

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EPIDEMIA DE DENGUE EM FEIRA DE SANTANA EM 2019: ASPECTOS
EPIDEMIOLOGICOS E MOLECULARES**

ÍTALO ANDRADE BARBOSA LIMA

Salvador – BA

2023

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**EPIDEMIA DE DENGUE EM FEIRA DE SANTANA EM 2019: ASPECTOS
EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES**

ÍTALO ANDRADE BARBOSA LIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Isadora Cristina de Siqueira

Coorientador: Dr. Tiago Graf

Salvador – BA

2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

L732a Lima, Ítalo Andrade Barbosa

Epidemia de dengue em Feira de Santana em 2019: aspectos epidemiológicos e moleculares/ Ítalo Andrade Barbosa Lima. – Salvador, 2023.

66 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Dra. Isadora Cristina de Siqueira
Coorientador: Dr. Tiago Graf

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

1. DENV. 2. Sorologia. 3. Biologia molecular. 4. Sequenciamento. 5. Epidemiologia. I. Título.

CDU 616.91

“EPIDEMIA DE DENGUE EM FEIRA DE SANTANA EM 2019: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES”.

ÍTALO ANDRADE BARBOSA LIMA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 18 de maio de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

 Documento assinado digitalmente
JAQUELINE GOES DE JESUS
Data: 19/05/2023 11:16:25-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Jaqueline Goes de Jesus
Professor Adjunto e Pesquisador Científico
EBMSP

 Documento assinado digitalmente
PATRICIA CARVALHO DE SEQUEIRA
Data: 19/05/2023 13:05:06-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Patrícia Carvalho de Sequeira
Pesquisador em Saúde Pública
IOC-FIOCRUZ

 Documento assinado digitalmente
LUCIANO KALABRIC SILVA
Data: 19/05/2023 02:32:33-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Luciano Kalabric
Pesquisador
IGM-FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por ter me fornecido a bolsa de mestrado para que eu pudesse realizar esse trabalho;

À coredeação Geral de Laboratórios (CGLAB) e ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos por ter fornecido os insumos para realização da biologia molecular do estudo;

Ao Dr. Luiz Alcântara permitir que participasse de um braço dos projetos dele e pelo auxílio com o sequenciamento genômico;

Ao Curso de Pós-Graduação de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (PGBSMI) ao qual me proporcionou a oportunidade de concluir o mestrado;

A Vigilância Epidemiológica de Feira de Santana por fornecer o material biológico, assim como, as fichas dos participantes do estudo;

Ao Laboratório de patologia Experimental (LAPEX) onde pude realizar meu trabalho tanto de bancada como de pesquisa;

A minha orientadora Isadora Cristina de Siqueira e meu coorientador Tiago Gräf por estarem ao meu lado nessa trajetória;

E aos colegas de laboratório que me auxiliaram durante a realização do estudo.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

LIMA, Ítalo Andrade Barbosa. **Epidemia de dengue em Feira de Santana em 2019**: aspectos epidemiológicos e moleculares. 2023. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023

RESUMO

A dengue é uma doença de grande importância nas Américas, sendo endêmico por décadas e tendo já apresentado quatro sorotipos no país. Sua disseminação por mosquitos vetores torna difícil seu controle. O município de Feira de Santana, localizado no estado da Bahia, apresenta um número significativo de casos todos os anos, não somente para dengue como também para outras arboviroses, demonstrando ser uma região endêmica. Dessa forma, se faz importante realizar uma vigilância periódica da doença, utilizando os diagnósticos sorológico e molecular. Esse estudo objetivou descrever a epidemia de dengue ocorrida no ano de 2019 no município de Feira de Santana. Foram coletadas amostras biológicas de pacientes de Feira de Santana e enviadas à Fiocruz-BA para diagnóstico. Nos testes sorológicos foram realizados a detecção do anticorpo IgM e do antígeno NS1. Nos testes moleculares a procura foi pela presença do RNA do vírus da dengue. Foram incluídos 977 participantes nesse estudo, todas as amostras foram testadas por métodos sorológicos, tanto utilizando o anticorpo IgM, sendo 253 (25,90%) positivas para dengue, ou o antígeno NS1 sendo 392 (40,12%) positivas. Para o diagnóstico molecular 873 amostras foram testadas, sendo detectado a presença de DENV em 102 (11,68%). Para o sequenciamento foram escolhidas 19 amostras, nelas foi encontrado a presença do DENV-1 genótipo V e DENV-2 genótipo III mostrando persistência do vírus na região, assim como, a introdução de um novo clado. Também foram descobertas mutações em alguns genes de proteínas estruturais e não estruturais. Assim, mostrando a importância da vigilância epidemiológica e genômica para investigação de epidemias ou surtos, auxiliando os órgãos de saúde a tomarem medidas para resolução dos atuais e futuros problemas de saúde pública.

Palavras-chave: DENV. Sorologia. Biologia molecular. Sequenciamento. Epidemiologia.

LIMA, Ítalo Andrade Barbosa. **Dengue epidemic in Feira de Santana in 2019: epidemiological and molecular aspects**. 2023. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023

ABSTRACT

Dengue is a disease of great importance in the Americas, being endemic for decades and having already presented four serotypes in the country. Its spread by vector mosquitoes makes its control difficult. The municipality of Feira de Santana, located in the state of Bahia, has a significant number of cases every year, not only for dengue but also for other arboviruses, demonstrating that it is an endemic region. Thus, it is important to carry out periodic surveillance of the disease, using serological and molecular diagnoses. This study aimed to describe the dengue epidemic that occurred in 2019 in the municipality of Feira de Santana. Biological samples were collected from patients in Feira de Santana and sent to Fiocruz-BA for diagnosis. In the serological tests, the detection of the IgM antibody and the NS1 antigen were performed. In molecular tests, the search was for the presence of RNA from the dengue virus. 977 participants were included in this study, all samples were tested by serological methods, either using the IgM antibody, with 253 (25.90%) positive for dengue, or the NS1 antigen, with 392 (40.12%) positive. For the molecular diagnosis 873 samples were tested, being detected the presence of DENV in 102 (11.68%). For sequencing, 19 samples were chosen, in which the presence of DENV-1 genotype V and DENV-2 genotype III was found, showing persistence of the virus in the region, as well as the introduction of a new clade. Mutations have also been discovered in some structural and non-structural protein genes. Thus, showing the importance of epidemiological and genomic surveillance for the investigation of epidemics or outbreaks, helping health agencies to take measures to solve current and future public health problems.

Keywords: DENV. Serology. Molecular biology. Sequencing. Epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura proteica do DENV.	16
Figura 2	Ciclos de transmissão da dengue.	18
Figura 3	Vetores <i>Ae. aegypt</i> (à esquerda) e <i>Ae. albopictus</i> (à direita).	19
Figura 4	Nova classificação dos níveis de gravidade da dengue.	21
Figura 5	Gráfico de hospitalizações por dengue no Brasil ocorridas de 1986 a 2014.	26
Figura 6	Questões decorrentes da infecção por dengue.	29
Figura 7	Esquema relatando o número de participantes do estudo.	38
Figura 8	Distribuição temporal, mês a mês, dos primeiros sintomas de dengue em 977 participantes de Feira de Santana no ano de 2019.	39
Figura 9	Mapa demonstrando os municípios de residência dos participantes do estudo.	41
Figura 10	Presença dos sintomas clínicos de 977 pacientes notificados como Dengue, Feira de Santana, 2019.	42
Figura 11	Classificação clínica de 232 pacientes do estudo de dengue, Feira de Santana, 2019.	43
Figura 12	Árvore filogenética de máxima verossimilhança de sequências de DENV-1, genótipo V. Sequências do Brasil estão destacadas em azul e de Feira de Santana, geradas neste estudo, em vermelho. O suporte (bootstrap) dos clados de interesse é informado.	46
Figura 13	Árvore filogenética de máxima verossimilhança de sequências de DENV-2, genótipo III. Sequências do Brasil estão destacadas em azul e, em vermelho, estão as sequências de Feira de Santana, geradas neste estudo. O suporte (bootstrap) dos clados de interesse é informado.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela das hospitalizações por dengue no Brasil de 2002 a 2014.	27
Tabela 2	Tabela das hospitalizações por dengue no Brasil de 2014 a 2019.	28
Tabela 3	Informações Sociodemográficas dos 977 participantes, Feira de Santana, Bahia - Brasil, 2019.	40
Tabela 4	Resultados do diagnóstico molecular para dengue, zika e chikungunya de 873 amostras, Feira de Santana 2019.	44
Tabela 5	Dados epidemiológicos das 19 amostras de DENV 1-2 sequenciadas como parte deste estudo.	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	DENGUE VÍRUS	15
2.1.1	Impacto Mundial	17
2.1.2	Transmissão	17
2.1.3	Manifestações clínicas	20
2.1.4	Resposta Imune	21
2.2	EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE NAS AMÉRICAS	22
2.2.1	Introdução da Dengue nas Américas 22	22
2.2.2	Plano Continental de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>	23
2.2.3	Reinfestação do <i>Aedes aegypti</i>	23
2.2.3	Maior Dispersão de <i>Aedes aegypti</i> e Circulação do Vírus da Dengue	24
2.3	EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE NO BRASIL	24
2.3.1	Hospitalizações	25
2.4	DIAGNÓSTICO	28
2.5	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE DENV NO BRASIL	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	34
4.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	34
4.3	COLETA E GERENCIAMENTO DE DADOS	34
4.4	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	34
4.5	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	35
4.6	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	35
4.7	SEQUENCIAMENTO	36
4.8	ANÁLISES FILOGENÉTICAS	36
5	RESULTADOS	38
5.1	ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	38
5.2	DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL	38

5.3	ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS	39
5.4	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	41
5.5	DIAGNÓSTICO PARA DENGUE	43
5.5.1	Sorologias	43
5.5.2	Biologia molecular	44
5.5.3	Interseção dos testes diagnósticos	44
5.5.4	Sequenciamento e análises filogenéticas	44
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE	64
	ANEXO	65

1 INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

A dengue é uma doença viral transmitida por artrópodes, tendo o *Aedes aegypti* como o de maior importância nas américas, sendo ocasionada pelo vírus da dengue (DENV) que compreende quatro sorotipos diferentes, são eles DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 (DENV1-4) (GUZMAN; HARRIS, 2014). O *Aedes aegypti* costuma se alimentar de néctar, porém, os mosquitos fêmeas passam a consumir sangue de animais vertebrados quando necessitam amadurecer seus ovos, fazendo dela a responsável pela transmissão do DENV. Para que consiga infectar os hospedeiros, o mosquito se contamina através da alimentação do sangue de algum vertebrado que já possua cópias virais suficientes do DENV. O vírus adentra o sistema do vetor até chegar no intestino médio, onde possuem células com receptores que reconhecem as cópias virais, dessa forma conseguem penetrar e começar a replicação. O DENV então passa para a hemocele onde consegue acesso aos demais órgãos do vetor. A partir disso as cópias infectantes também se apresentam nas glândulas salivares do mosquito tornando-o capaz de infectar os demais vertebrados assim que for se alimentar novamente (CHOUIN-CARNEIRO; SANTOS, 2017). O vírus da dengue apresenta ácido ribonucleico (RNA) de fita simples com polaridade positiva, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

A principal forma de transmissão da dengue ocorre através das interações entre artrópodes, pessoas e vírus (GUZMAN; HARRIS, 2014). No entanto, também pode ocorrer através da transmissão vertical onde os pais acabam transmitindo para seus filhos. Embora mais rara é um importante forma de manutenção do vírus no hospedeiro e não deve ser subestimada pois através dessa forma o DENV consegue se manter presente mesmo que haja épocas com pouca quantidade de vetores (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016).

Alguns dos sintomas da dengue são febre alta súbita, cefaleia, artralgia, eritema, mialgia e dor retro-orbital. Pacientes com dengue podem se encaixar em três níveis de gravidade, dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG) (WHO, 2009).

Os diferentes sorotipos DENV1-4 foram isolados de humanos em localidades e anos diferentes, sendo as cepas DENV-1 e DENV-2 no ano de 1944, no Havaí e na Nova Guiné, respectivamente, enquanto as cepas DENV-3 e DENV-4 nas Filipinas em 1957 (GOULD; SOLOMON, 2008). No Brasil houve as introduções dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 nos anos de 1981, 1990 e 2000, respectivamente, o primeiro sendo isolado no estado de Roraima onde pode ter se espalhado para outros estados incluindo o Rio de Janeiro onde

ocorreram os isolamento das cepas DENV-2 e DENV-3 (SIQUEIRA et al, 2005; NOGUEIRA et al, 2001; TEIXEIRA et al, 2005). O sorotipo DENV-4 foi introduzido no Brasil em 1982 no município de Boa Vista, posteriormente reintroduzido no ano de 2010 nas cidades Boa Vista e Canta localizadas no estado de Roraima (TEMPORÃO et al, 2011).

A dengue é um problema de saúde pública no Brasil desde 1986, ocorrendo epidemias anualmente desde então (NOGUEIRA et al, 2001). O município de Feira de Santana apresenta um histórico de epidemias por arboviroses, já tendo ocorrido surtos de Zika, Dengue e Chikungunya em anos anteriores (CERQUEIRA et al, 2003; MALTA et al, 2017).

Com os diversos surtos por arboviroses ocorridos em Feira de Santana, mostrando que essa é uma região favorável para disseminação de arboviroses, devido ao seu clima ou por conta de fatores humanos como a urbanização, estudos epidemiológicos com foco molecular são importantes. Através do sequenciamento do genoma viral e de análises evolutivas podemos estudar a persistência de cepas já existentes ou introdução de novas cepas e assim delinear estratégias para lidar com as prováveis emergências de novos surtos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DENGUE VÍRUS

O DENV é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e apresenta RNA de fita simples sentido positivo. Esse ácido nucleico é traduzido em três proteínas estruturais (capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E)) e sete não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 1) (OHAINLE et al, 2011; VASILAKIS; WEAVER, 2008).

