, Brotas
Salvador, Bahia
40296-710 Brazil
Work: 55-71-3176-2289
FAX: 55-71-3176-2289
email: pmelo11@yahoo.com.br

Qualifications

Paulo Melo, MSc. is a PhD student in Human Pathology, and his work focuses in epidemiology, genetics and molecular biology.

Role

Responsible for all aspects of the collection of sample, genotyping, data analysis and preparation of the manuscript.

Luciano Kalabric Silva

Address

Gonçalo Moniz Research Center
Oswaldo Cruz Foundation
R. Valdemar Falcao, 121, Brotas
Salvador, Bahia
40296-710 Brazil
Work: 55-71-3176-2289
FAX: 55-71-3176-2289

Qualifications

Luciano Kalabric Silva, PhD, he is Research of Oswaldo Cruz Foundation.

Role

Responsible for sample collection, mapping and selection of collection sites, data processing and critical review of the manuscript.

Gilmar Ribeiro

Address

Gonçalo Moniz Research Center
Oswaldo Cruz Foundation
R. Valdemar Falcao, 121, Brotas
Salvador, Bahia
40296-710 Brazil
Work: 55-71-3176-2289
FAX: 55-71-3176-2289
email: gilmar@cpqgm.fiocruz.br

Qualifications

Gilmar Ribeiro is a graduate student in Biologic Sciences and research technologist at the Oswaldo Cruz Foundation

Role

Responsible for sample collection, mosquito identification, data processing and review of the manuscript

Carlos Gustavo Silva Santos

Address

Gonçalo Moniz Research Center
Oswaldo Cruz Foundation
R. Valdemar Falcao, 121, Brotas
Salvador, Bahia
40296-710 Brazil
Work: 55-71-3176-2289
FAX: 55-71-3176-2289
carlosgustavoss@gamil.com

Qualifications

Carlos Santos, is a graduate student from scientific initiation.

Role

Responsible for data collection and processing.

Mitermayer G. Reis

Address

Gonçalo Moniz Research Center
Oswaldo Cruz Foundation
R. Valdemar Falcao, 121, Brotas
Salvador, Bahia
41.945 Brazil
Work: 55-71-3176-2289
FAX: 55-71-3176-2289
miter@cpqgm.fiocruz.br

Qualifications

Mitermayer Reis, M.D., Ph.D. is the director of the Oswaldo Cruz Foundation, Bahia

Role

Responsible for project conception and critical review of the manuscript

Corresponding author: Mitermayer G. Reis

Ronald E. Blanton

Qualifications

Ronald Blanton, M.D., M.Sc. is head of a molecular biology and genetics laboratory. His work focuses on the genetics of dengue infections.

Role

Responsible for project conception, design, data analysis and preparation of manuscript.

Abstract

Aedes aegypti is the main vector of dengue and yellow fever viruses in Brazil. Its preference for peridomestic habitats, human blood and feeding on multiple individuals contribute to its importance as a vector. Another important aspect of its biology, however, is its short flight distance of 100 m. This suggests that the landscape of Salvador, Bahia, Brazil with its broken terrain of steep hills and dense habitation mixed with occasional forested areas will create obstacles to gene flow. Identification of islands of limited exchange might aid in planning control measures in a large urban area or help explain or anticipate the spread of infection. To begin to map out mosquito dynamics, we developed new microsatellite markers and investigated gene flow among mosquitoes collected at 3 sites in Salvador separated by <25 km. We observed that based on F_{ST} estimates (North-South 0,018, Central-South 0,0011 and North-Central 0,0073), despite low, there was a linear relationship between mosquitoes collected in the North, Center and South of the city suggesting that the central region is in relative isolation for this species from the Northern suburbs of the city.

Keywords: *Aedes aegypti*, microsatellite, population genetics, public health, Brazil, dengue, yellow fever

Introduction

Dengue is the most prevalent and important mosquito-borne disease in Brazil where it is transmitted primarily by *Aedes aegypti* (DA COSTA-RIBEIRO et al. 2006). The mosquito is present at high density in populated areas (LOURENCO-DE-OLIVEIRA et al. 2004) due to both the availability of breeding sites and its preference for human blood. In spite of a continuous eradication program throughout the Americas in the 1950's and the 1960's, this species has been able to disperse and re-colonize countries where it had previously been eliminated (FIGUEIREDO 2000). The mosquito was reintroduced in Brazil 1976 and did not reach the city of Salvador until the 1990's (TEIXEIRA et al. 2001; TEIXEIRA et al. 2005). With *Ae. aegypti* repopulation, the dengue virus returned with the resultant increase in morbidity and strain on public health resources (NOGUEIRA et al. 2007).

The association between *Ae. aegypti* and dengue is so strong that any measure that controls this vector will control disease transmission. Understanding the genetic structure of *Ae. aegypti* populations, therefore, is likely to aid control efforts by revealing the range and limits of mosquito movements and assisting in targeting control measures. The most widely employed method for assessing *Ae. aegypti* populations are the household index and Breteau index (HI and BI). These have been used to evaluate the efficacy of the control measures and infestation levels in different areas. The earliest genetic studies on *Ae. aegypti* population structure were based on allozyme analysis (TABACHNICK and POWELL 1979), but the low heterogeneity of these markers limit their use for fine mapping (DA COSTA-RIBEIRO et al. 2006). Most recently, microsatellites have been the preferred markers used to study genetic variations or to detect gene flow (HUBER et al. 1999; RAVEL et al. 2001; CHAMBERS

et al. 2007). Here, we report on the identification of four novel microsatellites and their preliminary application to mapping the relationship between closely spaced *Ae. aegypti* samples in an urban landscape.

Material and Methods

Mosquito samples - *Ae. aegypti* larvae were obtained from natural breeding sites, respectively, in 168 locations distributed along the All Saints Bay side of the city of Salvador. These districts contain some of the newest construction and most recent immigrants, but are also among the least developed and least dense (9,165 residents/km²). Eight one sites were clustered around the central region (21,766 residents/km²) and 47 in the southern region (15,770 residents/km²). The natural breeding site at the Oswaldo Cruz Foundation in Brotas (Figure 1) was used as the central point for all distance measurements. Just one individual per site was used in the genetic analysis to avoid inclusion of siblings.

All mosquito larvae were identified as *Ae. aegypti* by microscopic examination according to the criteria of Consoli & Oliveira (CONSOLI and OLIVEIRA 1994) and then frozen at -80°C for subsequent DNA analysis. Control DNA for *Ae. aegypti* was obtained from the laboratories of Marcelo Jacobs Lorena, Johns Hopkins University and José Wellington Lima, National Health Foundation (FUNASA, Ceará, Brazil). Other mosquito species and *Lutzomyia longipalpis* were donated by Dr. Aldina Barral, Oswaldo Cruz Foundation (Bahia, Brazil).

Microsatellite identification - *Ae. aegypti* repeat sequences were searched for within the GenBank database from 2002-2008, and primer pairs were designed for the

sequences flanking these regions (Table 1). These potential markers were validated by amplification of DNA obtained from individual mosquitoes from control samples from laboratory strains. Five microsatellite loci were found to be polymorphic, behave as single copy loci and produce clear, interpretable patterns on PAGE: AAMS11, AAMS20 and AAMS21 (Table 1).

PCR analysis - DNA was extracted with DNAzol solution (Gibco BRL). Mean DNA isolation per larva was 30 µg. PCR reactions containing 1 X PCR buffer (1.2 mM MgCl₂), 60 µM of each dNTP (Biolabs Inc.), 10 pmol of each primer, 0.4 units of Taq polymerase (Invitrogen) and 5 µl of DNA, were performed in a Eppendorf 5331 thermal cycler in a final volume of 25 µl. The reaction conditions were 30 cycles at 94°C for 5 min, 96°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 1 min 15 sec, followed by a final elongation at 72°C for 5 min. The PCR products were analyzed by 12% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) stained with ethidium bromide and visualized by the GELDOC documentation system (Biorad Inc.). For analysis on the ABI 3100 automated sequencer, 1.5 pmoles of one primer from the PCR was end-labeled with one of four fluorescent phosphoramidite dyes (FAM, TED, HEX or NED) and added to 2.5 µl of each reaction along with 0.5 µl of internal size standard GS-500LIZ (Applied Biosystems) and deionized formamide to a final volume of 10 µl.

Genetic analysis – Allele frequencies, comparison with Hardy-Weinberg proportions and marker linkage disequilibrium were calculated for each marker and population using the program Genepop (RAYMOND and ROUSSET 1995). F_{IS} and F_{ST} were calculated according to Weir and Cockerham (WEIR and COCKERHAM 1984) with the

programs Arlequin (EXCOFFIER and SCHNEIDER 2005) and FSTAT (GOUDET 2002). The F_{ST} was also calculated correcting for possible null alleles using the program FreeNA (CHAPUIS and ESTOUP 2007). Genotypic differentiation was assessed using G-based exact tests based on the Markov chain method available in Genepop (RAYMOND and ROUSSET 1995).

Results

Microsatellite Specificity and Reproducibility - In many areas where *Ae. aegypti* occurs, other mosquito species are present, such as, *Ae. albopictus* and *Culex spp.* The four markers amplified only *Ae. aegypti* DNA and not other mosquito, insect or human DNA (Figure 2). Therefore, the markers should be resistant to most misclassification in the area of Salvador and could be used for pooled specimens. Successful amplification of these microsatellites was equivalent for *Ae. aegypti* from the field as well as 2 laboratory strains from widely separated geographic locations (Figure 3; samples from Ceará not shown).

Genotyping Results - All markers were polymorphic in each of the subpopulations tested. Figure 3 shows a representative PAGE with the markers that amplified samples from different geographic regions of the city. A total of 15 alleles were identified, and all were present in all populations. Allelic heterozygosity for the samples ranged from 15 to 80% (Table 2). Marker linkage disequilibrium was tested pairwise by contingency tables in GenePop, and all five markers were found to be independent.

Population structure - Tests considering all loci for each field sample showed no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (Table 2). The F_{IS} calculations indicate that, except for the single source collection from the FioCruz, the North population was the most (Table 2). In this sample, this also correlated with the least dense human population. Indices of household infestation, however, are generally higher in the North and Central regions than in the South (MORATO et al. 2005). For F_{ST} calculation with had excluded AAMS21 for high failure index. Based on F_{ST} values, there was little differentiation between the Central and South regions or North and Central. The greatest genetic differentiation was observed between the North and South populations, they were separated by the greatest geographic distance (Table 3). Some 11% of DNA samples failed to amplify for only 1 or 2 of the five markers and may suggest that these failed due to mutations in the primer sites (null alleles). Since this also would provide information about the population, we assessed F_{ST} using the approach of Chapuis and Estoup with the program FreeNA (CHAPUIS and ESTOUP 2007) to correct for the potential bias due to null alleles. The results were essentially the same. Calculation of the R_{ST} , likewise showed the same relationship between the areas examined as the F_{ST} , although the R_{ST} values were higher for each comparison.

Discussion

Microsatellites remain extremely useful tools in population genetics because of their high information content and availability in most species. *Ae. aegypti*, unfortunately is a microsatellite-poor species (FAGERBERG et al. 2001). This is a serious obstacle to genetics aimed at gene-finding where a high marker density is an additional requirement. However, useful information has been obtained for mosquito population

genetics with as few as 3 or 4 markers (HUBER et al. 1999; RAVEL et al. 2002). A number of the previously published microsatellites are limited by low variability (RAVEL et al. 2001), or failure to amplify for many samples or specific populations (HUBER et al. 2002; PAUPY et al. 2004). In our hands, many candidates did not produce interpretable patterns, thus, we sought to identify additional markers. The markers described here were all simple tri repeats, were highly polymorphic and produced clear and highly reproducible patterns in a number of geographically separated laboratory or field populations. We show that the markers can potentially be multiplexed and have high specificity, making them useful when using mosquitoes from a pooled source. An increased number of informative markers improve accuracy, reliability of estimates and discriminatory power, so that any additional markers to those currently identified make a significant contribution to the available genotyping tool-kit. As we begin to add new sets of *Ae. aegypti* microsatellites, such as those described by Chambers et al. (CHAMBERS et al. 2007), we expect that this will produce significantly better resolution.

Unlike *An. Gambiae*, whose flight range is up to 10 km, *Ae. aegypti* is entirely peridomestic and will rarely be found more than 100 m from human habitation. This short flight range plus the large variations in elevation and suitable habitat in the city of Salvador was predicted to create significant barriers to gene flow over relatively short distances. Although this was a pilot study, our results appear to confirm that there is structure in this urban population. There appears to be a lack of correlation between geographic and genetic distance suggesting that there were obstacles or enhancements to gene flow apart from horizontal distance. Although we expected that a distinct 70 m high ridge separating the lower and upper city would pose a physical

barrier to gene flow between the central and southern populations, these 2 geographic regions appeared to represent a single population (Central and South). The populations with the greatest linear separation (Northern and Southern) had a higher F_{ST} value (0.018), despite that some obstacle was present between the Central and Northern populations. In the 1995 epidemic of dengue that introduced DENV2 to Salvador, the major dynamic was spread from the central region to the south with little extension from the central region to the north (BARRETO et al. 2008), a pattern similar to that preliminarily observed here for gene flow for the vector (Central-South $F_{ST}=0.0011$). Traffic patterns may partially explain this distribution of gene flow. In other hand, the southern tip of the city is the major commercial area, and major highways run roughly north and south through the center of the peninsula and regular urban commercial traffic will tend toward the southern Bay side of the city from the central area. Several studies in Brazil, however, have suggested that transport in vehicles is not an important means of mosquito dispersion (DA COSTA-RIBEIRO et al. 2006; DA COSTA-RIBEIRO et al. 2007). The prevailing winds are generally easterly with a regular diurnal variation from 7.2 km/h at midnight to 20 km/h at midday, so there is infrequent north-south or west – east mixing on this basis. There may, however, be local inland patterns that we are unaware of. The results here must still be considered preliminary due to the number of samples and mainly markers used. In future studies it will be important to see if these relationships persist and to try to understand what factors account for these differences using a larger number of samples and markers to overcome some of these problems. A fine map of dynamic population dispersal will be useful for public health efforts. Although the use of insecticide for control of *Ae. aegypti* can be controversial (BRAGA et al. 2004; DA-CUNHA et al. 2005), it is particularly

difficult to plan control strategies using this approach without knowing the likely rate of repopulation from adjacent untreated areas. Further, other control measures that usually cover only a limited area are difficult to evaluate in the setting of rapid population replacement, unless the degree of replacement can also be accounted for in the evaluation. We will continue to assess the utility of these and other recently published markers as well as develop new microsatellites in order to finally provide a fine map of gene flow and thereby the general movements of this most important vector in a Brazilian urban landscape.

Acknowledgments

This project was funded by FAPESB (PPSUS 8837/2006), FIOCRUZ (PDTSP) and the NIH (R21 AI056263).

References

- Barreto, F. R., M. G. Teixeira, M. D. Costa, M. S. Carvalho and M. L. Barreto.; 2008. Spread pattern of the first dengue epidemics in the City of Salvador, Brazil. *BMC Public Health*. 8, 51.
- Braga, I. A., J. B. Lima, S. Soares Sda and D. Valle.; 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99, 199-203.
- Chambers, E. W., J. K. Meece, J. A. McGowan, D. D. Lovin, R. R. Hemme, D. D. Chadee, K. McAbee, S. E. Brown, D. L. Knudson and D. W. Severson.; 2007. Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Hered*. 98, 202-10.
- Chapuis, M. P. and A. Estoup.; 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol*. 24, 621-31.
- Consoli, R. and R. Oliveira.; 1994. [Principle Mosquitoes of Public Health Importance in Brazil]. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro, Oswaldo Cruz Foundation.
- da-Cunha, M. P., J. B. Lima, W. G. Brogdon, G. E. Moya and D. Valle.; 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100, 441-4.
- da Costa-Ribeiro, M. C., R. Lourenco-de-Oliveira and A. B. Failloux.; 2006. Geographic and temporal genetic patterns of *Aedes aegypti* populations in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Med Int Health*. 11, 1276-85.

da Costa-Ribeiro, M. C., R. Lourenco-de-Oliveira and A. B. Failloux.; 2006. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101, 917-21.

da Costa-Ribeiro, M. C., R. Lourenco-de-Oliveira and A. B. Failloux.; 2007. Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 77, 303-9.

Excoffier, L. and S. Schneider.; 2005. Arlequin: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformat. Online.* 1, 47-50.

Fagerberg, A. J., R. E. Fulton and W. C. Black.; 2001. Microsatellite loci are not abundant in all arthropod genomes: analyses in the hard tick, *Ixodes scapularis* and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 10, 225-36.

Figueiredo, L. T.; 2000. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2, 1643-9.

Goudet, J. (2002). FSTAT. Lausanne, Switzerland.

Huber, K., L. Le Loan, T. H. Hoang, S. Ravel, F. Rodhain and A. B. Failloux.; 2002. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. *Mol Ecol.* 11, 1629-35.

Huber, K., L. Mousson, F. Rodhain and A. B. Failloux.; 1999. Short report: microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 61, 1001-3.

Lourenco-de-Oliveira, R., M. Vazeille, A. M. de Filippis and A. B. Failloux.; 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98, 43-54.

- Morato, V. C., G. Teixeira Mda, A. C. Gomes, D. P. Bergamaschi and M. L. Barreto.; 2005. Infestation of *Aedes aegypti* estimated by oviposition traps in Brazil. *Rev Saude Publica*. 39, 553-8.
- Nogueira, R. M., J. M. de Araujo and H. G. Schatzmayr.; 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 22, 358-63.
- Paupy, C., A. Orsoni, L. Mousson and K. Huber.; 2004. Comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP), microsatellite, and isoenzyme markers: population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Phnom Penh (Cambodia). *J Med Entomol*. 41, 664-71.
- Ravel, S., J. P. Herve, S. Diarrassouba, A. Kone and G. Cuny.; 2002. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouake. *Acta Trop*. 82, 39-49.
- Ravel, S., N. Monteny, D. Velasco Olmos, J. Escalante Verdugo and G. Cuny.; 2001. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. *Acta Trop*. 78, 241-50.
- Raymond, M. and F. Rousset.; 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*. 86, 248-249.
- Tabachnick, W. J. and J. R. Powell.; 1979. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genet Res*. 34, 215-29.
- Teixeira Mda, G., C. Costa Mda, M. L. Barreto and E. Mota.; 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica*. 21, 1307-15.

Teixeira, M. G., M. C. Costa, M. L. Barreto and F. R. Barreto.; 2001. [Epidemiology of dengue in Salvador-Bahia, 1995-1999]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 34, 269-74.

Weir, B. and C. Cockerham.; 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38, 1358-1310.

Figure Legends

Figure 1. Collection sites (●) and the Oswaldo Cruz Foundation (+). Clustered sites in the North, Central and South metropolitan areas. All sites are on the All Saints Bay side of the peninsula.

Figure 2. Specificity of the markers with (1) *Aedes aegypti*, (2) *Aedes albopictus*, (3) *Culex quinquefasciatus*, (4) *L. longipalpis* and (5) human DNA. MW marker 200 bp.

Figure 3. Native polyacrylamide gels (12.5%) of genotyping products: **A**: for individual from (1) the Johns Hopkins *Ae. aegypti* colony, (2) South and (3) North areas of Salvador. **B**: Detection with ABI3100 of markers AAMS3 (left) and AAMS11 (right) from heterozygous individuals.

Table 1 – Forward (F) and reverse (R) sequences of the primers that work for microsatellites selected.

MARKER	ACCESSION	REPEAT	Primers Sequence	Predicted size (bp)
AAMS11	CR937894a	CAT (6x)	F-AACAACGTCCTCCACAACAC R-TTTGGAGGTCCCTGAGGATC	175
AAMS20	AY432600	CAT (6x)	F-GAACATCGCCATCAAGC R-GAGATCTACCGAAGCGC	192
AAMS21	U91682	CCA (8x)	F-AATCATCTTGGCTCTCTTC R- ACAACTGGAGCTGGTG	177
AAMS31	AAGE0202522 8.1	CCT (9x)	F-TGCTTGGACTCTTCCGTCTT R-CATTCCAACCGTGCAAGTG	217
AAMS42	AAGE0202071 7.1	AAT (6x)	F-AAGTGCTTCCGCGAGTGTAT R-GAGTGAACGAGGGTCATTT	160

Table 2 - Genotyping results for samples typed, heterozygosity and success from the microsatellites.

Table 2.

Markers	Sites (Individuals analyzed)			
	FioCruz (16)	North (47)	Central (81)	South (40)
Genotyping success ¹ (GDA)				
AAMS11	43	98	99	99
AAMS20	20	96	99	99
AAMS21	15	32	38	25
AAMS31	N/D	81	78	99
AAMS42	N/D	92	93	100
Mean success	N/D	80	81	84
F_{IS} (f) (FSTAT)	0.46	0.43	0.04	0.006
HWE	<0.01	0.13	0.08	0.77
Density (persons/km ²)	-	9165	21766	1577
HI	-	7.05	4.11	2.94

¹Percent typed

Table 3 – Results from F_{ST} analyses of different locations with our markers.

Comparison	F_{ST}^1	F_{ST} With Null Allele ²	R_{ST}^1	Interval (Km)
North-South	0.018*	<0.01	0.040	17
North-Central	0.0073	0.0047	0.170	10
Central-South	0.0011	0.001	0.062	07

¹ F_{ST} was calculated by pairwise comparison of all subpopulations using Arlequin.

²Estimates of F_{ST} using FreeNA which estimates likely null alleles using the EM algorithm and corrects for the positive bias induced by their presence.

*Significant P value using Fisher's combined probability test.

Supplemental Table – Forward and reverse sequences of the primers that failed for others markers.