Cada uma dessas proteínas virais possui um papel importante, desde a fixação e entrada do vírus nas células do hospedeiro, até suas funções de replicação e evasão. A proteína do envelope é a responsável pela formatação externa do vírus, reconhecimento dos receptores presentes nas células alvo, assim como sua adesão e liberação do RNA viral ao citosol dessas mesmas células (CAMPOS et al, 2017; MODIS et al, 2004).

A prM está envolvida com o processo de maturação do vírus antes da sua introdução e adesão do vírus maduro à célula hospedeira (YU, I et al, 2009; YU, I. et al, 2008; ZHANG et al, 2012). A proteína C é essencial para o desenvolvimento do nucleocapsídeo, envolvido no empacotamento do RNA viral (IVANYI-NAGY et al, 2008; SAMSA et al, 2009).

A proteína NS1 desempenha uma função muito importante dificultando a neutralização do DENV pelos anticorpos do sistema imunológico, além disso pode ser envolvida na replicação do vírus. Essa proteína pode ser encontrada tanto na superfície da célula ou mesmo em meio extracelular (FLAMAND et al, 1999; GUTSCHE et al, 2011). Como ela também está presente no plasma, pode ser utilizada como forma de diagnóstico no início da infecção (DATTA; WATTAL, 2010; FAUZIAH MD KASSIM et al, 2011).

A proteína NS2a possui diversas funções distintas, está envolvida na replicação viral, montagem do vírus, patogênese e em formas de evadir o sistema imunológico do hospedeiro. (BHARGAVI et al., 2018). Já a proteína NS2b consegue inibir a síntese de interferon do tipo I (IFN- α) pelo hospedeiro e assim, evadir uma provável resposta do sistema imune, porém seu papel principal é como cofator da proteólise de proteínas virais (AGUIRRE et al, 2017; FALGOUT et al, 1991).

Além de possuir o sítio de ligação ssRNA, a proteína NS3 atua de várias formas, podendo operar como uma protease, ATPase, RTPase ou RNA helicase nas diversas etapas da replicação e splicing viral. (LUO et al, 2008; SINGLETON; WIGLEY, 2002; SWARBRICK

et al, 2017; TEO; CHU, 2014; XU et al, 2005). As proteínas NS4a e NS4b participam do complexo de replicação do DENV (ZOU et al, 2015).

A proteína NS5 funciona realizando as catalises necessárias para a replicação do genoma do vírus, em concordância com NS3, essas reações são otimizadas. Uma dessas reações é pré-requisito para o capeamento da extremidade 5' do RNA (LIU et al, 2010). A extremidade Cap-5' possui um papel de garantir RNA viral não seja danificado, sendo mais uma forma de evasão do sistema imune (CHANG et al, 2016). NS5 também é responsável pela estimulação das NTPases e RTPases já que trabalha junto com a proteína NS3 (YON et al, 2005). NS5 pode ser encontrado no núcleo da célula do hospedeiro onde se utiliza dos recursos necessários para realizar o splicing (MAIO et al, 2016).

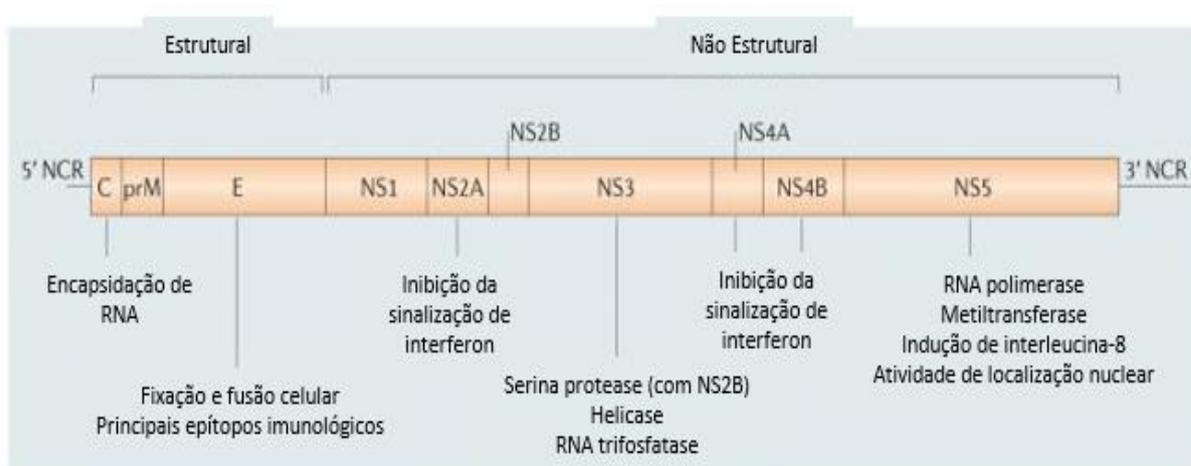


Figura 1 - Estrutura proteica do DENV.

Fonte: (Adaptado de VASILAKIS et al, 2011)

O DENV possui quatro sorotipos conhecidos atualmente, todos isolados a partir de amostras de seres humanos. Os sorotipos são cepas virais que se diferenciam quanto à forma da resposta imunológica gerada pelo hospedeiro, ou seja, eles são tão diferentes entre si que o sistema imune produz anticorpos específicos para cada sorotipo, apesar de existir reação cruzada entre eles (FERGUSON; ANDERSON; GUPTA, 1999; GOULD; SOLOMON, 2008).

Os sorotipos surgiram a partir da evolução independente e separada de diferentes linhagens do DENV, provavelmente a partir de cepas silváticas circulando em primatas não humanos (WEAVER; VASILAKIS, 2009). Devido a alta taxa mutacional do vírus, causada pela falta de função de correção de erros da enzima de replicação do RNA (RpRd), essas mutações foram sendo acumuladas ao longo de milhares de anos (HOLMES; TWIDDY, 2003).

2.1.1 Impacto mundial

O surgimento da dengue é estimado em aproximadamente 1000 anos atrás, correspondendo aos primeiros relatos de doenças com sintomas semelhantes aos que a dengue apresenta hoje. Muito provavelmente a dengue possuía apenas um ciclo silvático envolvendo macacos dos continentes africano e asiático, estudos sugerem que a dengue pode ter sido originada na África devido a dois fatores principais, a vários outros flavivírus terem nascido lá e a provável origem do *Aedes aegypti* ter sido nesse continente. Outros estudos revelam que há uma presença de quatro sorotipo da dengue tanto em humanos quanto macaco em regiões da Ásia e por conta dessa provável ligação é sugerido que o vírus possa ter vindo desse continente (HOLMES; TWIDDY, 2003). A cada 10 anos, no número médio anual de casos notificados de DENV no mundo aumenta. De 1990 a 1999 esse número foi de 479.848 casos, em contrapartida, de 2000 a 2008 foi de 1.656.870 casos. No ano de 2008, 69 países do Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental e das Américas registraram atividade da dengue (WHO, 2011).

Do total da população global que corre risco de adquirir dengue, 1,8 bilhão vive nas regiões Sudeste Asiática e Pacífico Ocidental, correspondendo a quase 75% dos casos que ocorrem no mundo (WHO, 2009).

Nas Américas após os anos 70, as campanhas de vigilância e controle de vetores não foram mantidas como em anos anteriores ocasionando em reintrodução de mosquitos nas regiões e posteriormente diversos surtos. Com essa ausência no controle, a doença se espalhou cada vez mais no continente se tornando endêmica em vários países. Atualmente os quatro sorotipos do DENV (DENV 1-4) circulam no continente (WHO, 2009).

2.1.2 Transmissão

A transmissão do DENV ocorre principalmente através de dois ciclos, um silvático e outro urbano. No ciclo silvático os vetores infectados interagem com outros animais tornando-os animais reservatórios. Posteriormente os mosquitos não infectados se alimentam do sangue desses animais e adquirem o vírus se tornando infectados. Outro participante desse ciclo são os humanos, os vetores infectados, ao picar um indivíduo saudável, infectam-no, esse indivíduo agora pode acabar se deslocando para outros lugares e dessa forma espalhar localmente a doença através de mosquitos não infectados desse novo local. Por vezes, indivíduos infectados viajam para centro urbanos onde outros mosquitos não infectados interagem com o infectado

adquirindo o vírus e transmitindo a outras pessoas, resultando no ciclo urbano (Figura 2) (VASILAKIS et al, 2011).

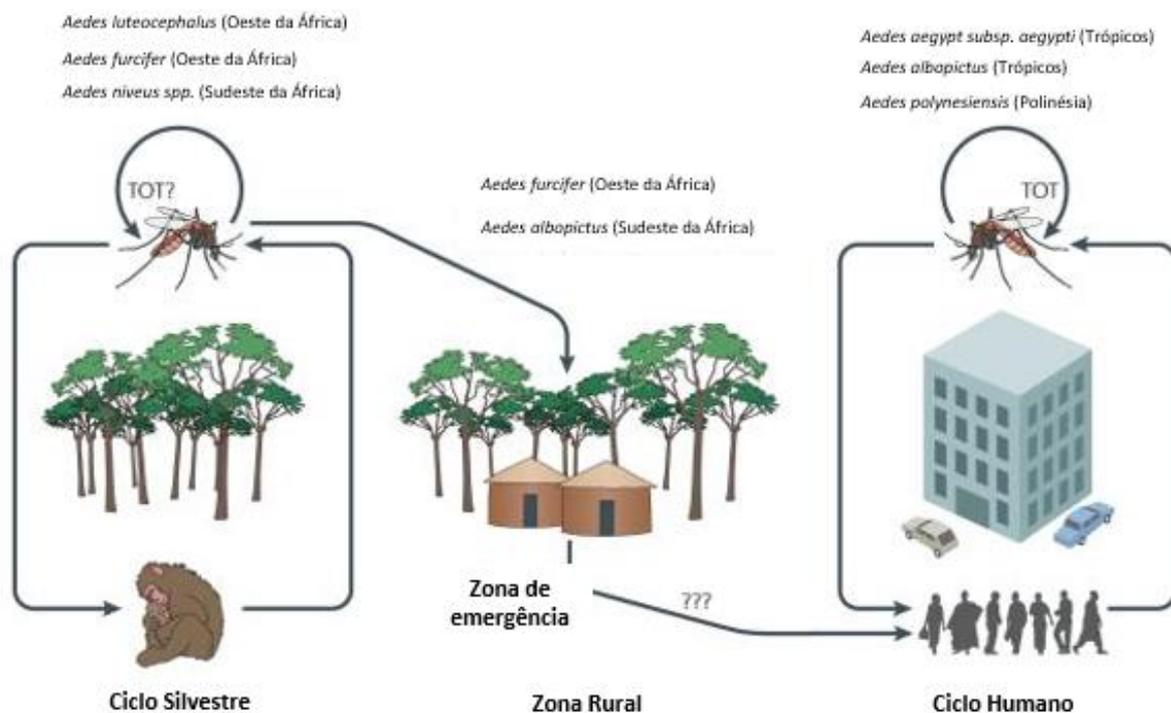


Figura 2 - Ciclos de transmissão da dengue.
Fonte: (Adaptado de VASILAKIS et al, 2011)

A principal espécie responsável pela transmissão nas américas o *Aedes aegypti* (GUZMAN; HARRIS, 2014). Porém outros vetores também são capazes de disseminar o vírus, *Aedes albopictus* presente também nas Américas além da Europa, África e ilhas do Pacífico, *Aedes scutellaris* localizado nas ilhas ao leste da Indonésia e *Aedes katherinensis* ao norte da Austrália (Figura 3) (FENG; VELASCO-HERNÁNDEZ, 1997).

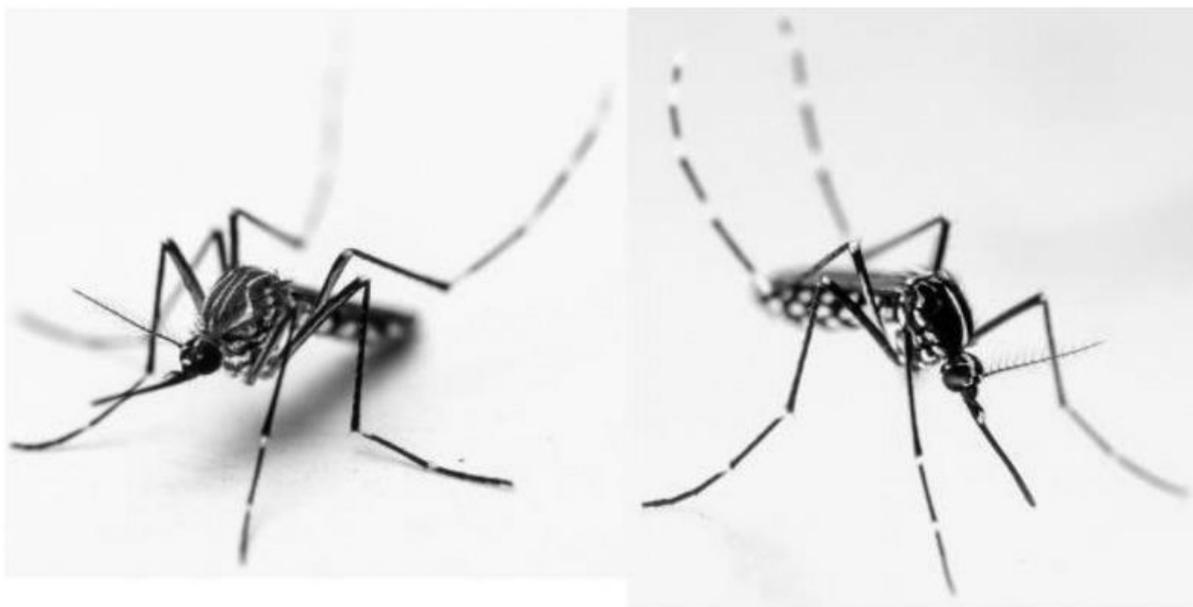


Figura 3 - Vetores *Ae. aegypti* (à esquerda) e *Ae. albopictus* (à direita).