#	ACCESSION or CLONE	PRIMERS	REPEAT	#REPEATS	Pred Size	Amplification
1	AY34598	CTCGCTCAAGCTGAAGAACC TTGGCGTTAATTGCTGCC	ACT	6	239	Monomorph
2	AF338654	AAACCAAGCCCTGATTTTCG CGTAAGCCAAGAGCAACAAC	CAA	8	253	Monomorph
4	AY499540	AACCAACAACAGCGCTC TTGGTTGCTATACTCGCCAG	CAA	6	231	Failed
5	BAC124C17	CGACAGTTTGATTGATACC GTGCCACGAGTCGAATG	CTT	49	366	Monomorph
5	BACAEG128	ACACTCCTTACTCAACGC CCGATATCTTCACACAGC	AAT	8	297	Monomorph
7	BACD6L600	ATATGGAGATGAACCAGCC CCTTAATCGACTCTTCCAG	AAT	6	221	Monomorph
3	BACMALI	TACTCAGTAGCTACCAGCC GTATCATCGTACCTGCC	CTT	6	245	Monomorph
9	AC150254	GTGAAATCAATGCCCTGTACG GGGATGATTGCTGATGAAGAG	AAG	7	155	Failed
2	CR937894b	GAGCAATAAGACGCCTAATG GGAACCTAGGCTTCCCTCCAC	AAC	6	202	Monomorph
3	AY499540	AACCAACAACAGCGCTC TTGGTTGCTATACTCGCCAG	AAC	6	270	Monomorph
4	CC874627	TGGAGGCGAATGACTATG CGACCAGTGGATTACGACAG	AAT	9	180	Monomorph
5	CC873850	TGCTACATGCTCTGACACG TGGCAATGTTCTTGTTGACC	AAT	6	190	Monomorph
3	CC873535	TGCCACACGTATGGTAAAGG GGATATTCTTCGTGAGTTCCG	AAT	24	230	Monomorph
7	CC872233	GGCGGAAAATCTCCCTAATAAAG CTGATCGAATCTGGATCTGG	AAT	6	175	Monomorph
3	CC867509	ATTTGGTATGGAGGCGAATG TTCCTCAGCTTTGGTAGGTG	AAT	27	235	Monomorph
9	AY170874	TGCAGGCCAACAACAAC CACATCACGATGGTAGCCAG	CGT	7	242	Failed
2	AF134901	GATGGAGACGAACCAGCC CCGATGGAACATCCATG	AAT	9	153	Monomorph
3	AC150255	CCACCGATATACGAATGTG CCTTGCCGTCTATCTTG	GAA	14	186	Monomorph
4	U91682	GGCTCTCTTCGCCGTG CAACAGGTTGGCTCCG	ACC	7	220	Monomorph
5	AF134902	CCTCTCAACGCGAAGCCG CCTCGCTGTTCCAGCACTCC	AAT	20	125	Monomorph
5	AAGE02002121.1	CTGAGAAGCAGGCTCTGTCC CTCGTACCGTTTCGTCACAA	AAG	12	144	Monomorph
7	AAGE02002242.1	TGCCACACGTATGGTAAAGTG TTTGTGCAAGAACTTCAAAGG	AAT	12	181	Monomorph
5	AAGE02002242.1	TCAACAACACAAACCAAGTCAA AAGCCGTCTTCAGTGTTGTG	AAT	7	128	Monomorph
4	AAGE02002143.1	GATTATTGGCCACCTGATCG	ATC	7	195	Failed

AAGE02002143.1	TGATAAGGCTTTGTGTTTCCA TTTCGAACGGTACATCATCCT GAGAGGGCGGTGATCAAAT	ATT	9	169	Monomorph
AAGE02010503.1	CCCAGTGAGGACGTTAATGC TCGTTATCACGCCAATTTCA	AAG	13	196	Failed
AAGE02017037.1	CTGAGAAGCAGGCTCTGTCC CAGCATTGAGCATGAAGCAT	AAG	11	122	Monomorph
AAGE02025228.1	TTTGAGCAATTTGATACAGTTTCTTC AATTCGACATGAATGCCACA	ATT	13	189	Failed
AAGE02010471.1	TGAAGGTACCGTACAACAGGA TCAATGGGATCAGAATCAGAAA	ATT	7	196	Monomorph
AAGE02020837.1	CAGTGTGTCATATTCGTGCAA TCTTCTGCTCGGGTAGAGTTG	ATT	6	130	Monomorph
AAGE02001053.1	CCAGTGAGGACGTAATGCTAAG TCACTGTAGCAACCATTGACA	AAG	10	198	Failed
AAGE02025375.1	CGCTATTTAATCATACCGTCCA CGATTTCAAGTGCAATGTTCA	ATT	8	163	Failed
AAGE02025240.1	TCCCAGTTGGGACGTAATG TGGCAATGGCAATAAGTTTG	AAG	8	236	Monomorph
AAGE02001029.1	CTGGAAGCAGACACAAATGC TTTGCCCTTCCAGTGTAGGT	AAT	8	101	Failed
AAGE02020841.1	TGCCAGATTGATCTAGGGAAA AACCAGCCTAGGGCTGAAA	AAT	6	149	

Figure 1. Collection sites (●) and the Oswaldo Cruz Foundation (+). Clustered sites in the North, Central and South metropolitan areas. All sites are on the All Saints Bay side of the peninsula.

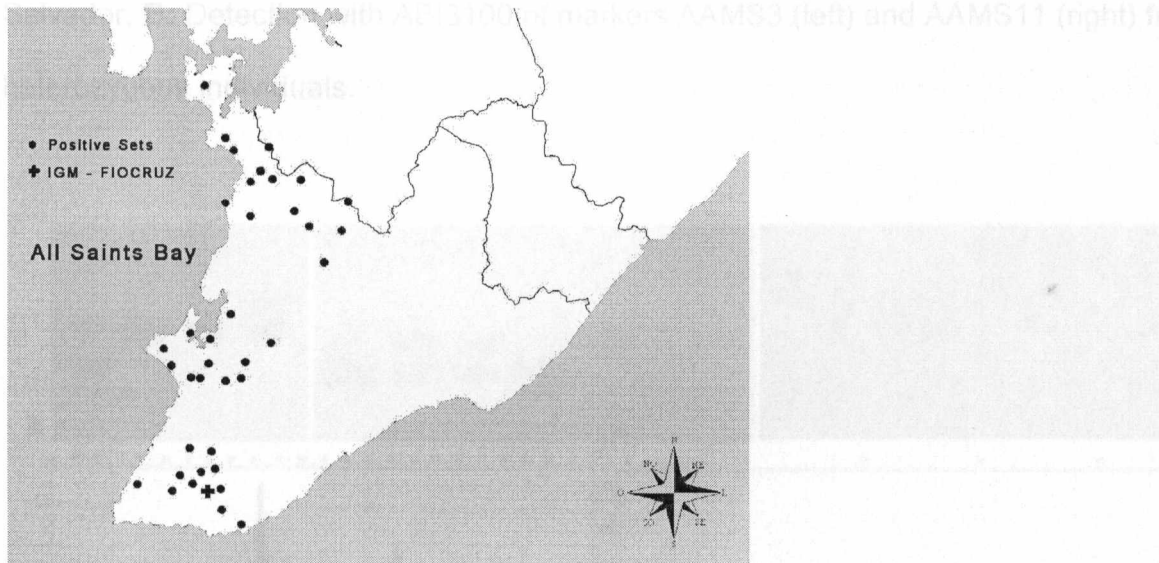
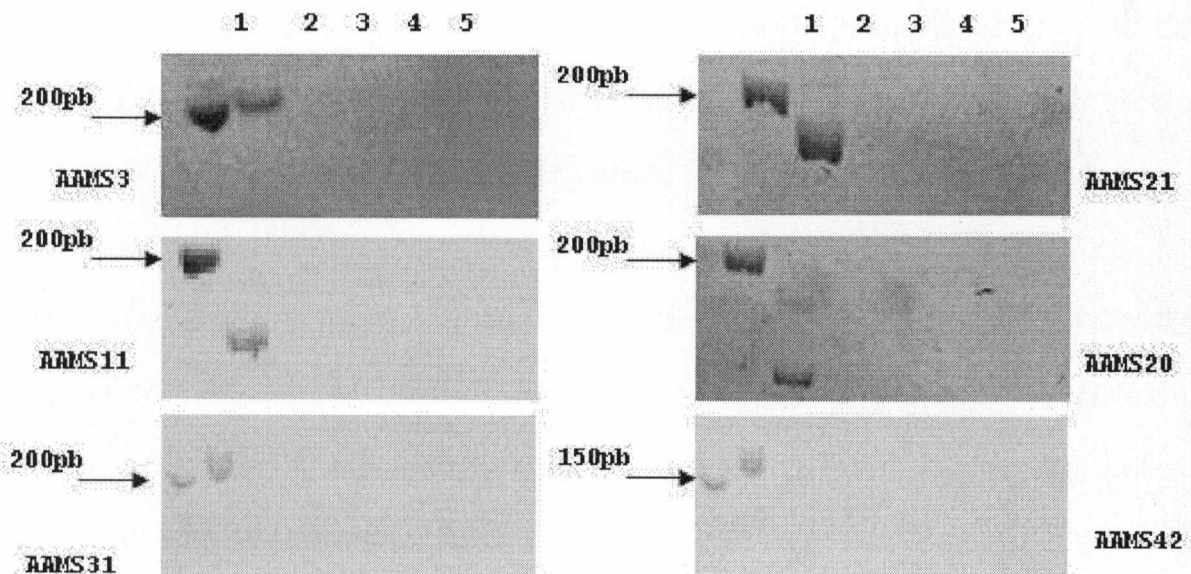


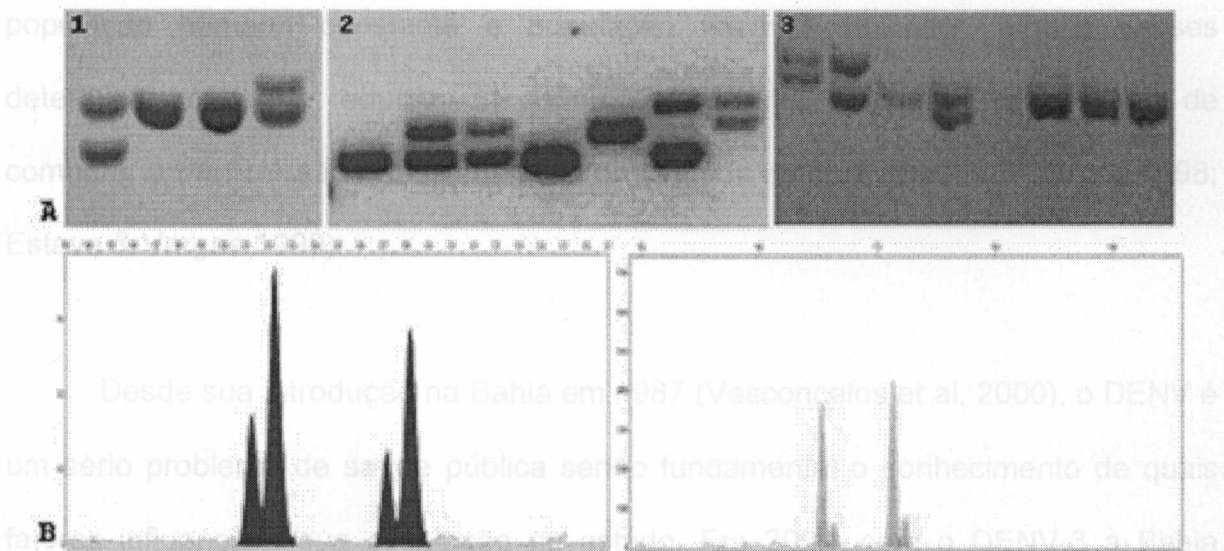
Figure 2. Specificity of the markers with (1) *Aedes aegypti*, (2) *Aedes albopictus*, (3) *Culex quinquefasciatus*, (4) *L. longipalpis* and (5) human DNA. MW marker 200 bp.