Fonte: (LWANDE et al., 2020)

O *Aedes aegypti* não apresenta uma característica de se distanciar mais que 100 metros de onde vivem, quando há presença de humanos, então as pessoas possuem um papel importante para a disseminação da doença para locais mais distantes. Os indivíduos infectados vão a outros locais onde pode-se haver vetores ainda não infectados e a partir da interação entre eles, o mosquito agora consegue espalhar a doença naquela região (STODDARD et al, 2013).

Fatores ambientais também podem colaborar para o aumento de casos de infecções por DENV. Ambientes urbanos onde há grande número de pessoas e moradias muito próximas umas das outras favorecem o ciclo de reprodução do vírus (STODDARD et al, 2013; YOON et al, 2012). Além disso, fatores climáticos como alta taxa de precipitação, umidade e temperatura elevada colaboram diretamente para a reprodução do *Aedes aegypti* (HALES et al, 2002; GLASSER; GOMES, 2002).

Com tudo, também existem outras formas de contágio que não seja por picada do vetor infectado, a exemplo a transfusão sanguínea (LANTERI; BUSCH, 2012). Há também a transmissão vertical, acontece quando grávidas adquirem o vírus e transmite para o bebe por via transplacentária, ocorre mesmo que a gestante não desenvolva sintomas. O diagnóstico é realizado com a detecção de anticorpos IgM já que não atravessam a placenta (PERRET et al, 2005).

2.1.3 Manifestações clínicas

Entre os sintomas causados pela dengue estão febre, cefaleia, náuseas, vômitos, dor abdominal, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, eritema, manchas pelo corpo podendo ser petequiais ou semelhante a placas (GONZÁLEZ et al, 2005; WHO, 2009).

Manifestações neurológicas podem acometer pacientes infectados, principalmente quando o paciente apresenta um quadro hemorrágico (GULATI; MAHESHWARI, 2007). Dentre essas manifestações estão meningite, encefalopatias e encefalites. As encefalopatias são as mais comuns dentre as três, podem ser causadas por edema cerebral, hemorragias cerebrais ou sistêmicas, insuficiência renal ou hepática, choque prolongado, entre outros. (CAROD-ARTAL et al, 2013; SOLOMON et al, 2000).

A síndrome de Guillain-Barré também pode surgir como uma rara consequência da infecção por DENV, essa síndrome acomete os neurônios do sistema nervoso periférico através de uma reação inflamatória autoimune que aos poucos os desmieliniza, dentre os sintomas decorrentes podem surgir arreflexia, paralisia motora, parestesia distal e disestesias (QURESHI et al, 2012; MALTA et al, 2017).

Em uma antiga classificação dos níveis de gravidade da dengue podia-se ordenar em dengue clássica ou febre da dengue e dengue hemorrágica (DH) ou síndrome da dengue (SCD). A clássica é caracterizada por febre aguda concomitante a cefaleia, dores retro-orbitais, musculares e nas articulações, entre outros sintomas mais brandos (CASALI et al, 2004). A dengue hemorrágica apresenta, além dos sintomas presentes na clássica, febre ainda mais alta, hepatoesplenomegalia, hemorragia advinda de extravasamento capilar ou das mucosas. A SCD poderia vir como uma consequência da DH e apresentava alguns sinais e sintomas a mais como insuficiência circulatória, pele fria, hipotensão, ascite e derrame pleural (LIBRATY et al, 2002; SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007).

A partir de 2009 a Organização Mundial da Saúde (OMS) fez alterações nessas classificações que passaram a ter três níveis de gravidade. Dengue sem sinais de alarme (DSSA) sendo bem semelhante a antiga dengue clássica. Dengue com sinais de alarme (DCSA) apresentando alguns sintomas como dor no abdômen de forma contínua e intensas, náuseas, êmese, letargia ou inquietação, sangramento por mucosas, além de alguns sinais como acúmulo de líquidos, aumento do hematócrito e diminuição das plaquetas. E dengue grave (DG) onde nessa fase o paciente pode apresentar insuficiência respiratória, hemorragia importante por perda de plasma, podendo levar a choque hipovolêmico (Figura 4) (VERDEAL et al, 2011; WHO, 2009).

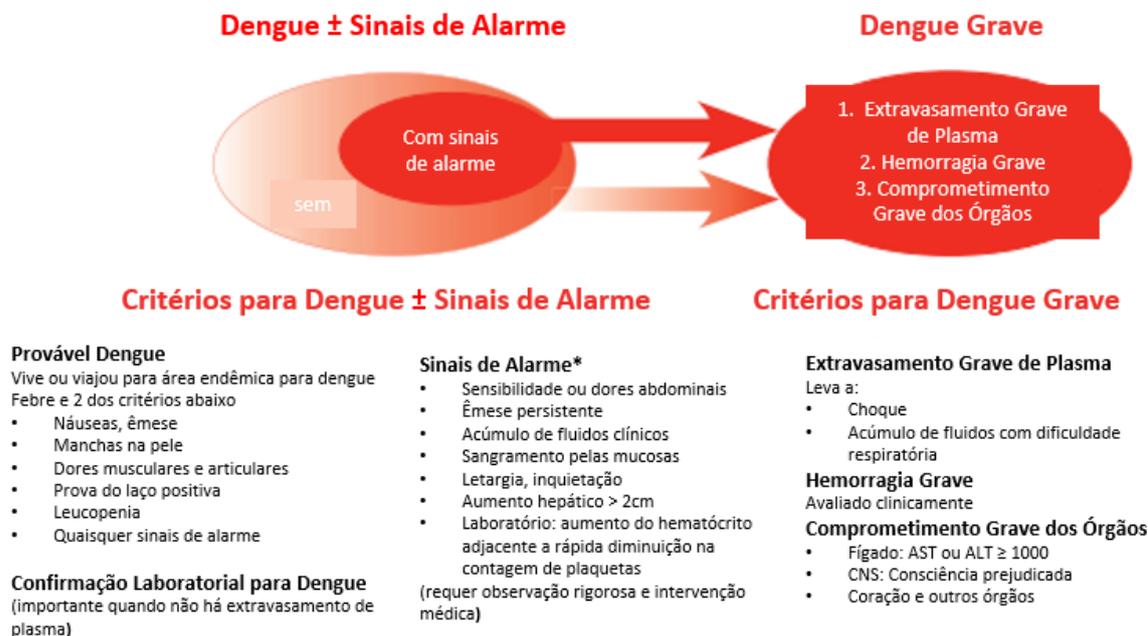


Figura 4 - Nova classificação dos níveis de gravidade da dengue.

Fonte: (Adaptado de WHO, 2009)

2.1.4 Resposta imune

Para iniciar o processo de resposta imune contra o vírus da dengue, primeiramente esse vírus precisa adentrar algum tipo celular como macrófagos, monócitos, células dendríticas, linfócitos B ou células endoteliais. Essa resposta pode ser dada de algumas formas distintas através da resposta imune inata e adaptativa (LOBO et al, 2014).

Na resposta inata as células infectadas sinalizam para as adjacentes sobre seu estado, para que essas deem início a medidas de precaução como produção de Interferon (INF) α e β . O INF pode ser secretado para o meio extracelular, servindo de sinalização sobre a invasão e utilizado dentro das próprias células quando as ainda saudáveis forem infectadas, impedindo o máximo possível que o vírus se replique (SILVA; GIL; OLIVEIRA, 2013). As células dendríticas, responsáveis por grande parte da produção de INF- α , também produzem citocinas e quimocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), Interleucina (IL) 1 e CCL4. A última responsável pelo recrutamento de células Natural Killer (NK) que participam da resposta imune destruindo células infectadas (MCKENNA; BEIGNON; BHARDWAJ, 2005; SILVA; GIL; OLIVEIRA, 2013).

Na resposta adaptativa as células dendríticas apresentam um antígeno do DENV para linfócitos T, a partir desse ponto são iniciadas produções de diversas citocinas como INF- γ ,

TNF- β e IL-2 respeitando o perfil de linfócitos T helper 1 (Th1). Essas citocinas causam resposta pro-inflamatória. Já o perfil Th2 estimula a produção de anticorpos pelos linfócitos B (LOBO et al, 2014).

Quando um paciente já teve um dos sorotipos do DENV e acaba por ser infectado por um sorotipo diferente o sistema imunológico entende que já há anticorpos produzidos para aquele agente e envia para opsonização, pós neutralização o vírus é então fagocitado por um macrófago. Porém por se tratar de um sorotipo distinto, a neutralização não funciona corretamente e a invasão a um tipo celular ideal e bem sucedida pelo vírus, com isso, o DENV continua sua replicação aumentando a viremia cada vez mais. Os macrófagos também liberam mediadores capazes de aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos, nesse cenário onde cada vez mais macrófagos são recrutados para responder ao aumento da viremia, existe um ciclo no recrutamento de cada vez maior de macrófagos tonando essa permeabilidade exacerbada causando, no fim, uma hemorragia (LUPI et al, 2007; LOBO et al, 2014).

2.2 Epidemiologia da dengue nas Américas

É relatado por Dick e colaboradores que o histórico da dengue nas Américas ocorreu em períodos diferentes sendo dividido em quatro fases: Introdução da Dengue nas Américas; Plano Continental de Erradicação do *Aedes aegypti*; Reinfestação do *Aedes aegypti* e Maior Dispersão de *Aedes aegypti* e Circulação do Vírus da Dengue (DICK et al, 2012).

2.2.1 Introdução da Dengue nas Américas

Nos anos de 1635 e 1699 surgiram duas epidemias no Panamá ao qual suspeitou-se que o agente seria o DENV, mas como não há registros de quadros clínicos mais detalhados, não se pôde atribuir a ele. Anos depois, em 1780 nos Estados Unidos, foi descrito um surto que se identificou como sendo de dengue. A partir do século XIX houveram mais casos relacionados, em 1818 no Peru, 1827 no Caribe, em 1828 outras regiões do Golfo do México e com o passar dos anos seguiu para Cuba, Jamaica, Colômbia e Venezuela. Entre 1845 e 1849 houveram novos surtos de dengue nos Estados Unidos e Cuba novamente e no Brasil. Após esse surto novos casos foram identificados novamente nos países já afetados além de novos, o que mostra uma epidemia na América como um todo na época. Muitos desses casos podem ter sido diagnosticados de forma equivocadas devido aos sintomas semelhantes do Chikungunya que, assim como a dengue, pode ter vindo através do tráfico negreiro de escravos (DICK et al, 2012).

2.2.2 Plano continental de erradicação do *Aedes aegypti*

William Gosgas foi o pioneiro na tentativa de erradicar o *Aedes aegypti* em 1907 em Cuba. A iniciativa dele foi reproduzida no Brasil no mesmo ano por Oswaldo Cruz. A técnica empregada era a fumigação de Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) conjuntamente com eliminação dos focos de larvas do mosquito. Anos depois houve uma colaboração da Fundação Rockefeller com o Governo Brasileiro para eliminar o *Aedes aegypti* em vários locais do país. Países vizinhos como Bolívia, Colômbia, Equador, Paraguai e Peru também seguiram a tática, obtendo resultado semelhante. Em 1940, a Conferência Pan-Americana de Saúde tomou medidas de prevenção para controle do mosquito. O DDT foi um sucesso, erradicando o mosquito em grande parte do continente. Dezoito países e diversas ilhas do Caribe erradicaram o mosquito. Alguns países como Cuba, Estados Unidos, Venezuela e em países do Caribe os esforços foram em vão, e anos depois esses países sofreram duas epidemias. A primeira de DENV-3, genótipo V na Jamaica entre 1963 e 1964 que afetou Porto Rico, Pequenas Antilhas e Venezuela. A segunda ocorreu entre 1968 e 1969 que se iniciou também na Jamaica atingindo Porto Rico, Haiti, Pequenas Antilhas e Venezuela dessas vez os sorotipos encontrados foram o DENV-3 e o DENV-2. Entre 1962 e 1972 houveram poucos avanços, somente três países erradicaram e com o passar dos anos o *Aedes aegypti* ganhou força novamente o que levou a próxima fase (DICK et al, 2012).

2.2.3 Reinfestação do *Aedes aegypti*

Com a degradação dos programas de controle do *Aedes aegypti* o mesmo ganhou força e começou a se disseminar novamente transmitindo as várias doenças que era capaz. No começo de 1980, houve um aumento descontrolado do mosquito resultando nas epidemias dos anos seguintes. Em 1981, 344.203 casos foram relatados em Cuba o que resultaram em 158 óbitos, quase dois terços das mortes eram crianças, causados pelo DENV-2, genótipo III. No mesmo ano o DENV-4, genótipo I foi introduzida em parte do Caribe e se disseminou para todo ele e demais países da América Central, além de México, e países da América do Sul. Nos anos seguintes diversos países das Américas registraram sorotipos diferentes presentes. Em 1994, o DENV-3, genótipo III foi reintroduzido nas Américas em países como Nicarágua e Panamá, diversos casos foram notificados como dengue hemorrágica. Em 1996, a OPAS

aprovou outro plano a nível continental para tentar controlar a disseminação do mosquito, mas não obteve sucesso na implementação (DICK et al, 2012).

2.2.4 Maior Dispersão de *Aedes aegypti* e Circulação do Vírus da Dengue

De 2000 a 2010 ocorriam cada vez mais casos de doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti* em diversos países americanos e cada vez mais surtos de todos os sorotipos do DENV eram notificados, mas dois ocorreram em grande quantidade dos países que compõe o continente. O primeiro ocorreu em 2002, com 1.015.420 casos relatados, com o Brasil sendo responsável por mais de 75% dos casos. O DENV-3 foi o mais presentes dentre os casos, mas também houveram a preça do DENV-1 e DENV-2. O país com maior incidência foi Honduras com 490 a cada 100.000 habitante, seguido de Trinidad e Tobago com 480 a cada 100.000 hab., Brasil com 452 a cada 100.000 hab., Costa Rica com 314 a cada 100.000 hab. e El Salvador com 286 a cada 100.000 hab. Diversos países da América do Sul e Central tiveram casos recordes registrados. O segundo surto aconteceu em 2010 onde foram registrado mais de 1,7 milhão de casos a incidência de óbitos dentro dos países afetados foi maior que 200 por 100.000 hab e novamente os casos bateram recordes de casos em diversos países (DICK et al, 2012).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE NO BRASIL

Depois do surto de dengue ocorrido no Rio de Janeiro em 1986 e em capitais da região nordeste do Brasil, essa doença passou a ser considerada endêmica no país, se espalhando por diversos estados, alternando entre os sorotipos 1-4 (MENDONÇA; SOUZA; DUTRA, 2009; ZAGO, 2004).

A situação epidemiológica do Brasil até a Semana Epidemiológica (SE) 51 do ano de 2022 foi de 1.423.614 casos prováveis de dengue, sendo a taxa de incidência de 667,4 casos por 100 mil habitantes. Foram confirmados 17.831 casos de DCSA e 1.441 casos de DG. O número de óbitos registrado foi de 992 (BRASIL, 2021).

A região Nordeste apresentou uma taxa de incidência de 426,8 casos para cada 100 mil habitantes, sendo a quarta região com a maior taxa de casos do Brasil, atrás das regiões Centro-Oeste com 2.043,7 casos/100 mil habitante, Sul com 1.047,5 casos/100 mil habitantes e Sudeste com 521,5 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2021).

Na Bahia até a SE 50 de 2022 foram notificados 35.644 casos prováveis de dengue e uma taxa de 240,6 casos/100 mil habitantes. Em comparação com o mesmo período no ano de 2021,

houve um aumento de 44% nos casos prováveis. Nesse período 19.943 dos casos foram de pacientes com DSSA, 261 classificados como DCSA e 22 casos de DG. Foram confirmados 24 óbitos (SESAB, 2022).

No município de Feira de Santana (FS), até a SE 51 no ano de 2020, ocorreram 6.160 casos suspeitos. Desses, 2.997 foram confirmados como DSSA, 57 como DCSA e 2 como DG. Dados mostram que os três bairros mais atingidos foram Brasília com 499 (8,10%) casos, Tomba com 391 (6,35%) casos e Conj. Feira X com 248 (4,02%) casos (PMFS, 2020).

Em 2014 houve a introdução do CHIKV no Brasil, onde foram detectados 682 casos autóctones até a data 18 de outubro do mesmo ano. Os primeiros casos autóctones registrados foram na cidade de Oiapoque no estado do Amapá e em Feira de Santana no estado da Bahia. Os casos do Oiapoque pertenciam ao genótipo Asiático e se agruparam com três isolados identificados em um surto no Caribe, sendo essa a origem provável da introdução na região norte do país. Enquanto isso, os casos ocorridos em Feira de Santana pertenciam ao genótipo ECSA, na época esse genótipo ainda não havia sido identificado nas Américas. Análises filogenéticas revelaram que as sequências isoladas em Feira de Santana estavam relacionadas com uma linhagem de Angola, sugerindo uma nova introdução direta do continente africano no Brasil (NUNES et al, 2015). Posteriormente, o genótipo ECSA do CHIKV se espalhou por todo o Brasil (A. F. VASCONCELLOS et al, 2019; FRITSCH et al, 2022; NAVECA et al, 2019; PEREIRA GUSMÃO MAIA et al, 2020), prevalendo sobre o genótipo asiático e demonstrando o potencial de Feira de Santana como um polo disseminador de arboviroses.

2.3.1 Hospitalizações

Desde de 1986 o número de casos de dengue assim como hospitalizações e óbitos advindos de complicações da doença vem crescendo no Brasil. Surtos se tornaram mais frequentes e com intervalos de tempo menores. (COELHO; JUNIOR, 2014).

Em 2002 houve um surto de DENV-3 com 708 mil casos prováveis o que levou a um número de hospitalizados de 53 mil. As hospitalizações diminuíram até 2008, onde um surto de DENV-2 hospitalizou 77 mil indivíduos. Dois anos depois foi a vez do DENV-1, deixando 91 mil pessoas hospitalizadas. (COELHO; JUNIOR, 2014)

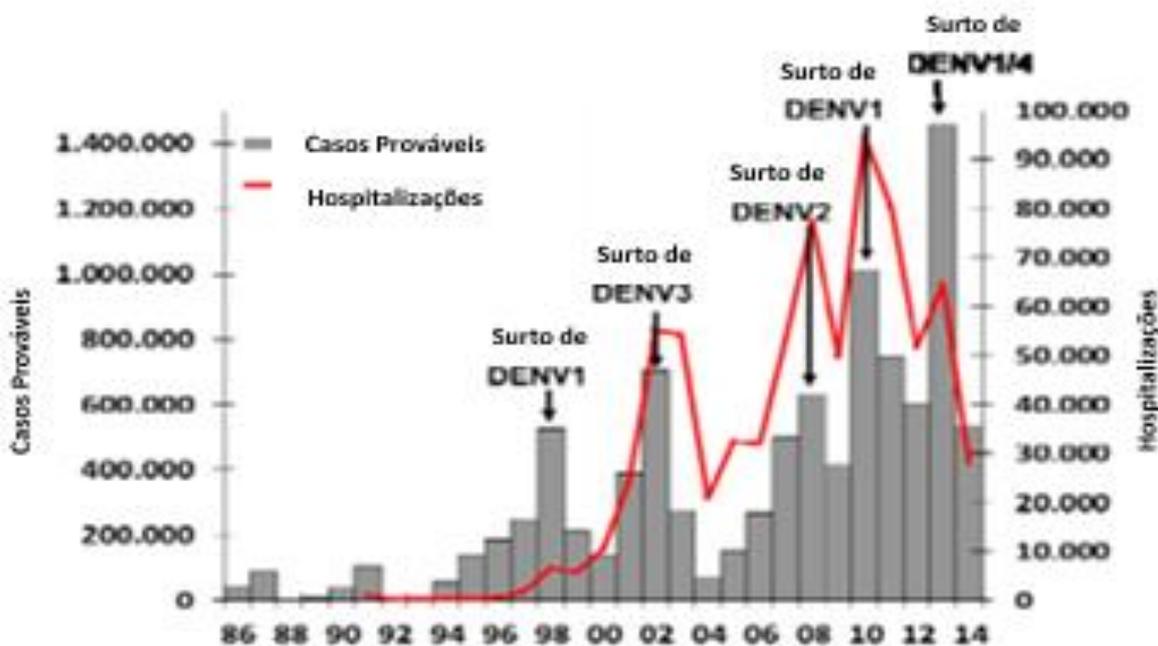


Figura 5 - Gráfico de hospitalizações por dengue no Brasil ocorridas de 1986 a 2014.
Fonte: (Adaptado de COELHO; JUNIOR, 2014)

Em 2012 embora o número de casos prováveis tenham sido a maior até então, 588 mil enfermos, o número de hospitalizações foi menor se comparado com os dois últimos surtos ocorridos, com apenas 54 mil hospitalizações (Figura 5 e Tabela 1) (COELHO; JUNIOR, 2014).

Tabela 1 - Tabela das hospitalizações por dengue no Brasil de 2002 a 2014.

Temporada de dengue	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Casos prováveis (em milhares)	708,4	288,5	73,8	147,1	259,1	481,8	651,0	357,1	1025,7	771,4	588,3	1474,5	573,5
Hospitalizações (em milhares)	53,8	55,9	21,7	31,6	31,5	21,2	77,2	50,7	91,9	53,3	54,2	64,5	28,0
Mulheres (%)	56,4	56,9	55,7	56,7	55,9	55,8	55,0	55,1	55,3	53,8	55,7	57,0	54,3
Confirmação laboratorial (%)	14,4	30,1	37,2	36,7	40,6	35,4	21,4	27,0	33,5	33,4	24,7	29,7	38,6
Casos em crianças < 15 anos (%)	17,0	16,2	16,3	17,0	17,0	17,6	27,5	22,7	18,7	22,8	18,3	14,3	14,5
Dengue com complicações (DwC)	4,778	2,577	647	1,375	2,079	4,103	20,443	8,051	13,909	8,764	3,710	5,820	-
Morte devido a DwC	31	35	11	38	66	142	309	175	370	166	224	435	-
Dengue Hemorrágica (DHF)	2,608	913	159	530	910	1,907	4,502	2,679	3,807	2,975	1,094	1,385	-
Morte devido a DHF	121	54	8	40	81	150	266	178	308	224	125	242	-
Dengue Severa (SD)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	702
Morte devido a SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	311
Sorotipo predominante	1/3	3	3	3	3	3/2	2	2	2/1	1	1	1/4	1

Fonte: (Adaptado de COELHO; JUNIOR, 2014)

Outro estudo mostra uma avaliação do aumento das hospitalizações no Brasil entre 2014 e 2019, nesse trabalho, para dengue, foram avaliados 27 estados e 2.366 municípios relatando um pequeno aumento do risco relativo (RR) de 1,0029 para dengue; 1,0029 para dengue não hemorrágica e 1,0027 para dengue hemorrágica, outras variáveis foram avaliadas como idade e incidência das arboviroses (Tabela 2). Infelizmente o artigo utiliza a nomenclatura antiga, mas como já foi retratado nesse trabalho sobre a alteração da nomenclatura, não se faz difícil a interpretação. (PESCARINI et al, 2022)

Tabela 2 - Tabela das hospitalizações por dengue no Brasil de 2014 a 2019.

Hospitalizações relacionadas a arbovírus	Incidência de DENV RR (95%CrI)
Nível Municipal	(N=2.366 municípios)
Dengue (A90-A91)	1.0029 (1.0027-1.003)
Dengue não hemorrágica (A90)	1.0029 (1.0027-1.003)
Dengue hemorrágica (A91)	1.0027 (1.0019-1.0034)
Nível Estadual	(N=27 estados)
Dengue (A90-A91)	1.0053 (1.0047-1.0059)
Dengue não hemorrágica (A90)	1.0052 (1.0048-1.0066)
Dengue hemorrágica (A91)	1.0021 (1.0012-1.003)

Fonte: (Adaptado de PESCARINI et al, 2022)

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da dengue leva em consideração o relato do paciente e os sinais e sintomas presentes durante a consulta médica. Se há febre e pelo menos mais dois sintomas característicos da dengue, considera-se o um caso suspeito de dengue (DE TOLEDO et al., 2006).

Os diagnósticos laboratoriais se utilizam de amostras biológicas do paciente, sendo geralmente sangue total, soro ou plasma (WHO, 2009). Porém para estabelecer qual a melhor abordagem diagnóstica, deve-se avaliar o período de infecção dos pacientes. Entre os dias 0 e 5 pós infecção, a viremia se torna alta o suficiente para a detecção do vírus por métodos moleculares. A partir do 6º dia, o nível da viremia se torna muito baixa, não sendo mais confiável a detecção do DENV (SANTIAGO et al, 2013; WHO, 2009). Porém, nesse ponto pode-se utilizar métodos sorológicos que detectam anticorpos IgM, pois seus níveis se tornam suficientes para a confiabilidade do diagnóstico (Figura 6) (WHO, 2009).

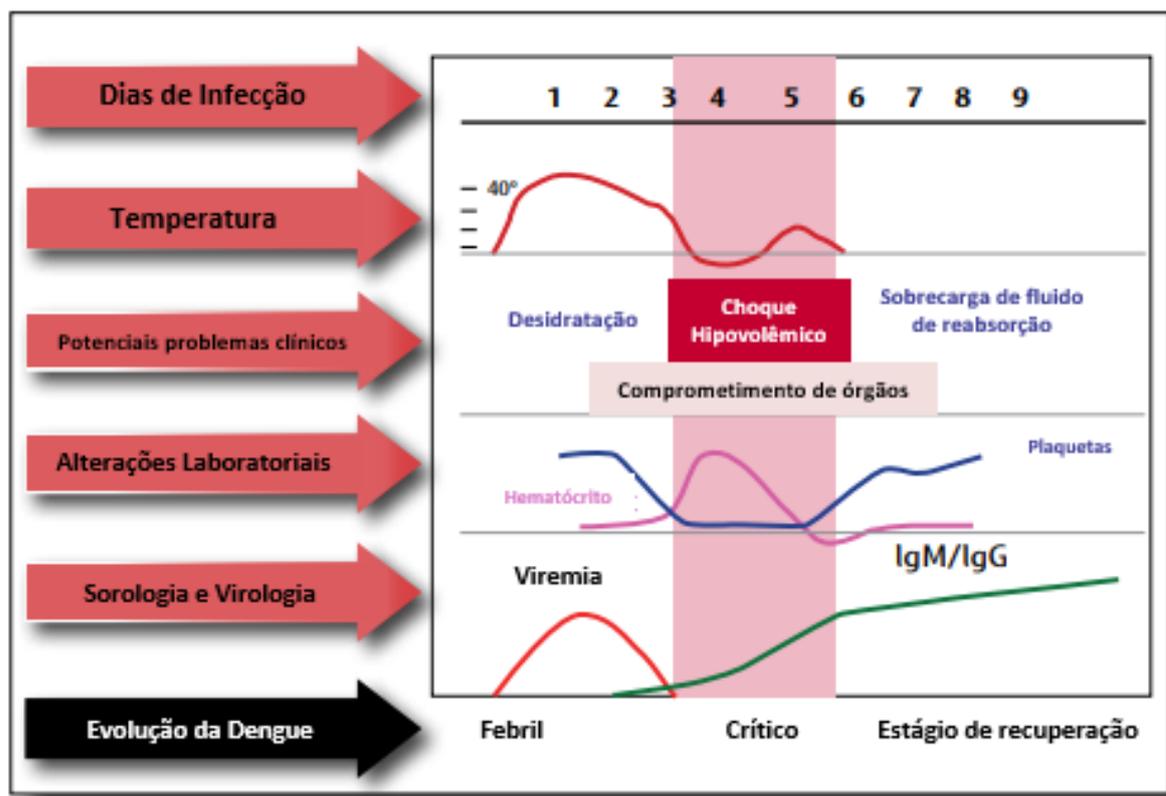


Figura 6 - Questões decorrentes da infecção por dengue.
Fonte: (Adaptado de PAHO, 2016)

Embora os custos do diagnóstico molecular sejam alto quando comparado a outras formas, é o meio mais eficaz de detectar a infecção logo na fase aguda. Nesse método podem ser utilizados RNA ou antígenos virais, a exemplo da proteína NS1 presente no DENV que é usada no RT-PCR (Figura 7) (SANTIAGO et al, 2013; WHO, 2009).