5 – DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

O conhecimento da disseminação de um agente infeccioso é de fundamental

Figure 3. Native polyacrylamide gels (12.5%) of genotyping products: **A:** for individual from (1) the Johns Hopkins *Ae. aegypti* colony, (2) South and (3) North areas of Salvador. **B:** Detection with ABI3100 of markers AAMS3 (left) and AAMS11 (right) from heterozygous individuals.



Desde sua introdução na Bahia em 1987 (Vasconcelos et al., 2000), o DENV é um sério problema de saúde pública sendo fundamental o conhecimento de quais fatores influenciaram a disseminação do vírus. Em 2000, o DENV-3 a Bahia experimentou uma epidemia explosiva com a ocorrência dos primeiros casos de FHD. A introdução, e consequentemente a disseminação, desse sorotipo se iniciou provavelmente pela cidade de Salvador, sendo seguida por rápida dispersão para outras cidades influenciada principalmente pelo fluxo de pessoas, distância da capital e população de insetos de cada município. Os sorotipos DENV-1 e DENV-2 não se correlacionaram de maneira significativa com distância da capital e fluxo de veículos, reforçando a hipótese de que Salvador possivelmente foi o ponto de introdução e consequentemente de disseminação do DENV-3. Os sorotipos anteriormente presentes, DENV-1 e DENV-2, sofriam influência principalmente do

5 – DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

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 a saúde e conseqüentemente à população. Estudos para entendimento da dinâmica de agentes infecciosos têm ainda sido limitados e pouco robustos. Trabalhos têm proposto modelos interessantes para a transmissão do vírus da dengue em uma população humana constante e população variável de vetor, alguns desses 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; Esteva & Vargas 1999).

Desde sua introdução na Bahia em 1987 (Vasconcelos et al. 2000), o DENV é um sério problema de saúde pública sendo fundamental o conhecimento de quais fatores influenciam sua circulação no estado. Em 2002, com o DENV-3 a Bahia experimentou uma epidemia explosiva com a ocorrência dos primeiros casos de FHD. A introdução, e conseqüentemente a disseminação, desse sorotipo se iniciou provavelmente pela cidade de Salvador, sendo seguida por rápida dispersão para outras cidades influenciada principalmente pelo fluxo de pessoas, distância da capital e população de insetos de cada município. Os sorotipos DENV-1 e DENV-2 não se correlacionaram de maneira significativa com distância da capital e fluxo de veículos, reforçando a hipótese de que Salvador possivelmente foi o ponto de introdução e conseqüentemente de disseminação do DENV-3. Os sorotipos anteriormente presentes, DENV-1 e DENV-2, sofriram influência principalmente do

perfil imune da população, dessa forma, não apresentava um padrão que pudesse ser interpretado por possuir uma fonte recente de introdução.

A organização da vigilância epidemiológica, com relação a quais vírus circula em cada período do ano, aplicada na dengue é fundamental para respostas adequadas pelas autoridades de saúde pública. Ainda, o método utilizado para o diagnóstico é determinante para a resposta em tempo adequado das autoridades de saúde a uma emergência epidêmica. Com o método utilizado para vigilância epidemiológica atualmente, o isolamento viral em células C6/36 (método aconselhado pela Organização Mundial de Saúde - OMS), é ainda difícil obter respostas efetivas por conta do tempo necessário entre a realização do diagnóstico e o retorno para a vigilância epidemiológica.

Desde o trabalho de Barnes & Rosen o papel de determinantes virais na patogênese da doença tem sido destacado. Neste estudo de uma epidemia causada pelo DENV-2, ocorrida no Sul do Pacífico na Ilha Niue, na qual um alto número de FHD em infecções primárias levou a uma grande quantidade de mortes (Barnes & Rosen 1974; Rosen 1977). Tendo em vista a importância do conhecimento dos genótipos circulantes do DENV em uma área endêmica (Domingo et al. 2004) foi realizado seqüenciamento e análise filogenética em amostras de 2005 e 2006. Nas amostras sequenciadas foi determinado que o DENV-3 circulante em nosso estado é do genótipo III (genótipo Indiano com valores de *bootstrap* em cerca de 80%), esse genótipo tem sido implicado em epidemias de FHD em diferentes regiões do mundo (Uzcategui et al., 2003; Dash et al., 2006; Miagostovich et al., 2006). Em contraste com recente trabalho no qual foi determinado a co-circulação de dois genótipos do

DENV-3 na região Norte do Brasil, não identificamos outro genótipo nas amostras estudadas (Nogueira et al. 2008). Para o DENV-2 foi determinado o genótipo South East Asia (genótipo Asiático ou Asian/American), o qual foi introduzido nas Américas em 1981 com a histórica epidemia de Cuba (Nogueira et al. 2008). Esse sorotipo circula ativamente na Bahia desde sua introdução em 1995 quando se disseminou para todo o estado. O DENV-2, juntamente com DENV-1, pode ter causado cerca de 560,000 casos de dengue somente em Salvador num período de 12 meses (Teixeira Mda et al. 2002). Uma questão que merece ser pontuada é o fato de somente uma amostra ter sido sequenciada por limitação das condições das mesmas para testes com biologia molecular.

Sem a disponibilidade de uma vacina efetiva o mais importante foco do programa de controle da dengue tem sido o *Aedes aegypti*, principal vetor implicado na transmissão dessa doença em nosso meio. A capacidade do mosquito em se dispersar, mesmo tendo uma baixa capacidade de vôo, é um desafio para as autoridades de saúde pública em todo o mundo. Tradicionalmente, a principal estratégia para o controle do *Aedes aegypti* é eliminar os focos e/ou impedir que fêmeas grávidas cheguem até a água nos depósitos que não pode eliminar. Para o combate ao adulto, utilizam-se com mais freqüência os inseticidas organofosforados e piretróides, geralmente durante as epidemias da doença. Mesmo com a utilização dessa ferramenta de controle do *Aedes aegypti*, pouco é conhecido da dinâmica de população desse mosquito. Trabalhos têm proposto novas alternativas para acessar a estrutura genética de população de diferentes insetos incluindo *Aedes aegypti* (Chambers et al. 2007; da Costa-Ribeiro et al. 2007).

No Rio de Janeiro marcadores de microssatélites foram usados com sucesso demonstrando alto polimorfismo quando comparados com isoenzimas na determinação de diferenças genéticas entre populações de uma área urbana (da Costa-Ribeiro et al. 2006). É importante destacar algumas características apresentadas pelos nossos marcadores permitindo sua aplicação em estudos epidemiológicos. Primeiro, foi determinada a especificidade dos primers para DNA de *Aedes aegypti*, isso é um aspecto importante considerando a possibilidade de erros na classificação dos mosquitos. Além disso, os primers amplificaram amostras de diferentes regiões geográficas, indicando a potencial aplicação em populações de diferentes localidades incluindo países diferentes, já que foram testadas amostras da Jonh Hopkins University (Baltimore-EUA), Ceará e Salvador.

A aplicação de microssatélites para estudos de genética população de *Aedes aegypti* tem sido utilizada em diferentes trabalhos (Huber et al. 1999; da Costa-Ribeiro et al. 2007). No Camboja, por exemplo, foi estudado a influência do tipo de criadouros na dispersão do mosquito e conseqüentemente na variação da estrutura genética de população (Paupy et al. 2004). Nas amostras estudadas em Salvador tentamos observar a existência de estrutura genética de população em três localidades reconhecidas como Norte (subúrbio ferroviário), Central (principalmente a península de Itapagipe) e a região Sul (Barra, Brotas, Federação, parte da Orla). Apesar de nossos resultados serem um estudo piloto com apenas quatro marcadores, ele indica a existência de estrutura genética entre as regiões Sul e Norte, indicando que a distância se apresenta como uma barreira para o movimento de *Aedes aegypti* nestes dois sítios. Ainda, é importante lembrar que os dados apesar de preliminares podem representar uma variação temporal e, desta forma,

devem ser confirmados por aumento do número de amostra e marcadores. Por outro lado, na epidemia de 1995 onde DENV-2 produzia uma epidemia em Salvador, a dinâmica da ocorrência de casos dentro da cidade era observada principalmente da região Central para a parte Sul da cidade (Barreto et al., 2008), confirmando a possibilidade de isolamento entre o Norte e a parte Central da cidade demonstrada pelo *Fst* maior entre as comparações destas localidades.

O desenvolvimento de novos marcadores juntamente com a utilização de microssatélites publicados deverá aumentar o poder das análises, nos permitindo fazer investigações com respostas mais efetivas a questões importantes sobre a estrutura genética de população de *Aedes aegypti*, numa cidade como Salvador, e consequentemente sobre a epidemiologia da dengue. Uma questão que pode auxiliar as campanhas de combate ao vetor será a possibilidade de determinação da capacidade de movimento de uma dada população de mosquitos dentro de uma localidade. Esse tipo de informação poderá orientar fortemente uma medida de saúde pública contra a dengue definindo áreas com maior necessidade de utilização de inseticidas/larvicidas contra o vetor. Finalmente, uma característica importante desse trabalho é o fato de terem sido abordados questões relacionadas diretamente com o melhor entendimento da dengue como disseminação viral em grandes áreas, determinação de cepas circulantes e estrutura genética de população em uma área urbana do principal vetor em nosso meio. Uma tríade fundamental, a ser investigada, para o melhor entendimento de como essa arbovirose se transformou em uma das doenças transmitidas por vetor de maior impacto na saúde pública mundial como podemos observar nos últimos anos.

6 - CONCLUSÕES

1. A introdução do DENV-3 ocorreu provavelmente através de Salvador com disseminação para diferentes cidades do estado em menos de 30 dias;
2. Dada sua correlação com distância do local de introdução e fluxo de veículos, o mecanismo de disseminação foi possivelmente o movimento de pessoas a partir de Salvador;
3. Índices de infestação predial não se ajustaram ao modelo de disseminação proposto nesse trabalho, ao contrário do tamanho da população;
4. A partir de análises filogenéticas foi determinado que os genótipos para os sorotipos 2 e 3 (DENV-2 e 3) são o genótipo Asian/American e genótipo III, respectivamente;
5. Marcadores de microssatélites são úteis em estudos de estrutura genética de população de *Aedes aegypti*;
6. Aplicando somente cinco marcadores não foi detectada grande estrutura genética entre as populações de *Aedes aegypti* das regiões Norte, Central e Sul da cidade de Salvador;
7. O desenvolvimento de mais marcadores de microssatélites é fundamental para que um mapa refinado do movimento de populações de *Ae. aegypti* em uma localidade como Salvador possa ser determinado.