O diagnóstico sorológico é bastante utilizado devido ao seu baixo custo e facilidade na execução. Através da determinação de anticorpos IgM ou IgG produzidos pelo paciente é possível descobrir se houve uma infecção recente ou mais antiga causada pelo vírus alvo (Figura 8) (MUÑOZ-JORDÁN et al, 2009; SANTIAGO et al, 2013; WHO, 2009).

Quando realiza-se um teste sorológico pode ocorrer uma reação cruzada com os vários tipos de *Flavivirus*. Esses possuem uma composição proteica semelhantes e é justamente as proteínas que os envolvem que são reconhecidas nesses testes, por muitas vezes essas proteínas não são só semelhantes, como são as mesmas. Isso dificulta o diagnóstico correto, uma vez que, se o paciente tiver um *Flavivirus* diferente como o vírus da zika (ZIKV), o teste ainda pode acusar como o vírus da dengue DENV (CHAN et al, 2022).

Quadro 1 - Quadros dos métodos diagnósticos

Método Diagnóstico	Diagnóstico para infecção aguda	Tempo de espera do resultado	Tipo de Amostra	Prazo de coleta após início dos sintomas	Instalações	Custo
Isolamento viral e identificação do sorotipo	Confirmado	1-2 semanas	Sangue total, soro, tecidos	1-5 dias	Instalações para cultura de mosquitos ou células, laboratório BSL-2 / BSL-3, Microscópio de fluorescência ou equipamentos de biologia molecular	\$\$\$
Detecção de ácido nucleico	Confirmado	1 ou 2 dias	Tecidos, sangue total, soro e plasma	1-5 dias	Laboratório BSL-2, equipamentos para biologia molecular	\$\$\$
Detecção de antígeno	Ainda não determinado	1 dia	Soro	1-6 dias	Instalações para ELISA	\$\$
	Confirmado	> 1 dia	Tecidos para imunológica	NA	Instalações para histologia	\$\$\$
ELISA IgM	Provável	1-2 dias	Soro, plasma, sangue total	Depois de 5 dias	Instalações para ELISA	\$
Teste rápido para IgM		30 minutos			Sem suprimentos adicionais	
IgG por ELISA, HI ou teste de neutralização	Confirmado	7 dias ou mais	Soro, plasma, sangue total	Resposta aguda 1-5 dias; Convalescente após 15 dias	Instalações para ELISA, laboratório BSL-2 para ensaio de neutralização	\$

Fonte: (Adaptado de WHO, 2009).

O isolamento viral e a detecção do RNA do DENV são métodos mais caros, porém sua especificidade e sensibilidade são bem mais altas quando comparado com métodos sorológicos. Além de permitirem a identificação do sorotipo presente na infecção. Contudo, a grande

desvantagem está em seu período de detecção, conseguindo detectar somente até no máximo 5 dias após a introdução viral no indivíduo (WHO, 2009).

2.5 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE DENV NO BRASIL

O DENV além de deter uma divisão por sorotipos (DENV 1-4), possui também uma subdivisão dentro dos sorotipos, os genótipos. Diferentes genótipos são caracterizados por possuírem uma divergência genética de mais de 6% dos nucleotídeos na região E/NS1 (STICA et al., 2022). Ainda pouco se sabe sobre o potencial dessas mutações em aumentar ou diminuir sua capacidade de virulência, transmissibilidade ou outros inúmero fatores. O DENV-1 pode ser classificado em cinco genótipos distintos nomeados como I, II, III, IV e V. O DENV-2 dispõe de seis, Asiático I, Asiático II, Cosmopolita, Americano, Asiático/Americano e Silvático. O DENV-3 possui quatro, I, II, III e IV. Por fim, o DENV-4 apresenta também quatro genótipos, I, II, III e IV. Cada um desses genótipos pode ser ainda dividido em diversas linhagens distintas que não possuem uma padronização de nomenclatura e critérios (HARAPAN et al, 2020).

No Brasil, o genótipo circulante do DENV-1 é o genótipo V. Já foram introduzidas pelo menos quatro linhagens desse genótipo ao longo dos anos, porém atualmente apenas duas ainda estão em circulação. Dados filogenéticos indicam que as linhagens de DENV-1 presentes no Brasil, foram provavelmente introduzidas a partir de países no Caribe e da Venezuela (DUTRA et al, 2017). Nos anos de 2015 e 2016 o DENV-1 era predominante nas regiões brasileiras, Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste, porém em 2017 esse cenário mudou, o DENV-2 passou a ser mais presente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e a persistência do DENV-1 continuou somente a região Nordeste. Junto com DENV-2, DENV-1 é o sorotipo mais circulante no Brasil atualmente (ADELINO et al, 2021).

Até recentemente o único genótipo circulante no Brasil, para o DENV-2, era o asiático americano, também conhecido como genótipo III. Já foram detectados pelo menos 4 clados, sendo que só dois estão em circulação baseado em amostras de oitos estados diferentes coletadas até 2019 (ADELINO et al, 2021). Também foi revelado que as regiões Sudeste e Norte do país foram as mais importantes para a dispersão do vírus (ADELINO et al, 2021). No final de 2021 foi identificada a primeira amostra de DENV-2 genótipo cosmopolita, ou genótipo II, na cidade de Aparecida de Goiânia, no estado de Goiás. Esse estudo mostrou que o isolado presente no Brasil agrupava-se proximamente a sequencias do Peru, o que mostrou uma provável transmissão vinda desse país (GIOVANETTI et al, 2022).

Já para o DENV-3, o genótipo predominante é o III, apesar de que também já foram detectadas sequências de outros genótipos no Brasil, muito provavelmente casos não autóctones ou com baixo sucesso de disseminação local (VILLABONA-ARENAS et al, 2013). Pelo menos quatro introduções do genótipo III já foram detectadas (todas com origem no Caribe, Colômbia e/ou Venezuela) mas apenas duas introduções foram bem-sucedidas formando clados circulantes no país (ARAÚJO et al, 2012). Os padrões de introdução de DENV-3 no Brasil exemplificam a importância de locais como Caribe, Colômbia e Venezuela como fonte de dispersão de novas linhagens de dengue para o Brasil. No início dos anos 2000 foi o momento de maior circulação de DENV-3 no Brasil, levando a grandes surtos de dengue no país.

Para o DENV-4 o genótipo II é o mais presente no Brasil, tendo reemergido com força em 2010 no estado de Roraima, mesmo estado da sua primeira introdução. Desde então o vírus tem se espalhado pela região causando diversos surtos (SUSANA ORTIZ-BAEZ et al, 2019). DENV-4 teve grande importância nas epidemias de 2012-2013, circulando de forma simultânea com os outros três sorotipos. Já foi introduzido no Brasil pelo menos em três ocasiões diferentes (VILLABONA-ARENAS et al, 2014).

Com o que foi abordado até aqui, fica claro que o estudo das arboviroses, como a dengue, é de suma importância no Brasil. A cidade de Feira de Santana, com 619.609 mil habitantes é uma das maiores do estado da Bahia e seu clima e localização como um centro de interconexão de transporte rodoviário no Nordeste, favorecem a rápida disseminação de arboviroses. Como exemplo, podemos citar a introdução do genótipo ECSA de chikungunya em Feira de Santana em 2014 e sua rápida dispersão pelo território nacional, se tornando o genótipo dominante do vírus no Brasil (NUNES et al., 2015). Sendo assim, Feira de Santana é um importante ponto estratégico para se fazer a vigilância genômica de arboviroses no Brasil, podendo revelar a introdução de novas linhagens virais e informar sistemas de vigilância epidemiológica sobre a possível expansão da circulação destas variantes e sobre o impacto nos surtos de arboviroses.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os casos de Dengue durante a epidemia na cidade de Feira de Santana ocorrida no ano de 2019.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Descrever a distribuição temporal e geográfica dos casos de dengue da cidade de Feira de Santana em 2019;
- II. Descrever características sociodemográficas e clínicas dos casos de dengue;
- III. Descrever a diversidade molecular do vírus da dengue durante a epidemia de 2019 em Feira de Santana e inferir sua origem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FIOCRUZ/IGM (45279715.8.0000.0040). Todos os participantes foram incluídos após o consentimento e assinatura do TCLE pelo participante ou representante legal.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Esse projeto se trata de um estudo de corte transversal.

Período do estudo: no período de 2019 a 2021

População: com uma população diversa em relação a idade, alcançando desde 0 até 85 anos, tanto de zona urbana quanto periurbana e rural, no município de Feira de Santana.

Crítérios de inclusão: Foram inclusos casos notificados como dengue pela vigilância epidemiológica de Feira de Santana, no ano de 2019 e que concordaram em participar do estudo.

Crítérios de exclusão: Foram excluídos casos que possuíam somente a ficha de investigação de dengue, zika e chikungunya ou somente a amostra biológica.

4.3 COLETA E GERENCIAMENTO DE DADOS

Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados por profissionais da vigilância epidemiológica de Feira de Santana utilizando a ficha de investigação de dengue, zika e chikungunya do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) para investigação de caso. Uma cópia desses questionários foi recebida no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) e inseridos na plataforma de gerenciamento de dados REDCap 9.3.1 - © 2021 Vanderbilt University.

4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de soro dos pacientes foram coletadas em laboratório da vigilância epidemiológica de Feira de Santana, por punção na veia cubital mediana. Os tubos utilizados para a coleta foram tubos com gel separador com ativador de coágulo (tampa amarela) ou siliconado sem anticoagulante (tampa vermelha).

Após a coleta as amostras foram centrifugadas a 5000 RPM por 10 minutos para aquisição do soro e armazenadas em temperatura inferior a -20°C . Posteriormente foram enviadas, em ambiente refrigerado, dentro de caixas de transporte e recebidas no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), localizado no Instituto Gonçalo Moniz (IGM), onde foram feitas alíquotas de $200\mu\text{L}$ e 1mL para melhor logística e estocadas em temperatura -80°C .

4.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Inicialmente, para as amostras com diferença ≥ 6 dias entre a data de primeiros sintomas e a data de coleta, foi realizado o diagnóstico sorológico pelo método de ELISA indireto utilizando-se o kit comercial Anti-Dengue Virus ELISA (IgM) (EUROIMMUN), COD: EI 266b-9601 M e número do registro no ministério da saúde: 10338930134, obedecendo as instruções dos fabricantes.

Posteriormente todas as amostras foram diagnosticadas para IgM e NS1 independente dos dias de sintomas. O Kit utilizado para NS1 foi o Dengue NS1 ELISA (EUROIMMUN), COD: EQ 266a-1.

4.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para maximizar as chances de encontrar material genético do vírus na corrente sanguínea, o diagnóstico molecular foi realizado nas mostras com diferença ≤ 5 dias entre a data de primeiros sintomas e a data de coleta das amostras.

Para a extração do RNA viral o kit utilizado foi o PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (INVITROGEN), utilizando um volume de $200\mu\text{L}$ de soro e sendo seguido de acordo com as instruções do fabricante. Nesse kit o método de separação do ácido nucleico ocorre devido a um filtro de sílica presente no tubo vindo no kit onde o RNA/DNA fica retido após lise viral e eluído somente ao final quando se adiciona água.

O RNA isolado foi utilizado para as reações de RT-PCR qualitativo em tempo real (RT-PCR). Para isso o kit comercial utilizado foi o Kit Molecular ZDC Bio-Manguinhos (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos), LOT: 202RA002Z e número de registro na ANVISA: 80142170032. Esse kit é multiplex e capaz de detectar os vírus DENV, ZIKV e CHIKV com $15\mu\text{L}$ de RNA. Para a utilização dele se faz necessário realizar duas reações diferentes simultâneas, onde metade da placa amplifica e detecta ZIKV e CHIKV em uma reação multiplex, e a outra metade detecta DENV. Assim um máximo de 48 amostras podem ser

analisadas em cada corrida. Esse kit não distingui os sorotipos presentes nas amostras com DENV detectado.

As corridas foram realizadas através do equipamento 7500 Real Time PCR System e programa 7500 Software v2.0.6 usando um template fornecido por Biomanginhos. Além dos controles do próprio kit e o controle da extração, foram adicionados controles virais de DENV, ZIKV e CHIKV que foram obtidos a partir de cultura celular, fornecidos gentilmente por Dr. Ricardo Khouri, do laboratório LEITV, Instituto Gonçalo Moniz- Fiocruz.

Para a interpretação dos resultados o software BIOLAUDOS v1.3.4 foi utilizado. O programa lê e interpreta os arquivos das corridas de PCR aplicando a chave de diagnóstico do kit.

4.7 SEQUENCIAMENTO

Após realizado o RT-PCR, algumas amostras com resultado positivo para dengue foram encaminhadas para a etapa de sequenciamento. As amostras foram selecionadas de acordo com as maiores cargas virais evidenciada pelo Cycle Threshold (Ct) baixo e enviadas para o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-BA) para realização do sequenciamento genômico. O DNA complementar (cDNA) foi gerado utilizando o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) e em seguida feito um PCR multiplex para amplificar o genoma inteiro de DENV, como descrito por (ADELINO et al, 2021). Para a elaboração da biblioteca de DNA os kits Ligation Sequencing (Oxford Nanopore Technologies) e Native Barcoding Expansion 1-96 (Oxford Nanopore Technologies) foram utilizados conforme instruções do fabricante.

O sequenciamento de genoma completo foi feito através do aparelho MinION (Oxford Nanopore Technologies) e a montagem do genoma e geração das sequências consenso foi feita com o software Genome Detective (VILSKER et al, 2019). A atribuição do genótipo foi realizada aplicando a ferramenta de subtipagem filogenética de arbovírus, disponível em <http://genomedetective.com/app/typingtool/dengue>.

4.8 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Para investigar a evolução das sequências de DENV geradas nesse estudo, criamos um dataset contendo todas sequências com pelo menos 50% de cobertura e data e local de coleta, disponíveis na plataforma GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) até o final de

dezembro de 2022. Todas as sequências foram alinhadas usando o software MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013) e editadas manualmente para remover artefatos de alinhamento usando o software Aliview (LARSSON, 2014). As árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (ML) foram estimadas usando o software IQ-TREE2 (MINH et al, 2020), onde o melhor modelo de substituição foi estimado pelo programa ModelFinder (integrado ao IQ-TREE) e o suporte dos ramos foi estimado pela metodologia de *bootstrap* com 1000 pseudo-réplicas. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no programa FigTree (disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Nesse estudo foram incluídos 977 participantes, em seguida, essas respectivas amostras foram separadas quanto à diferença entre a data de primeiros sintomas e a data de coleta conforme fluxograma abaixo (Figura 8).

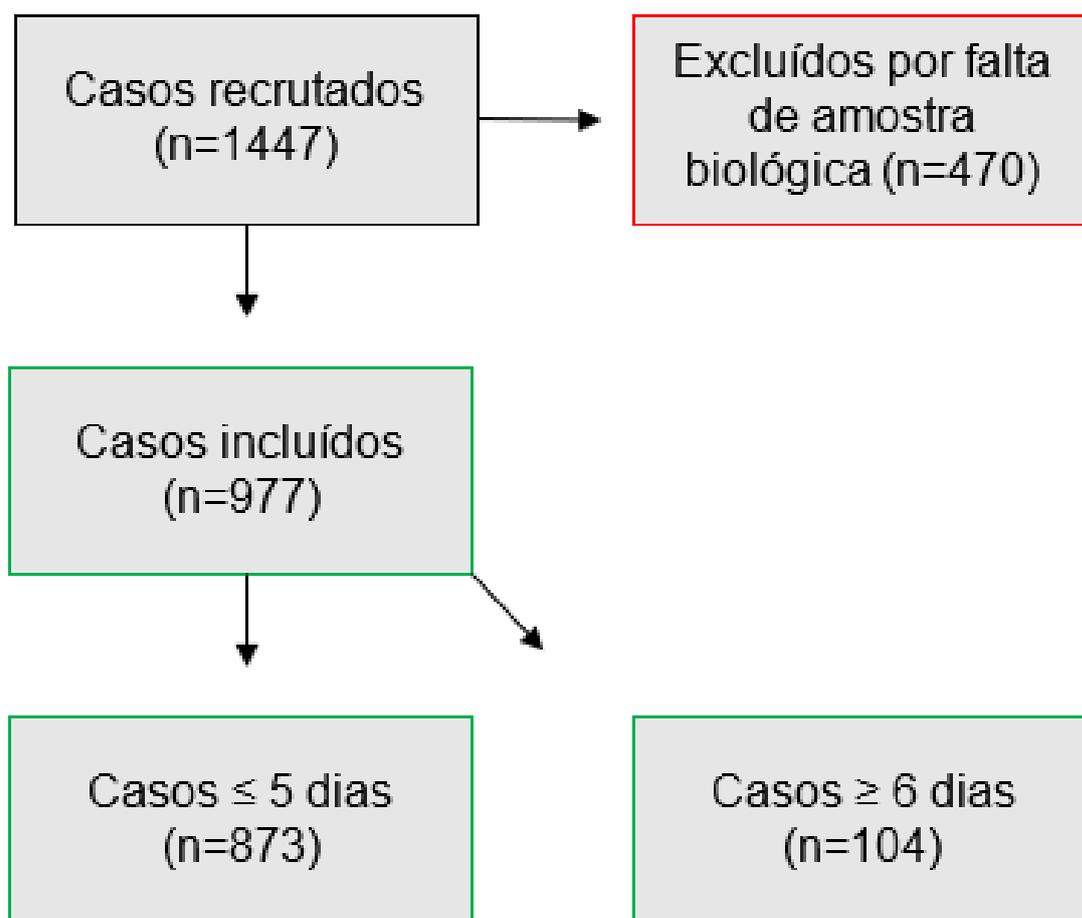


Figura 77- Esquema relatando o número de participantes do estudo.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2 DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL

Na ficha de cada um dos participantes, constava um campo onde informavam a data dos seus primeiros sintomas. A figura abaixo mostra a quantidade de participantes, a cada mês, que relataram sintomas da dengue ao longo do ano de 2019 (Figura 9).

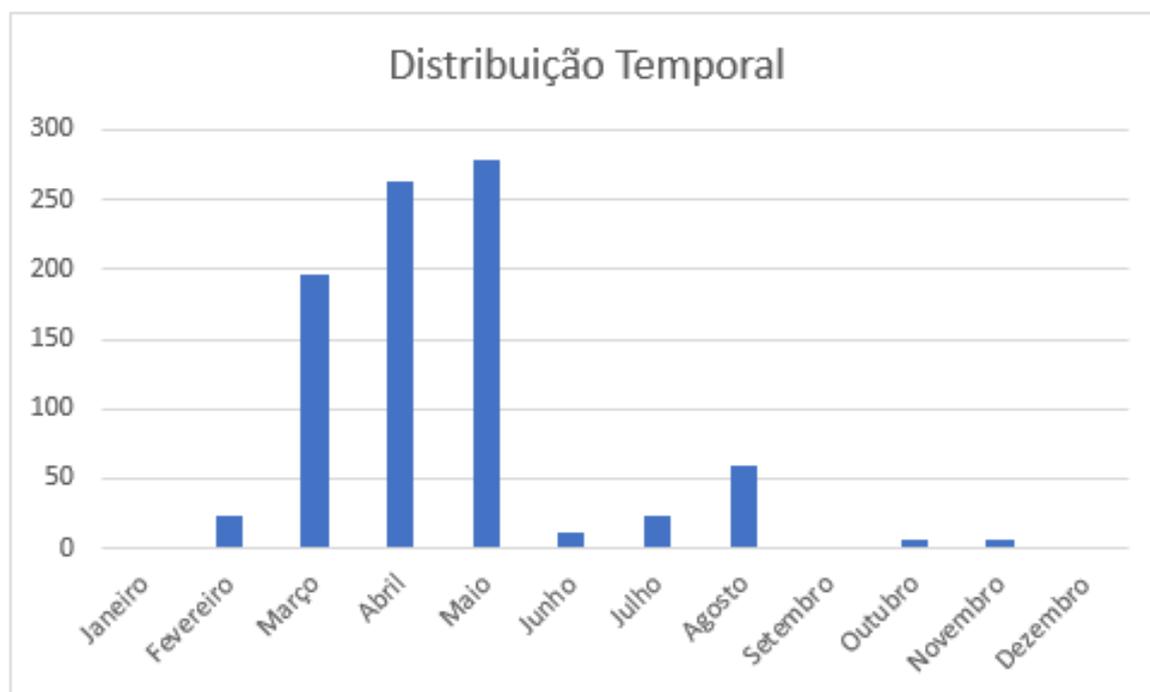


Figura 8 - Distribuição temporal, mês a mês, dos primeiros sintomas de dengue em 977 participantes de Feira de Santana no ano de 2019.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.3 ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS

Dos 977 participantes, a mediana de idade foi de 22 anos (IQR 12-35), a maioria deles na faixa etária de 11 a 20 anos com 263 casos (27,14%), seguidos pelo seguimento de 21 a 30 anos com 218 casos (22,50%) (Tabela 3). Quanto ao sexo, a população feminina apresentou um N de 516 (53,30%), enquanto que a masculina foi de 450 (46,49%). Relacionado a raça/cor autodeclarada, a cor parda foi a mais citada, com 491 participantes (51,90%), acompanhados da preta apresentando 176 participantes (18,60%) e branca com 107 participantes (11,31%) (Tabela 3). Da população recrutada, 133 possuíam 1ª a 4ª série incompleta do ensino fundamental (EF) (16,26%), 112 tinham 5ª a 8ª série incompleta do EF (13,70%) e outras 112 detinham ensino médio completo (13,70%) (Tabela 3). De todos os participantes 181 eram estudantes (26,77%), 27 se ocupavam com a manutenção do seu lar (3,99%) e 13 trabalhavam com vendas (1,92%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Informações Sociodemográficas dos 977 participantes, Feira de Santana, Bahia - Brasil, 2019.

Características	N (%)*
IDADE (Faixa Etária)	N=969
0 a 10 anos	179 (18,47)
11 a 20 anos	263 (27,14)
21 a 30 anos	218 (22,50)
31 a 40 anos	140 (14,45)
41 a 60 anos	139 (14,34)
61 anos a 80 anos	28 (2,89)
81 anos ou mais	2 (0,21)
SEXO	N=975
Feminino	521 (53,44)
Masculino	454 (46,56)
RAÇA/COR	N=799
Parda	491 (51,90)
Preta	176 (18,60)
Branca	107 (11,31)
Amarela	21 (2,22)
Indígena	4 (0,43)
ESCOLARIDADE	N=606
Analfabeto	10 (1,22)
1ª a 4ª série incompleta do EF	133 (16,26)
2ª a 4ª série completa do EF	42 (5,13)
5ª a 8ª série incompleta do EF	112 (13,70)
Ensino fundamental completo	55 (6,72)
Ensino médio incompleto	59 (7,21)
Ensino médio completo	112 (13,70)
Educação Superior incompleta	17 (2,08)
Educação Superior completa	15 (1,83)
Não se aplica	51 (6,23)
OCUPAÇÃO	N=676
Aposentado	9 (1,33)
Autônomo	10 (1,48)
Costureiro	6 (0,89)
Do Lar	27 (3,99)
Estudante	181 (26,77)
Pedreiro	11 (1,63)
Serviços Gerais	11 (1,63)
Trabalhador Rural	10 (1,48)
Vendedor	13 (1,92)
Outros	387 (57,25)
Sem Ocupação	11 (1,63)
ZONA	N=965
Urbana	818 (84,76)
Rural	147 (15,23)

*O N varia conforme a disponibilidade do dado

Fonte: Elaborado pelo autor

A maioria dos participantes, 942, (98,02%) residem no município de Feira de Santana (FS) e 19 participantes (1,98%) são residentes de outros municípios, distantes em uma média de aproximadamente 53,4 Km de Feira de Santana (Figura 10). Quanto a distribuição de moradia, a zona urbana se apresentou majoritária nesse estudo com um N de 818 (84,76%) e a zona rural com N igual a 147 (15,23%) (Tabela 3).

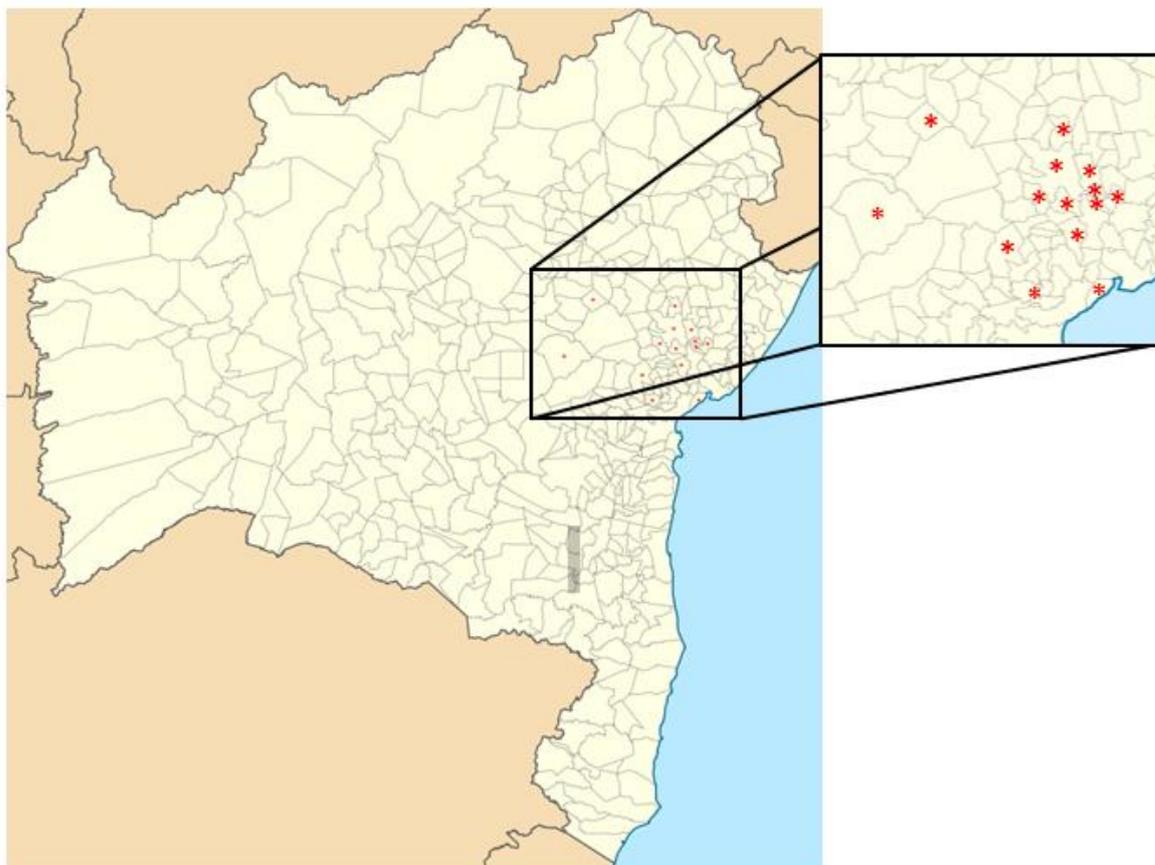


Figura 9 - Mapa demonstrando os municípios de residência dos participantes do estudo.
Fonte: Elaborado pelo autor

5.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Os principais sintomas relatados foram febre (93,35%), cefaleia (84,44%), mialgia (81,98%), dor retro-orbital (59,36%) e náuseas (38,89%) (Figura 11).