7 - Referências Bibliográficas

Acioli-Santos, B.; Segat, L.; Dhalia, R.; Brito, C. A.; Braga-Neto, U. M.; Marques, E. T.; Crovella, S. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Hum Immunol**, v. 69, n. 122-8, 2008.

Barbazan, P.; Yoksan, S.; Gonzalez, J. P. Dengue hemorrhagic fever epidemiology in Thailand: description and forecasting of epidemics. **Microbes Infect**, v. 4, n. 699-705, 2002.

Barreto, F. R.; Teixeira, M. G.; Costa Mda, C.; Carvalho, M. S.; Barreto, M. L. Spread pattern of the first dengue epidemic in the city of Salvador, Brazil. **BMC Public Health**, v. 8, n. 51, 2008.

Blanton, R. E.; Silva, L. K.; Morato, V. G.; Parrado, A. R.; Dias, J. P.; Melo, P. R.; Reis, E. A.; Goddard, K. A.; Nunes, M. R.; Rodrigues, S. G.; Vasconcelos, P. F.; Castro, J. M.; Reis, M. G.; Barreto, M. L.; Teixeira, M. G. Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. **Eur J Hum Genet**, v. 16, n. 762-5, 2008.

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**, v. 2, n. 133-5, 1996.

Bruford, M. W.; Wayne, R. K. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Curr Opin Genet Dev**, v. 3, n. 939-43, 1993.

Chambers, E. W.; Meece, J. K.; McGowan, J. A.; Lovin, D. D.; Hemme, R. R.; Chadee, D. D.; McAbee, K.; Brown, S. E.; Knudson, D. L.; Severson, D. W. Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **J Hered**, v. 98, n. 202-10, 2007.

da Costa-Ribeiro, M. C.; Lourenco-de-Oliveira, R.; Failloux, A. B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 917-21, 2006.

da Costa-Ribeiro, M. C.; Lourenco-de-Oliveira, R.; Failloux, A. B. Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 303-9, 2007.

Dash, P. K.; Parida, M. M.; Saxena, P.; Abhyankar, A.; Singh, C. P.; Tewari, K. N.; Jana, A. M.; Sekhar, K.; Rao, P. V. Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: implications for increased incidence of DHF & DSS. **Virology**, v. 3, n. 55, 2006.

Domingo, C.; Palacios, G.; Niedrig, M.; Cabrerizo, M.; Jabado, O.; Reyes, N.; Lipkin, W. I.; Tenorio, A. A New Tool for the Diagnosis and Molecular Surveillance of Dengue Infections in Clinical Samples. **Dengue Bulletin**, v. 28, n. 87-95, 2004.

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**, v. 274, n. 292-308, 2000.

Dumas, V.; Herder, S.; Bebba, A.; Cadoux-Barnabe, C.; Bellec, C.; Cuny, G. Polymorphic microsatellites in *Simulium damnosum* s.l. and their use for differentiating two savannah populations: implications for epidemiological studies. **Genome**, v. 41, n. 154-61, 1998.

Esteva, L.; Vargas, C. Analysis of a dengue disease transmission model. **Math Biosci**, v. 150, n. 131-51, 1998.

Esteva, L.; Vargas, C. A model for dengue disease with variable human population. **J Math Biol**, v. 38, n. 220-40, 1999.

Estoup, A.; Solignac, M.; Cornuet, J. M.; Goudet, J.; Scholl, A. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. **Mol Ecol**, v. 5, n. 19-31, 1996.

Figueiredo, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect**, v. 2, n. 1643-9, 2000.

Figuerola, R.; Ramos, C. Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. **Arch Med Res**, v. 31, n. 429-30, 2000.

Gertsch, P.; Pamilo, P.; Varvio, S. L. Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants. **Mol Ecol**, v. 4, n. 257-60, 1995.

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**, v. 33, n. 158-65, 1984.

Guzman, M. G.; Kouri, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 621-7, 1996.

Guzman, M. G.; Kouri, G. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 33-42, 2002.

Guzman, M. G.; Kouri, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis**, v. 8, n. 69-80, 2004.

Halstead, S. B.; Nimmannitya, S.; Cohen, S. N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **Yale J. Biol. Med** v. 42, n. 311-328, 1970.

Huber, K.; Mousson, L.; Rodhain, F.; Failloux, A. B. Short report: microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 1001-3, 1999.

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**, v. 40, n. 418-27, 1989.

Jelinek, T. Dengue fever in international travelers. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 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**, v. 35, n. 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**, v. 39, n. 3672-7, 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**, v. 40, n. 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**, v. 30, n. 545-51, 1992.

Lanzaro, G. C.; Zheng, L.; Toure, Y. T.; Traore, S. F.; Kafatos, F. C.; Vernick, K. D. Microsatellite DNA and isozyme variability in a west African population of *Anopheles gambiae*. **Insect Mol Biol**, v. 4, n. 105-12, 1995.

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**, v. 8, n. 377-88, 2001.

Leitmeyer, K. C.; Vaughn, D. W.; Watts, D. M.; Salas, R.; Villalobos, I.; de, C.; Ramos, C.; Rico-Hesse, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **J Virol**, v. 73, n. 4738-47, 1999.

Loke, H.; Bethell, D.; Phuong, C. X.; Day, N.; White, N.; Farrar, J.; Hill, A. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 67, n. 102-6, 2002.

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**, v. 10, n. S98-109, 2004.

Miagostovich, M. P.; dos Santos, F. B.; Fumian, T. M.; Guimaraes, F. R.; da Costa, E. V.; Tavares, F. N.; Coelho, J. O.; Nogueira, R. M. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 307-13, 2006.

Miagostovich, M. P.; Nogueira, R. M.; Schatzmayr, H. G.; Lanciotti, R. S. Molecular epidemiology of DEN-2 virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 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**, v. 29, n. 1197-205, 1985.

Nogueira, M. B.; Stella, V.; Bordignon, J.; Batista, W. C.; Borba, L.; Silva, L. H.; Hoffmann, F. G.; Probst, C. M.; Santos, C. N. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 483-8, 2008.

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**, v. 93, n. 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**, v. 85, n. 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**, v. 94, n. 297-304, 1999.

Nogueira, R. M.; Schatzmayr, H. G.; de Filippis, A. M.; dos Santos, F. B.; da Cunha, R. V.; Coelho, J. O.; de Souza, L. J.; Guimaraes, F. R.; de Araujo, E. S.; De Simone, T. S.; Baran, M.; Teixeira, G., Jr.; Miagostovich, M. P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 1376-81, 2005.

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**, v. 86, n. 269, 1991.

Osanaí, C. H.; Travassos da Rosa, A. P. A.; Tang, A. T. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima: Nota Prévia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 23, n. 53-54, 1986.

Paupy, C.; Chantha, N.; Huber, K.; Lecoq, N.; Reynes, J. M.; Rodhain, F.; Failloux, A. B. Influence of breeding sites features on genetic differentiation of *Aedes aegypti* populations analyzed on a local scale in Phnom Penh Municipality of Cambodia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 73-81, 2004.

- Pinheiro, F. P. Dengue in the Americas. 1980-1987. **Epidemiol Bull**, v. 10, n. 1-8, 1989.
- Pinheiro, F. P.; Corber, S. J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. **World Health Stat Q**, v. 50, n. 161-9, 1997.
- Ravel, S.; Monteny, N.; Velasco Olmos, D.; Escalante Verdugo, J.; Cuny, G. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. **Acta Trop**, v. 78, n. 241-50, 2001.
- Rego, J. P. Esboço histórico das epidemias que tem grassado na Cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 1872., v., n., 1872.
- 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**, v. 230, n. 244-51, 1997.
- 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**, v. 67, n. 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**, v. 352, n. 971-7, 1998.
- Rigau-Perez, J. G.; Vorndam, A. V.; Clark, G. G. The dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico, 1994-1995. **Am J Trop Med Hyg**, v. 64, n. 67-74, 2001.

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**, v. 38, n. 3508-10, 2000.

Rothman, A. L.; Ennis, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 257, n. 1-6, 1999.

Salda, L. T.; Parquet, M. D.; Matias, R. R.; Natividad, F. F.; Kobayashi, N.; Morita, K. Molecular epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: genotype shift and local evolution. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 796-802, 2005.

Solano, P.; De La Rocque, S.; De Meeus, T.; Cuny, G.; Duvallet, G.; Cuisance, D. Microsatellite DNA markers reveal genetic differentiation among populations of *Glossina palpalis gambiensis* collected in the agro-pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. **Insect Mol Biol**, v. 9, n. 433-9, 2000.

Solano, P.; Duvallet, G.; Dumas, V.; Cuisance, D.; Cuny, G. Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). **Acta Trop**, v. 65, n. 175-80, 1997.

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**, v. 40, n. 5-12, 1988.

Teixeira Mda, G.; Barreto, M. L.; Costa Mda, C.; Ferreira, L. D.; Vasconcelos, P. F.; Cairncross, S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. **Trop Med Int Health**, v. 7, n. 757-62, 2002.

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**, v. 34, n. 269-74, 2001.

Twiddy, S. S.; Farrar, J. J.; Vinh Chau, N.; Wills, B.; Gould, E. A.; Gritsun, T.; Lloyd, G.; Holmes, E. C. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. **Virology**, v. 298, n. 63-72, 2002.

Uzcategui, N. Y.; Comach, G.; Camacho, D.; Salcedo, M.; Cabello de Quintana, M.; Jimenez, M.; Sierra, G.; Cuello de Uzcategui, R.; James, W. S.; Turner, S.; Holmes, E. C.; Gould, E. A. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. **J Gen Virol**, v. 84, n. 1569-75, 2003.

Vasconcelos, P. F.; de Menezes, D. B.; Melo, L. P.; Pessoa, 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**, v. 37, n. 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**, v. 33, n. 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**, v. 35, n. 141-8, 1993.

Vazquez, S.; Valdes, O.; Pupo, M.; Delgado, I.; Alvarez, M.; Pelegrino, J. L.; Guzman, M. G. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. **J Virol Methods**, v. 110, n. 179-84, 2003.

Viard, F.; Bremond, P.; Labbo, R.; Justy, F.; Delay, B.; Jarne, P. Microsatellites and the genetics of highly selfing populations in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. **Genetics**, v. 142, n. 1237-47, 1996.

Whitehead, S. S.; Blaney, J. E.; Durbin, A. P.; Murphy, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 518-28, 2007.

Wilder-Smith, A.; Gubler, D. J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med Clin North Am**, v. 92, n. 1377-90, x, 2008.

Yebakima, A.; Charles, C.; Mousson, L.; Vazeille, M.; Yp-Tcha, M. M.; Failloux, A. B. Genetic heterogeneity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique. **Trop Med Int Health**, v. 9, n. 582-7, 2004.

8 - Anexos

8.1 – Trabalhos relacionados publicados no período do Doutorado

SHORT REPORT

Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population

Ronald E Blanton^{*1}, Luciano K Silva², Vanessa G Morato³, Antonio R Parrado⁴,
Juarez P Dias⁵, Paulo RS Melo², Eliana AG Reis², Katrina AB Goddard⁴, Márcio RT Nunes⁶,
Sueli G Rodrigues⁶, Pedro FC Vasconcelos⁶, Jesuina M Castro⁵, Mitermayer G Reis²,
Maurício L Barreto³ and M Glória Teixeira³

¹Case Western Reserve University, Center for Global Health and Diseases, Cleveland, OH, USA; ²Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Rua Waldemar Falcão, 121, Salvador, Bahia, Brazil; ³Universidade Federal da Bahia, Institute of Collective Health, Salvador, Bahia, Brazil; ⁴Case Western Reserve University, Division of Genetic Epidemiology, Department of Epidemiology & Biostatistics, Wolstein Research Building, Cleveland, OH, USA; ⁵Secretaria da Saúde do Estado da Bahia, 4a Avenida do CAB, no 400, Lado B, CAB, Salvador, Bahia, Brazil; ⁶Instituto Evandro Chagas, Department of Arbovirology and Hemorrhagic Fever, Belém, Pará, Brazil

To test whether African ancestry is protective for severe dengue, we genotyped 49 hospitalized cases of dengue hemorrhagic fever (DHF) as well as 293 neighborhood cases of dengue fever and 294 asymptomatic controls in Salvador, Bahia, Brazil. Ancestry-informative markers and 282 unlinked SNPs not associated with the clinical presentation of dengue were used to estimate ancestry. After controlling for income, both self-defined Afro-Brazilian ethnicity and African ancestry were protective for DHF ($P=0.02$, $OR=0.28$ and $P=0.02$, $OR=0.13$, respectively). Income or an index of income indicators, however, was also independently associated with the diagnosis of DHF.

European Journal of Human Genetics (2008) 16, 762–765; doi:10.1038/ejhg.2008.4; published online 13 February 2008

Keywords: ethnicity; race; population structure; socioeconomic status; DENV3

Introduction

The epidemiology of dengue hemorrhagic fever (DHF) suggests that some ethnically defined populations differ in their susceptibility. In the Cuban dengue epidemics of 1981 and 2001, African ancestry appeared to be relatively protective for DHF and dengue shock syndrome, but not

for classic dengue fever (DF).¹ In Haiti, from 1994 to 1999, no cases of DHF were reported despite intense circulation of three serotypes,² and although dengue virus circulates sporadically in Africa, there have been no reported epidemics of DHF.³ Socioeconomic factors also may influence the severity of dengue. In Asia, ethnic Chinese in Singapore show a higher attack rate for DHF compared to ethnic Malays and Asian Indians.⁴ In Trinidad, however, it was the Pakistani/Asian Indian population that appeared to disproportionately suffer severe disease.⁵ In each case, the economically more advantaged group was more affected. As income and ethnic background are inter-related, we tested these associations using self-declared

*Correspondence: Dr R Blanton, Center for Global Health and Disease, Case University, Wolstein Research Building, 2103 Cornell Road, Cleveland, OH 44106-7286, USA.

Tel: +1 216 368 4814; Fax: +1 216 368 4825;

E-mail: reb6@case.edu

Received 24 April 2007; revised 15 December 2007; accepted 6 January 2008; published online 13 February 2008

ethnicity, genetic ancestry and income in Salvador, Bahia, Brazil.

Materials and methods

Population

The Bahia State Secretariat of Health identified 91 presumptive cases of grade II DHF during 2002 and 2003 in the capital city of Salvador by active surveillance of city hospitals. Of those, 31 met all World Health Organization diagnostic criteria⁶ (confirmed) and 34 met all criteria, except for documentation of hemoconcentration (suspected). Of those with confirmed or suspected DHF, 55 were contacted and agreed to participate in the study along with at least four neighbors who reported having classic dengue fever in 2002 ($n=293$) and four who reported to have never experienced symptoms of dengue ($n=294$). The controls were matched for age above or below 15, but not for sex.⁷ Demographic, socioeconomic and environmental data as well as 10 ml of blood were collected from all subjects. Written informed consent was obtained from participants and/or their guardians. The study was approved by the ethical review boards of University Hospitals of Cleveland, the Oswaldo Cruz Foundation, Bahia and the Brazilian National Commission on Ethics in Research.

Serology and genotyping

The Evandro Chagas Institute's Arbovirus Laboratory performed the dengue IgG ELISAs (positive = titer <1:40). Genomic DNA was genotyped by Illumina BeadArray (Illumina, CA, USA). Six replicates and two trios were used to guide the clustering and to calculate error rates. Two different analysts interpreted the genotyping results using GenCall software v. 6.2.0.4 (Illumina, CA, USA). For estimating ancestry, 30 ancestry informative markers (AIMs)⁸ and 282 unlinked SNPs not associated with the clinical presentation of dengue were genotyped.

Data analysis

Logistic regression was performed using SPSS v. 10 (SPSS Inc., IL, USA). Self-declared ethnicity followed categories (white, mixed, black, Indian/Asian) recognized by the Brazilian Census (*Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE*). 'Income' was reported in government-defined units of Monthly Minimum Salaries (1-MMS = US\$97.03 in 2004). This was normalized by $\log_{10}(\text{MMS} + 1)$ transformation. Income was further transformed into an index based on the sum of coefficients from linear regression of socioeconomic variables that were significantly correlated with log income.

Genetic ancestry was estimated with the program Structure 2.1⁹ under the admixture model assuming independent population allele frequencies. The burn-in length was 10000 with 100000 iterations. The major

populations of origin were European and African; therefore, two subpopulations ($K=2$) were modeled. Summary statistics indicated convergence, and the results from three runs were consistent. The ancestry estimates were graphed with the program DISTRUCT.¹⁰ Corresponding genotypes for 60 individuals from the Nigerian Yoruba ethnic group and 60 ethnic Caucasians (pseudoancestors) were obtained from the Hapmap Project database and included for comparison and to improve the ancestry estimates.¹¹

Results

For each group, 8–11% were excluded for a negative dengue IgG ELISA. For DHF, 19 suspected and 30 confirmed cases were analyzed. The DF group had significantly lower income than any of the other groups, but age and sex distributions were similar for all. Mean income by ethnicity was similar to that reported by the IBGE for Salvador. Results did not differ significantly using either income or the income index (not shown). Results using the index will be presented, as this was available for all individuals compared to 87% for income.

The genotype calls for the two analysts were highly correlated ($r=0.99 \pm 0.03$), and genotyping was successful for 93.5% of the markers and 98.8% of the samples. The error rate was low by replicate (0.13%), sexual (0.01%) and Mendelian (0.07%) inconsistencies. Seven SNP genotypes using a primer extension method for 65 samples were consistent with the Illumina genotype results.

The mean African ancestry for the whole population differed significantly if AIMs alone (0.54), unlinked non-AIMs (0.42) or both markers (0.44) were used (all P 's < 0.001

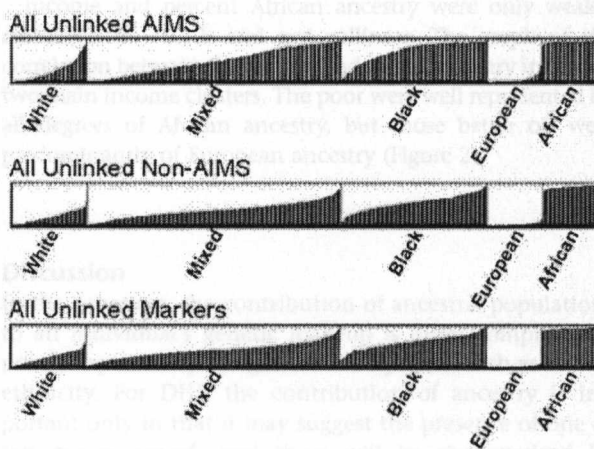


Figure 1 Admixture estimates. Ancestry estimates based on 312 unlinked markers and modeled for two populations ($K=2$). The ethnic or geographic classifications were ordered for increasing African ancestry. Each line represents % African ancestry (black) and % European ancestry (white) for one individual.

Table 1 Suspected and confirmed DHF, ethnicity and income

Models	Variables	DHF vs DF & asymptomatic			DHF vs DF			DHF vs asymptomatic		
		P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI
<i>Ethnicity and DHF</i>										
Suspected and confirmed DHF ^a	Sex	0.74	1.11	0.59–2.09	0.91	1.04	0.52–2.07	0.59	1.20	0.62–2.31
	Age	0.07	0.98	0.96–1.00	0.09	0.98	0.96–1.00	0.06	0.98	0.96–1.00
	Mixed ^b	0.74	0.88	0.42–1.86	0.50	0.75	0.33–1.71	0.99	0.99	0.45–2.20
	Black	<0.05	0.35	0.13–0.98	0.02	0.28	0.10–0.81	0.13	0.44	0.15–1.28
Confirmed DHF only	Income index	0.01	8.73	1.84–41.48	<0.01	13.33	2.36–75.29	0.03	6.37	1.22–33.40
	Sex	0.32	1.51	0.67–3.40	0.43	1.41	0.60–3.35	0.26	1.61	0.70–3.69
	Age	0.57	0.99	0.97–1.02	0.71	1.00	0.97–1.02	0.46	0.99	0.97–1.02
	Mixed	0.85	1.10	0.41–2.92	0.94	0.96	0.34–2.72	0.75	1.18	0.43–3.26
	Black	0.30	0.51	0.14–1.82	0.20	0.42	0.11–1.58	0.44	0.60	0.16–2.22
	Income index	0.04	7.43	1.07–51.85	0.02	10.96	1.40–85.79	0.11	5.05	0.68–37.63
<i>Ancestry and DHF</i>										
Suspected and confirmed DHF	Sex	0.85	1.06	0.57–1.98	0.94	0.98	0.50–1.90	0.89	1.05	0.55–1.99
	Age	0.09	0.98	0.96–1.00	0.18	0.99	0.96–1.01	0.11	0.99	0.97–1.00
	%African ancestry	0.06	0.23	0.05–1.07	0.02	0.13	0.02–0.69	0.18	0.34	0.07–1.64
	Income index	0.03	5.88	1.17–29.69	0.01	9.71	1.70–55.62	>0.05	5.32	0.98–28.96
Confirmed DHF only	Sex	0.24	1.65	0.72–3.80	0.26	1.66	0.69–4.00	0.21	1.73	0.73–4.07
	Age	0.64	0.99	0.97–1.02	0.73	1.00	0.97–1.02	0.54	1.00	0.97–1.02
	%African ancestry	0.10	0.20	0.03–1.33	0.04	0.12	0.02–0.92	0.18	0.23	0.04–1.86
	Income index	0.07	6.38	0.84–48.27	0.04	9.57	1.15–79.66	0.16	4.49	0.55–36.52

^aSuspected DHF (*n* = 19), confirmed DHF (*n* = 30).

^bReference group White ethnicity. Those claiming predominantly Amerindian, Chinese or Japanese background comprised 2.1%.