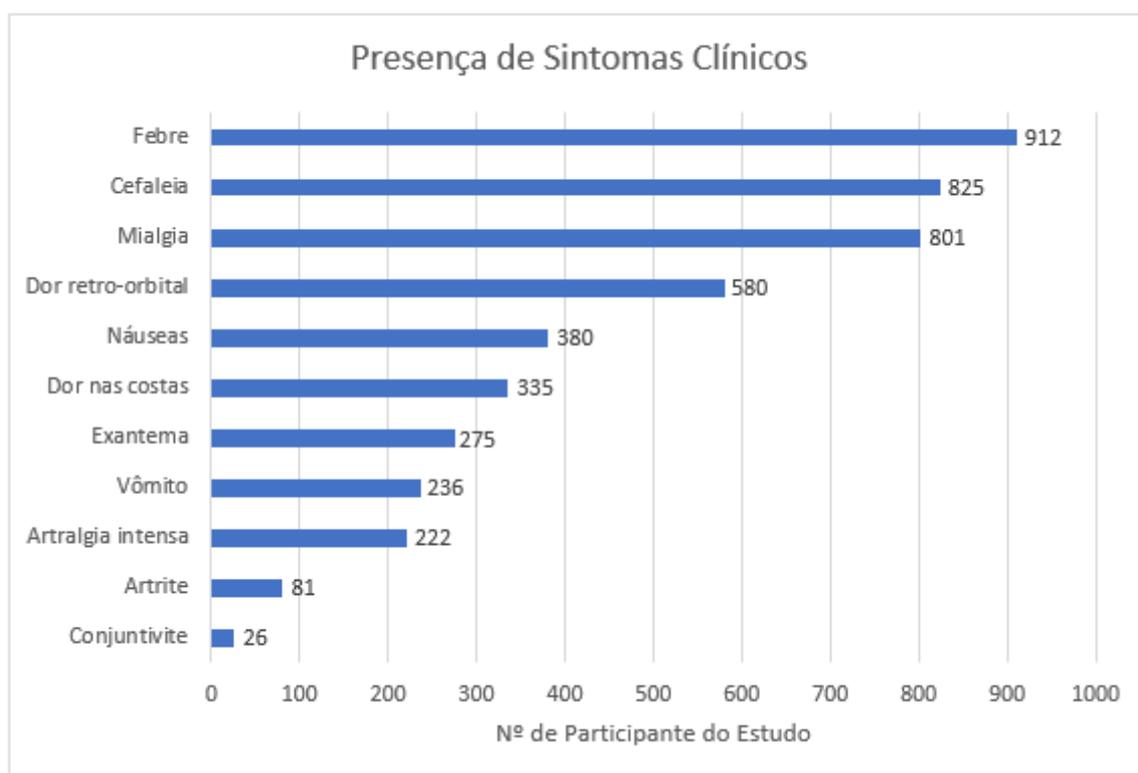


Figura 10 - Presença dos sintomas clínicos de 977 pacientes notificados como Dengue, Feira de Santana, 2019.
Fonte: Elaborado pelo autor

Com relação à classificação clínica para Dengue, os dados foram disponíveis apenas para 232 participantes. Desses, 223 (96,12%) foram classificados com dengue clássica, 7 (3,01%) com dengue com sinais de alarme e 1 (0,43%) com dengue grave. 31 casos foram descartados (1,33%) (Figura 12). Não houveram óbitos entre os 977 participantes do estudo.

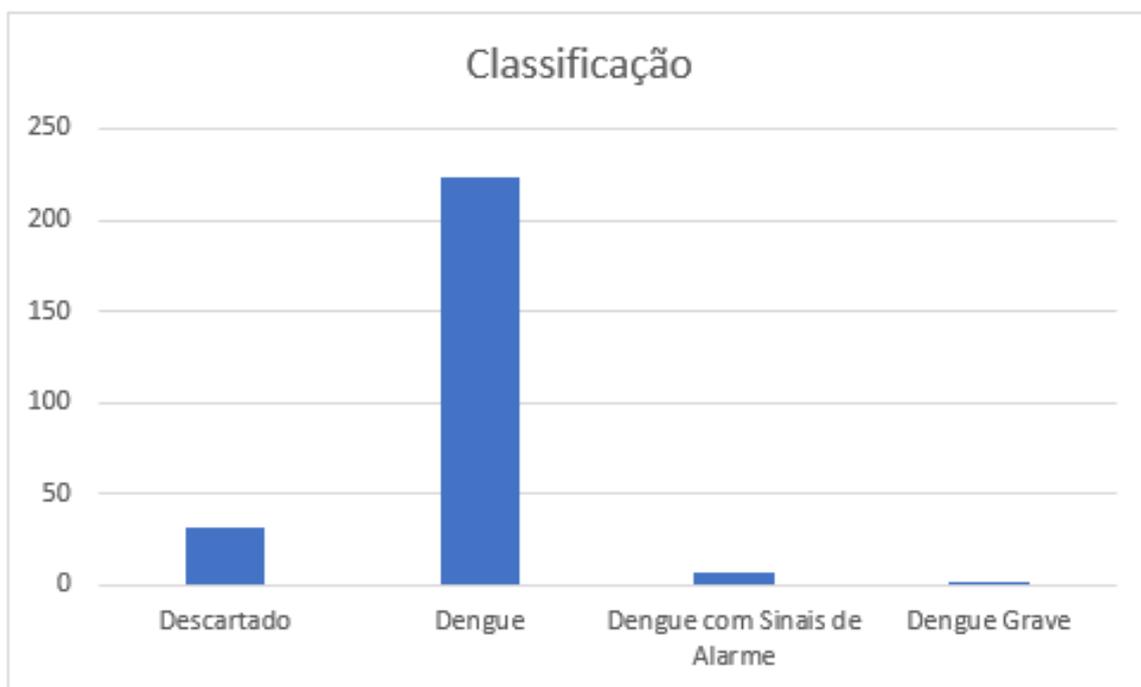


Figura 8 - Classificação clínica de 232 pacientes do estudo de dengue, Feira de Santana, 2019.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.5 DIAGNÓSTICO PARA DENGUE

Inicialmente foi feita uma divisão das amostras recebidas em amostras de pacientes que tivessem uma diferença ≤ 5 dias entre a data de primeiros sintomas e a data de coleta, sendo essas, encaminhadas para o diagnóstico molecular (n=873) foi realizada a sorologia, para NS1 e IgM, de todos os casos incluídos no estudo.

5.5.1 Sorologias

Foram realizadas sorologias anti-Dengue IgM nas 977 amostras. Dessas, 253 (25,90%) foram reagentes, 664 (67,96%) apresentaram-se negativas e 60 (6,14%) se mostraram indeterminadas. Também foram feitas sorologias envolvendo a detecção do antígeno NS1 onde 977 amostras foram testadas, sendo 392 (40,12%) positivas, 573 (58,65%) negativas e 12 (1,23%) inconclusivas.

5.5.2 Biologia molecular

Foram realizadas reações de PCR em tempo real para detecção dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya em 873 amostras. Para DENV, 102 (11,68%) apresentaram resultado detectável e 139 (15,92%) ficaram como inconclusivas. Para ZIKV 821 (94,04%) não foram detectáveis e 51 (5,84%) foram inconclusivas. Para CHIKV 19 (2,18%) foram detectáveis e 47 (5,38%) se mostraram inconclusivas (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do diagnóstico molecular para dengue, zika e chikungunya de 873 amostras, Feira de Santana 2019.

STATUS	DENV N (%)	ZIKV N (%)	CHIKV N (%)
DETECTADO	102 (11,68%)	0 (0%)	19 (2,18%)
NÃO DETECTADO	632 (72,39%)	821 (94,04%)	807 (92,44%)
INCLONCLUSIVO	139 (15,92%)	51 (5,84%)	47 (5,38%)

Fonte: Elaborado pelo autor

5.5.3 Interseção dos testes diagnósticos

Dentre as 102 (11,68%) amostras positivas no PCR, 45 (5,15%) também foram positivas para NS1 e 23 (2,64%) para IgM. Das 977 amostras das sorologias 170 (17,40%) amostras se mostraram positivas para NS1 e IgM.

Um total de 309 (31,63%) amostras foram negativas em todos os testes diagnósticos utilizados nesse estudo.

5.5.4 Sequenciamento e análises filogenéticas

Dezenove amostras foram sequenciadas, sendo obtidos genomas DENV-1 (n=17) e DENV-2 (n=2), com uma faixa de cobertura média de 98,0% e com uma profundidade média de $> 1.000 \times$ para todas as amostras. Todas as amostras sequenciadas foram coletadas entre março e maio de 2019 e disponibilizadas online no GenBank (códigos de acesso: OQ078871 – OQ078889). Foram identificados os genótipos V para todas as sequencias de DENV-1 e o genótipo III para as de DENV-2. (Tabela 5).

O seguimento de sequenciamento e análise filogenética deste trabalho já foi publicado em revista científica. A capa do mesmo, assim como o doi, está disponível no apêndice.

Tabela 5 - Dados epidemiológicos das 19 amostras de DENV 1-2 sequenciadas como parte deste estudo.

Variedade	Sorotipo	Genótipo	País	Isolado	Tipo de Amostra	Data de Coleta	Número de Acesso
NIH-05_NB14_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	12-Abr-2019	OQ078871
NIH-06_NB15_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	21-Mar-2019	OQ078872
NIH-07_NB16_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	21-Mar-2019	OQ078873
NIH-08_NB17_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	23-Mar-2019	OQ078874
NIH-13_NB18_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	30-Mar-2019	OQ078875
NIH-14_NB19_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	02-Abr-2019	OQ078876
NIH-15_NB20_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	12-Abr-2019	OQ078877
NIH-16_NB21_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	09-Abr-2019	OQ078878
NIH-18_NB22_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	10-Abr-2019	OQ078879
NIH-19_NB23_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	09-Abr-2019	OQ078880
NIH-20_NB24_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	12-Abr-2019	OQ078881
NIH-21_NB25_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	24-Mar-2019	OQ078882
NIH-22_NB26_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	21-Mar-2019	OQ078883
NIH-23_NB27_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	16-Abr-2019	OQ078884
NIH-24_NB28_BA	DENV -1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	11-Abr-2019	OQ078885
NIH-25_NB29_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	30-Maio-2019	OQ078886

NIH-27_NB30_BA	DENV-1	Genótipo V	Brasil: Bahia	Humano	Soro	23-Maio-2019	OQ078887
NIH-26_NB39_BA	DENV-2	Genótipo III	Brasil: Bahia	Humano	Soro	08-Maio-2019	OQ078888
NIH-28_NB40_BA	DENV-2	Genótipo III	Brasil: Bahia	Humano	Soro	08-Maio-2019	OQ078889

Fonte: Elaborado pelo autor

A reconstrução filogenética mostrou que as sequências de DENV-1 genótipo V do Brasil formam quatro clados independentes dentro da diversidade genética do vírus encontrada no continente americano (Figura 13). Os genomas de Feira de Santana, produzidas neste estudo, agruparam-se em três diferentes clados, sendo dois deles (clados III e IV) de origem nacional. O clado V agrupa-se com sequências internacionais e representa uma nova introdução do DENV-1 genótipo V no Brasil.

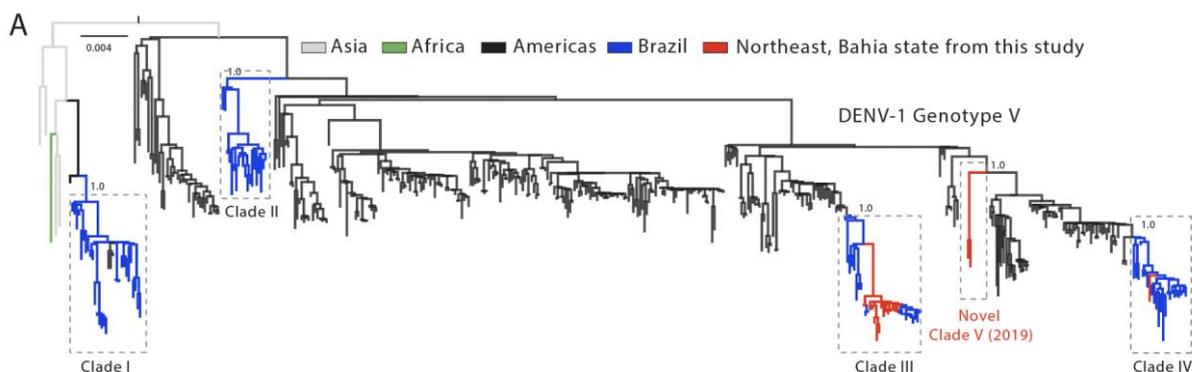


Figura 12 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança de sequências de DENV-1, genótipo V. Sequências do Brasil estão destacadas em azul e de Feira de Santana, geradas neste estudo, em vermelho. O suporte (bootstrap) dos clados de interesse é informado.

Fonte: Elaborado pelo autor

Já as sequências reconstruídas de DENV-2 genótipo III agruparam-se no clado BR-4, sub-clado BR4L1, conforme nomenclatura proposta por (ADELINO et al., 2021). Neste clado também estão sequências de outros estados do Nordeste, do Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, amostradas entre 2018 e 2019 (Figura 14).