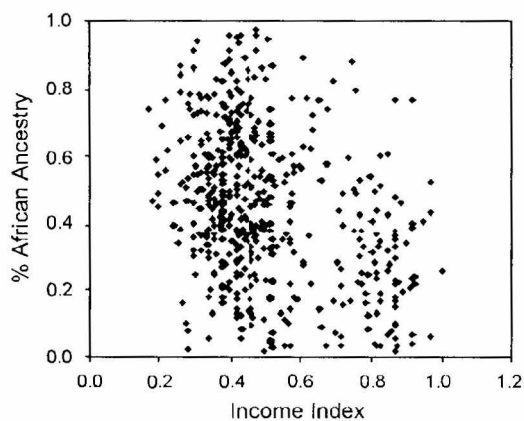


Figure 2 Correlation between ancestry and income. $r^2 = 0.12$. Ancestry estimates based on 312 unlinked markers. Income represented by the income index (see Methods).

by Student's *t*-test). Relative to the pseudoancestors, all ethnic groups had some degree of admixture (Figure 1).

When ethnicity was analyzed controlling for age, sex and income index, self-declared black ethnicity was significantly protective for DHF (Table 1). The association was primarily driven by comparing DHF with DF ($P = 0.02$; OR = 0.277). When only confirmed cases were considered, however, ethnicity was not significant for any comparison, perhaps due to sample size. Increasing income index increased risk and was the most consistent correlation.

An increasing percentage of genetic African ancestry was protective for DHF with or without controlling for the income index (Table 1). This association was also driven by the comparison of DHF with DF (OR 0.13). Income was significantly associated with all comparisons between DHF and DF, but not DHF and the asymptomatic group alone. The results did not differ significantly whether the analysis was conducted with only the AIMs or the non-AIMs (not shown).

Income and percent African ancestry were only weakly correlated ($r^2 = 0.12$) and not collinear. The graph of the correlation between the income index and ancestry indicated two main income clusters. The poor were well represented by all degrees of African ancestry, but those better off were predominantly of European ancestry (Figure 2).

Discussion

In the Americas, the contribution of ancestral populations to an individual's genetic makeup is often complex and poorly captured by categorical descriptions, such as race or ethnicity. For DHE, the contribution of ancestry is important only in that it may suggest the presence of one or few major genes², and these will be characterized by unequal distribution of polymorphisms depending on ancestral mixture.

For the population of Salvador, Brazil, dengue severity was significantly associated with both self-declared

ethnicity and ancestry, especially when compared to individuals presenting with DF. That the comparison of DHF with DF produces the strongest genetic associations has been reported previously.¹² The study also indicates that higher income, and by extension socioeconomic factors, is also strongly associated. Although rates of hospitalization may differ by income, we controlled for this variable.

Income-based differences in access to the health care system could explain how DHF might be associated with socioeconomic factors. DHF is a hospital-based diagnosis and may be made more frequently for economically advantaged individuals. In the USA, even where socioeconomic conditions are similar, utilization of the health care system may differ by ethnic group,¹³ and the same also occurs in Brazil.¹⁴ Finally, exposure to dengue may also differ by socioeconomic level and may help explain an association of DHF with income.¹⁵ Ancestry and income are important factors independently associated with the occurrence of DHF and must be considered as covariates in genetic studies of DHF.

Acknowledgements

This work was supported by NIH R21 AI056263. The authors thank Dr Niranjani Kanesa-thasan for his useful comments on serologies and the design of this project.

References

1 de la CSB, Garcia G, Perez AB *et al*: Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. *Viral Immunol* 2006; **19**: 662–668.

- 2 Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG *et al*: Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **65**: 180–183.
- 3 Gubler DJ: Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 480–496.
- 4 Guha-Sapir D, Schimmer B: Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* 2005; **2**: 1.
- 5 Brown T, Babb K, Nimrod M, Carrington C, Salas R, Monteil M: A retrospective study of the 1996 DEN-1 Epidemic in Trinidad: demographic and clinical features. *Dengue Bull* 2004; **28**: 7–19.
- 6 World Health Organization: *Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva: WHO, 1997.
- 7 Nguyen TH, Nguyen TL, Lei HY *et al*: Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2005; **72**: 370–374.
- 8 Parra EJ, Kittles RA, Shriver MD: Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research. *Nat Genet* 2004; **36**: S54–S60.
- 9 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000; **155**: 945–959.
- 10 Rosenberg NA: DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 2004; **4**: 137–138.
- 11 Tang H, Peng J, Wang P, Risch NJ: Estimation of individual admixture: analytical and study design considerations. *Genet Epidemiol* 2005; **28**: 289–301.
- 12 Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I *et al*: A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 2005; **37**: 507–513.
- 13 Smith WR, Betancourt JR, Wynia MK *et al*: Recommendations for teaching about racial and ethnic disparities in health and health care. *Ann Intern Med* 2007; **147**: 654–665.
- 14 Barata RB, de Almeida ME, Montero CV, da Silva ZP: Health inequalities based on ethnicity in individuals aged 15–64, Brazil, 1998. *Cad Saude Publica* 2007; **23**: 305–313.
- 15 Vasconcelos PF, Lima JW, da Rosa AP *et al*: [Dengue epidemic in Fortaleza, Ceará: randomized seroepidemiologic survey]. *Rev Saude Publica* 1998; **32**: 447–454.



Investigação de polimorfismos no genoma do vírus da Dengue

DOI: 10.3395/reciis.v1i2.Sup.102pt



**Roberto Fabian
Santos de Araújo**

Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil
menatw@gmail.com



Nicolas Carels

Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil / Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil
nicolas.carels@gmail.com

Paulo Roberto Santana de Melo

Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil / Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, CPqGM, Bahia, Brasil
pmelo11@yahoo.com.br

Diego Frias

Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil
diego.cepedi@gmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo caracterizar qualitativamente e quantitativamente o polimorfismo entre os quatro genótipos do vírus da Dengue - DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Estudou-se a Densidade de Substituição Nucleotídica (NSD - *Nucleotide Substitution Density*) ao longo de cada genoma, identificando as regiões com maior taxa de mutação e/ou conservação. Posteriormente calculou-se a Densidade Média de Substituição Nucleotídica (ANSND - *Average Nucleotide Substitution Density*) para cada sorotipo. Observou-se que a ANSND do DENV-2 é 44,21% maior que a do DENV-1, 85% maior que a do DENV-3 e 163,31% maior que a do DENV-4. Observou-se que, contrariamente a DENV-2 e DENV-4, DENV-1 e DENV-3 têm padrões de comportamento mutacional similar entre eles. O domínio do gene da NS5 correspondente à RNA polimerase RNA-dependente do DENV-2 também tem taxa de mutação superior aos outros DENV. Isto sugere que a taxa de polimorfismo e a virulência podem estar correlacionados no DENV-2, o que poderia contribuir para o estudo da evolução da doença.

Palavras-chave

Dengue, NS5, polimerase, virulência, polimorfismo

Introdução

O vírus da dengue é o mais importante flavivírus que causa doença em humanos no Brasil (FIGUEIREDO, 1998). A dengue é uma doença potencialmente fatal cuja disseminação rápida atraiu a atenção das autoridades públicas brasileiras na década de 1990. A presença simultânea de dois ou mais sorotipos do vírus da dengue (DENV) na mesma área – hiperendemicidade – aumenta o risco de complicação da doença, tais como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome de choque da dengue (SCD), provocada pela exacerbação de mecanismos imunológicos do hospedeiro. Portanto, é essencial compreender como o polimorfismo viral pode influenciar a patogenicidade (GUBLER, 1997; 1998).

O vírus da dengue, do ponto de vista geográfico, é o arbovírus mais difundido em diferentes partes do mundo, sendo encontrado em áreas tropicais e subtropicais, onde aproximadamente 3 milhões de pessoas estão em risco de infecção. A dengue foi identificada em mais de 100 países e 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (GUZMAN; KOURI, 2002). Ocorrem de 50 a 100 milhões de infecções/ano, dependendo da atividade epidêmica do vírus, com centenas de milhares de casos da forma severa da doença (FHD/SCD) e milhares de mortes (cerca de 25.000/ano).

Há quatro tipos sorologicamente distintos do vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Eles são antigenicamente diferentes e não induzem proteção imunológica cruzada, mas têm a mesma epidemiologia e causam doenças semelhantes em humanos. Todos os sorotipos do vírus mantêm um ciclo que envolve hospedeiros humanos e mosquitos *Aedes aegypti* como vetores (GUBLER, 2002; GONCALVEZ et al., 2002).

As origens dos vírus da dengue em circulação no Brasil foram determinadas com base em estudos filogenéticos de seqüências nucleotídicas, sendo os isolados de DENV-1 oriundos do Caribe e os isolados de DENV-2 mais especificamente da Jamaica, tendo ambos os vírus provavelmente sido introduzidos pelo Caribe (MIAGOSTOVICH et al., 1998; NOGUEIRA et al., 1991). O vírus DENV-3 foi isolado no Brasil pela primeira vez em 1999 de um paciente que voltou da Nicarágua (FIGUEIREDO, 2000).

A maioria dos casos de FHD/SCD esteve provavelmente associada com as infecções secundárias e heterotípicas, especialmente durante as epidemias de DENV-2 ocorridas após a ocorrência de casos de DENV-1 (FIGUEIREDO, 2000). As epidemias sucessivas de dengue no Brasil, causadas por DENV-1 e por DENV-2, culminaram com a ocorrência de FHD/SCD. Com a circulação contínua de dois sorotipos do vírus, e com o risco elevado da introdução de outros tipos, a dengue tornou-se um importante problema de saúde pública no Brasil (FIGUEIREDO, 2000).

Embora não tenha sido possível estabelecer uma correlação clara entre um sorotipo ou genótipo particular de DENV e a severidade da epidemia da doença, houve indicações de que certos genótipos de DENV-2 e de DENV-3 estão associados com DII. Em geral, genótipos

asiáticos parecem ser mais virulentos do que os genótipos inicialmente encontrados nas Américas e no Pacífico Sul (MESSER et al., 2003; RICO-HESSSE et al., 1997; WATTS et al., 1999). No caso de DENV-2, análises filogenéticas mostraram que o genótipo americano nativo estava associado apenas com febre da dengue (FD), enquanto que os genótipos asiáticos foram correlacionados com casos de FHD (CLYDE et al., 2006).

O genoma viral de aproximadamente 11 kb codifica uma poliproteína que é clivada, durante e após a tradução, em três proteínas estruturais (capsídeo C, proteína da membrana M, e glicoproteína do envelope E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, e NS5) (Lindenbach e Rice, 2003). Das proteínas virais não-estruturais, as mais extensivamente caracterizadas são a NS3, seu cofator NS2B, e a NS5. A NS3 abriga vários domínios catalíticos, inclusive uma serina protease que requer o NS2B como cofator. NS3 também exibe atividade nucleosídeo-trifosfatase e funções de helicase requeridas para síntese de RNA viral (ARIAS et al., 1993; FALGOUT et al., 1991; LI et al., 1999). A proteína NS5 age como RNA polimerase viral RNA-dependente, além de servir como metiltransferase (NOMAGUCHI et al., 2003; TAN et al., 1996; EGLOFF et al., 2002). A RNA-polimerase viral RNA-dependente notoriamente possui uma baixa fidelidade (DOMINGO e HOLLAND, 1997).

Os vírus de RNA mostram uma variabilidade genética significativa devido à alta taxa intrínseca de mutação associada com sua RNA polimerase RNA-dependente (DRAKE e HOLLAND, 1999), às suas rápidas taxas de replicação e ao seu imenso tamanho populacional (HOLMES e TWIDDY, 2003).

Neste estudo, buscou-se a relação entre a taxa de polimorfismo genômico e o sorotipo de vírus da Dengue. O maior polimorfismo foi encontrado no genoma do sorotipo DENV-2.

Materiais e métodos

Um total de 3.278 seqüências do vírus da dengue foram extraídas do banco de dados público EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), sendo 953 de DENV-1, 1.077 de DENV-2, 1.167 de DENV-3 e 531 de DENV-4. O sistema SRS LION (*Sequence Retrieval System*, Release 7.1.3.2) foi utilizado para a obtenção das seqüências a partir do banco de dados EMBL no EBI (*European Bioinformatics Institute*, <http://srs.ebi.ac.uk/>).

O processamento local de arquivos e seqüências foi realizado com *scripts* em linguagem Perl. As seqüências foram tratadas para cada sorotipo separadamente. Primeiro, foram eliminadas as seqüências reconhecidas como parte de seqüências maiores, restando apenas as maiores seqüências não redundantes. Posteriormente, as seqüências de cada sorotipo foram alinhadas uma a uma globalmente com o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>), usando uma seqüência genômica completa do sorotipo correspondente como referência. As seqüências de referência para cada um dos 4 sorotipos foram escolhidas na base de dados do NCBI (*National*

Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A consistência dos alinhamentos foi verificada através de inspeção visual com uso do programa Seaview (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>).

Resultados e discussão

Das 3.278 seqüências do vírus da Dengue disponíveis inicialmente, 409 (~12.5%) foram eliminadas por serem redundantes, restando 757 seqüências de DENV-1, 848 seqüências de DENV-2, 866 seqüências de DENV-3 e 398 seqüências de DENV-4. Portanto, o tamanho das amostras é suficientemente representativo, garantindo significância estatística nas análises de polimorfismo.

Na Figura 1 são apresentadas as curvas de variação do polimorfismo ao longo da seqüência do genoma para os 4 sorotipos de DENV. Observa-se que os sorotipos 1 e 3 apresentam perfis de polimorfismo muito próximos, mas que diferem substancialmente dos perfis dos sorotipos 2 e 4, que por sua vez diferem muito entre si. A Densidade Média de Substituição Nucleotídica do DENV-2 foi significativamente maior que a dos outros sorotipos, sendo 44,21% maior que a taxa de DENV-1, 85% maior que a de DENV-3 e 163,31% maior que a de DENV-4. Pôde-se constatar também uma quantidade de seqüências 5 vezes maior nos alinhamentos que correspondem à região que codifica a proteína E do envelope viral (dados não mostrados).

No presente estudo, investigamos a região referente ao domínio da RNA polimerase, contida no gene da proteína NS5 (ACKERMANN e PADMANABHAN, 2001; NOMAGUCHI et al., 2003; TAN et al., 1996; EGLOFF et al., 2002). Em relação às diferenças locais verificadas nesse intervalo, pôde-se observar dois padrões de comportamento: o primeiro é compartilhado entre o DENV-1 e o DENV-3 e o segundo é comum aos sorotipos 2 e 4, embora o DENV-2 possua um grau de substituição nucleotídica significativamente maior do que os outros sorotipos. Alterações na polimerase poderiam promover aumento da taxa de mutação e explicar a maior taxa de polimorfismo observada em DENV-2. Tal hipótese está sendo atualmente investigada por modelagem molecular ao nível protéico. Além disto, como a maior variabilidade entre os tipos está associada à maior taxa de mutação observada, é possível pensar que, em um contexto seletivo, maior mutabilidade possa ser relacionada com maior virulência e adaptabilidade.

A virulência viral, juntamente com a susceptibilidade do hospedeiro e fatores ambientais, está entre os fatores associados à patogenicidade da dengue. Dentre estes, a virulência figura como um fator fortemente dependente de codificação pelo genoma do vírus. Dada a existência de quatro sorotipos do vírus da dengue com a mesma estrutura genômica, resulta admissível supor que as diferenças de patogenicidade tenham uma causa

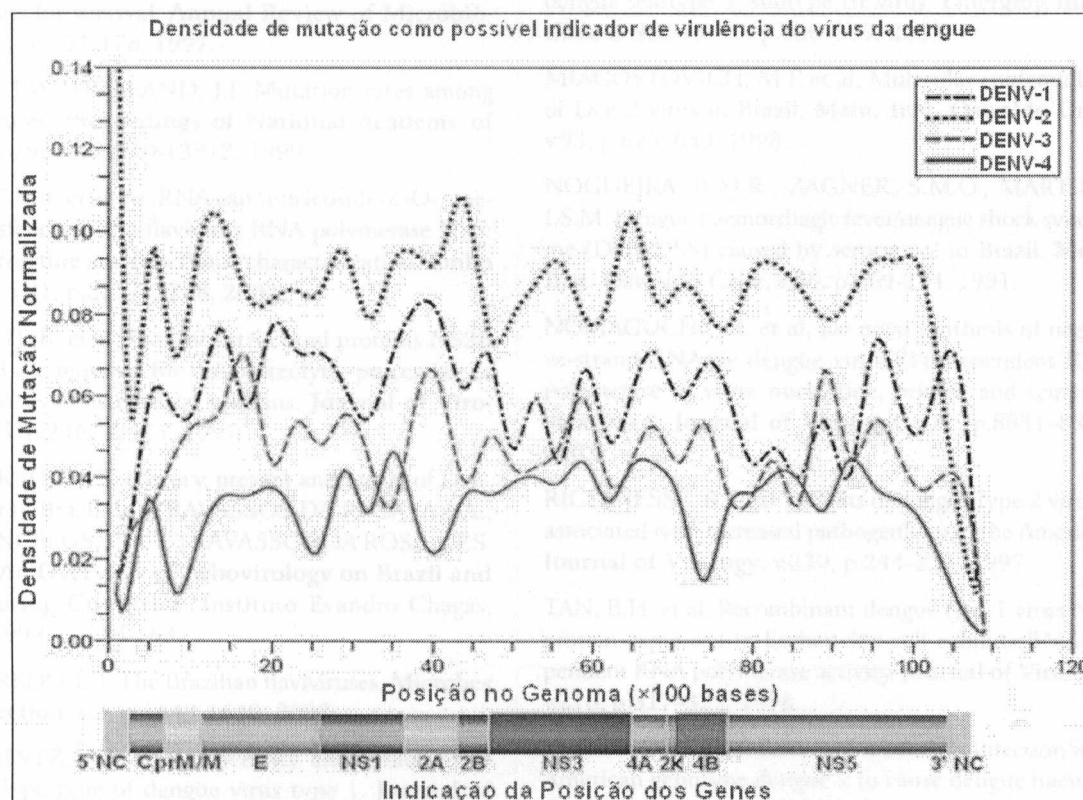


Figura 1 – Densidades de substituição nucleotídica ao longo da seqüência genômica para cada sorotipo de Dengue. O genoma foi dividido em intervalos de 100 bases para o cômputo da densidade. As curvas foram suavizadas com *spline* (programa Scilab 4.1.1).

funcional com origem provavelmente na seqüência. Os estudos de polimorfismo ajudam a identificar regiões do genoma viral que poderiam estar relacionadas com sua virulência.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), através da concessão de bolsas de estudo para N. Carels e R.F. Santos de Araújo. Agradecemos ao Eduardo Costa pelo gerenciamento da rede de computadores do NBCGIB.

Referências bibliográficas

ACKERMANN, M.; PADMANABHAN, R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.39926-39937, 2001.

ARIAS, C.F.; PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J.H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Journal of Virology*, v.193, p.888-899, 1993.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology*, v.80, p.11418-11431, 2006.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology*, v.51, p.151-178, 1997.

DRAKE, J.W.; HOLLAND, J.J. Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of National Academy of Science*, v.96, p.13910-13913, 1999.

EGLOFF, M.P. et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *Embo Journal*, v.21, p.2757-2768, 2002.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of Virology*, v.65, p.2467-2475, 1991.

FIGUEIREDO, L.T. History, present and future of Dengue fever in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. (Orgs.). *An Overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries*. Instituto Evandro Chagas, Belem. 1998. p. 154-163.

FIGUEIREDO, L.T. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection*, v.2, p.1643-1649, 2002.

GONCALVES, A.P. et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Journal of Virology*, v.303, p.110-119, 2002.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. (Orgs.) *Dengue and Dengue Hemorrhagic fever*. Londres: CAB International, 1997. p. 1-22.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p.480-496, 1998.

GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*, v.10, p.100-103, 2002.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. *Lancet*, v.2, p.33-42, 2002.

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

LI, H. et al. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *Journal of Virology*, v.73, p.3108-3116, 1999.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, v.59, p.23-61, 2003.

MESSER, W.B. et al. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, p.800-809, 2003.


MIAGOSTOVICH, M.P. et al. Molecular epidemiology of Den-2 virus in Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.93, p.625-630, 1998.

NOGUEIRA, R.M.R.; ZAGNER, S.M.O.; MARTINS, I.S.M. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p.269-274, 1991.

NOMAGUCHI, M. et al. De novo synthesis of negative-strand RNA by dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. *Journal of Virology*, v.77, p.8831-8842, 2003.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Journal of Virology*, v.230, p.244-251, 1997.

TAN, B.H. et al. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Journal of Virology*, v.216, p.317-325, 1996.

WATTS, D.M. et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, v.354, p.1431-1434, 1999. 

Sobre os autores

Roberto Fabian Santos de Araújo

É bacharel em Biomedicina graduado pela Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC (Bahia) e já trabalhou com bioquímica de proteínas e atividade enzimática. Também foi bolsista de Iniciação Científica (IC) pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB - trabalhando em bioinformática da dengue inicialmente no Laboratório de Bioinformática da UESC - LABBI - e posteriormente no Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas – NBCGIB.

Nicolas Carels

É graduado em Ciências Agrônômicas pela Faculdade de Ciências Agrônômicas de Gembloux (Bélgica). Possui Doutorado em Fitopatologia da mesma Faculdade e Doutorado em Genética da Universidade Pierre e Marie Curie (Paris, França). Na Europa, pesquisou sobre a organização do genoma e a distribuição dos genes nas plantas e mamíferos sucessivamente no Instituto Jacques Monod (Paris, França), na Stazione Zoologica 'Anton Dohrn' (Napoles, Italia) e no Centro de Astrobiología do Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (Madrid, Espanha). No Brasil (Universidade Estadual de Santa Cruz - Bahia), participou junto com Diego Frías (co-autor), à determinação automática da função codante no DNA. Esta pesquisa foi aplicada à localização automática dos genes no genoma do fungo agente da doença "vassoura de bruxa" do cacauzeiro.