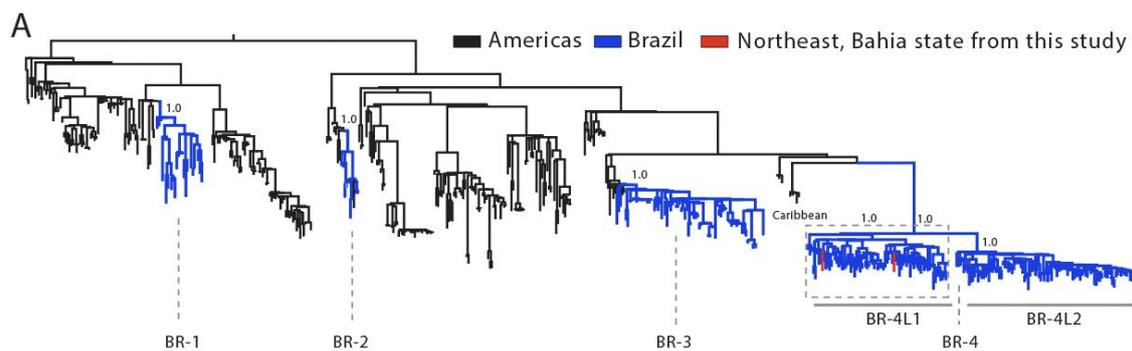


Figura 13 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança de seqüências de DENV-2, genótipo III. Seqüências do Brasil estão destacadas em azul e, em vermelho, estão as seqüências de Feira de Santana, geradas neste estudo. O suporte (bootstrap) dos clados de interesse é informado.

Fonte: Elaborado pelo autor

6 DISCUSSÃO

A dengue está presente no Brasil há mais de 35 anos e representa um grande problema de saúde pública (NOGUEIRA et al, 2001). No país já foram identificados os 4 sorotipos do DENV, que se alternam como sorotipos dominantes ao longo dos anos. Devido o Brasil possuir um clima ideal para disseminação dos vetores do DENV, estudos frequentes sobre a epidemiologia da doença e genética do vírus são muito importantes (SIQUEIRA et al, 2005; NOGUEIRA et al, 2001; TEIXEIRA et al, 2005; TEMPORÃO et al, 2011).

Com a constante entrada de novas variantes de DENV no Brasil, a investigação e diferenciação dessas, afim de descobrir de onde vieram e entender os padrões de disseminação no país, podem ajudar na elaboração de melhores estratégias para lidar com os surtos.

Feira de Santana é uma cidade com fatores que favorecem o aumento e dispersão dos vetores do DENV, assim como de outras arboviroses. A exemplo temos fatores climáticos como temperaturas elevadas na região, ao mesmo tempo que possui uma alta umidade, e fatores urbanos onde se destaca a alta densidade populacional. Além disso, Feira de Santana é um importante entroncamento rodoviário da região nordeste, por onde passam diversos viajantes, favorecendo a introdução e dispersão de novas variantes virais (CANO-PÉREZ et al, 2022; STEWART-IBARRA; LOWE, 2013; YAVARI NEJAD; VARATHAN, 2021).

Em 2019 dos 15.715 casos notificados como suspeitos para dengue na cidade de Feira de Santana, 9893 (62,95%) foram confirmados (PMFS, 2020). Em contrapartida, no presente estudo, o número de amostras com diagnóstico sorológico positivo foi de 253 (25,90%) para IgM e 392 (40,12%) para NS1. No diagnóstico molecular, das 873 amostras testadas, em 102 (11,68%) o DENV se mostrou detectável. Esses resultados demonstram a importância do estudo epidemiológico e molecular de arboviroses na cidade de Feira de Santana. A diferença na amostragem total de casos entre os dados do boletim epidemiológico citado e do presente estudo reflete a diferença de casos confirmados nos testes diagnósticos. Também é importante salientar que o diagnóstico para dengue, em geral, é feito através da clínica do paciente, então, casos suspeitos de dengue com resultado negativo em testes sorológicos e moleculares podem significar infecção por outro agente etiológico. De fato, nosso estudo identificou 19 casos positivos para CHIKV, que clinicamente eram suspeitos de dengue. Em um cenário de múltipla circulação de arbovírus, a sobreposição de sintomas de diversas arboviroses é um desafio para a saúde pública brasileira (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018).

Na figura 10 podemos observar que a maior prevalência de casos de dengue foi nos meses de março, abril e maio, o que condiz com o final do verão e início/meio do outono. O

estudo de Almeida e colaboradores publicado em 2022, mostra a distribuição temporal no estado do Rio de Janeiro entre os anos de 2015 e 2020. Nele é possível observar que em 2015 a incidência da dengue foi maior no mês de maio com 72,8 casos/100 mil habitantes, em 2016 o pico em abril com 112,4 casos/100 mil habitantes, em 2017 o pico registrados não foi tão alto, mas se concentrou entre janeiro e abril, 2018 mostra uma alta no mês de abril e 2019 apresenta uma alta incidência entre os meses de abril e julho (DE ALMEIDA et al, 2022). Vindo um pouco mais próximo da cidade alvo desse estudo, temos um trabalho de Costa e Calado e colaboradores que mostra a relação entre o aumento dos casos de dengue com os períodos onde houveram maior precipitação acumulada, os dados foram coletados entre 2007 e 2013. (COSTA; CALADO, 2016). Ambos os estudos apontam para uma relação positiva entre pluviosidade e número de casos em regiões do Brasil.

É possível que haja um viés relacionado ao diagnóstico sorológico, já que, todas as amostras, incluindo as não ideais (diferença menor que 5 dias entre a data de primeiros sintomas e data de coleta), foram testadas para IgM e NS1.

Os dados sociodemográficos obtidos e compilados na tabela 2 mostram que as faixas etárias mais atingidas foram de 11 a 20 anos e de 21 a 30 anos. Se compararmos com o estudo de Da Silva Neto e colaboradores, publicado em 2022 com dados retrospectivos de dengue do Brasil, é possível observar que a idade média da população afetada é de 33 anos (DA SILVA NETO et al, 2022). O estudo infelizmente não detém dados de faixa etária, porém, o presente estudo calculou uma idade média de aproximadamente 36 anos entre os participantes, o que não se afasta muito da média de idade de estudo de Da Silva Neto e colaboradores. A diferença entre mulheres e homens foi de 6,88% se mostrando uma porcentagem muito baixa para inferir alguma causa. Para raça/cor foi observada uma prevalência maior entre os que se autodeclararam como pardos com 51,9% dos casos. O estudo de Neto e colaboradores de 2022, também aponta que os pardos lideram os casos de dengue no Brasil com 31,1% dos casos, seguido dos brancos com 27,9% dos casos (DA SILVA NETO et al, 2022). Segundo o Censo do IBGE realizado em 2010, a população parda de Feira de Santana representa 55,87% da população total do município (BRASIL, 2010). É observado que a porcentagem entre a positividade do presente estudo e a população parda do município citado, é bem próxima, ressaltando a precisão dos dados. Essa desproporção entre Feira de Santana e Brasil deve-se principalmente à diferença de tamanho da amostragem dos dois estudos e também pelo fato da cidade de Feira de Santana localizar-se próximo a cidade contendo a maior população negra fora do continente africano, Salvador. Quanto a esse quesito também é importante salientar que a região nordeste é a uma das regiões onde há maior prevalência de pardos no Brasil. Quanto a

escolaridade, notou-se que as maiores prevalências eram entre 1^a a 4^a série incompleta do ensino fundamental (EF) e 5^a a 8^a série incompleta do EF. De acordo com o Censo do IBGE realizado em 2010 em Feira de Santana, 144.887 (45,63%) pessoas com 25 anos ou mais não possuem grau de instrução ou apresentam o EF incompleto (BRASIL, 2010). Comparando com o presente estudo, 297 (36,31%) participantes não completaram o EF, o que mostra que indivíduos de baixa ou nenhuma escolaridade realmente são mais afetados.

Também é possível que exista um viés quanto aos dados sociodemográficos, uma vez que a população não foi estudada completamente mas, somente uma amostragem com sintomas de dengue que compareceu à vigilância.

A história recente da dengue no Brasil é caracterizada por duas grandes epidemias em 2015 e 2016, um período de dois anos de baixo número de casos e ressurgência em 2019 (ADELINO et al., 2021). As razões porque 2017 e 2018 foram anos com poucos casos ainda não são bem entendidas. Alguns estudos indicam que após a grande epidemia de Zika em 2016, uma imunidade cruzada e de pouca duração, entre ZIKV e DENV pode ter sido selecionada na população (PEREZ et al, 2019; SOUSA RIBEIRO et al, 2018). Entretanto, alguns estudos mostram que essa imunidade cruzada não seria capaz de neutralizar o vírus e apenas aumentaria as chances de dengue severa (DEJNIRATTISAI et al, 2016; KATZELNICK et al, 2020). Outra hipótese diz que a intensificação de campanhas de controle de vetores após a epidemia de Zika tiveram efeito também ao longo de 2017 e 2018 (Perez et al., 2019). Tais campanhas também teriam efeito sobre a transmissão de outras arboviroses, porém em 2017 o Brasil teve um grande número de casos de chikungunya, contrariando esta hipótese (BRITO et al, 2021).

Independente dos fatores que levaram a atenuação das epidemias de dengue em 2017 e 2018, em 2019 ela ressurgiu com força e observou-se a co-circulação dos sorotipos 1 e 2 do vírus. Nas epidemias de 2015 e 2016, DENV-1 era o predominante, já em 2019 foi observada uma compartimentalização da epidemia de dengue no Brasil, onde DENV-1 continuou predominante na região Nordeste e DENV-2 predominou nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (ADELINO et al., 2021). Importante salientar que nos estudos publicados analisando sequências de DENV de 2019, foram encontrados apenas genótipos e linhagens do vírus que já estavam em circulação no país, demonstrando que linhagens do vírus podem manter-se circulando de forma críptica e sobreviver a períodos de baixo número de casos. Isso demonstra também que não é necessário a introdução de novas cepas virais para causar a ressurgência da doença e grandes epidemias (BRITO et al., 2021).

As sequências de DENV geradas neste estudo corroboraram estudos anteriores que haviam encontrado maior prevalência de DENV-1 no nordeste do Brasil em 2019. O que

destaca-se em nossos achados foi a grande variabilidade genética do vírus observada em um único surto na cidade de Feira de Santana. Nas amostras do ano de 2019, observamos a co-circulação de dois sorotipos (DENV-1 e DENV-2), e de quatro linhagens diferentes. Apesar das amostras de DENV-1 terem sido todas classificadas como genótipo V, elas se agruparam em três clados (linhagens) diferentes (III, IV e V). Um desses clados (clado IV), possuía apenas sequências de Feira de Santana que conectavam-se direto a sequências de outros países da América do Sul, como Argentina e Venezuela. Este achado pode representar uma nova introdução do DENV-1 genótipo V no Brasil, trazendo novos dados sobre a ressurgência de dengue em 2019, uma vez que estudos anteriores haviam apenas encontrado linhagens já em circulação no Brasil. Entretanto, devido ao número limitado de sequências de DENV geradas na América do Sul, esse resultado deve ser interpretado com cautela e novos estudos com mais amostras necessitam ser feitos para confirmar esse achado. Para DENV-2, as sequências de Feira de Santana se agruparam em posições distantes no clado BR-4L1, do genótipo III. Isso demonstra que elas são mais próximas a vírus circulantes em outros estados do que entre si, chamando atenção novamente para a grande diversidade genética de DENV encontrada na cidade.

Por fim, fica um questionamento em aberto ao qual esse estudo não compreendeu, porque habitantes de uma área endêmica, a anos, continuam sucessivamente sendo infectados? A causa seriam mutações do vírus? O sistema imune da população?

7 CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo revelou detalhes sobre o ressurgimento da dengue em 2019 em Feira de Santana, após um período de dois anos de baixa circulação. Nossos resultados mostram que a sazonalidade da doença seguiu os padrões esperados e já observados em outras epidemias e segue um padrão semelhante ao já relatado em outros estudo, afetando mais indivíduos pardos, pessoas com baixa ou nenhuma escolaridade e/ou pertencendo aproximadamente 36 anos de idade. As análises filogenéticas dos genomas de DENV gerados aqui revelaram uma importante co-circulação de diferentes sorotipos, genótipos e linhagens do vírus em em Feira de Santana em 2019, destacando-se o achado de uma possível nova introdução do genótipo V de DENV-1 no Brasil a partir de linhagens ciculando em outros países sul-americanos. Tudo isso demonstra a importância da vigilância epidemiológica e genômica para investigação de epidemias ou surtos e também projeta Feira de Santana como um importante local sentinela para vigilância de arboviroses.

REFERÊNCIAS

A. F. VASCONCELLOS; J. M. F. SILVA; A. S. DE OLIVEIRA; P. S. PRADO; T. NAGATA; R. O. RESENDE. **Genome sequences of chikungunya virus isolates circulating in midwestern Brazil**. 2019. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1007/s00705-019-04174-4>. Acesso em: 23 mar. 2023.

ADELINO, Talita Émile Ribeiro et al. Field and classroom initiatives for portable sequence-based monitoring of dengue virus in Brazil. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/S41467-021-22607-0. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8052316/](https://www.nature.com/articles/PMC8052316/). Acesso em: 8 mar. 2023.

AGUIRRE, Sebastian et al. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. [S. l.], v. 2, p. 17037, 2017. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.37. Disponível em: www.nature.com/naturemicrobiology. Acesso em: 8 set. 2021.

ARAÚJO, Josélio Maria Galvão De; BELLO, Gonzalo; ROMERO, Hector; NOGUEIRA, Rita Maria Ribeiro. Origin and Evolution of Dengue Virus Type 3 in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 6, n. 9, 2012. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0001784. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3435237/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3435237/). Acesso em: 18 mar. 2023.

BHARGAVI, Sindhoora; REDDY, Gopala; CHIN, Wei-Xin; SHIVANANJU, Nanjunda Swamy. Dengue virus NS2 and NS4: minor proteins, mammoth roles. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.04.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.008>. Acesso em: 8 set. 2021.

BOSCO SIQUEIRA, João; MARTELLI, Celina Maria Turchi; COELHO, Giovanini Evelim; DA ROCHA SIMPLÍCIO, Ana Cristina; HATCH, Douglas L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 48–53, 2005. DOI: 10.3201/eid1101.031091.

BRASIL, 2010. **Censo IBGE: Bahia, Feira de Santana**. 2010. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ba/feira-de-santana/pesquisa/23/22107>. Acesso em: 23 mar. 2023.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico vol 52, n° 48. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 51, 2021**, [S. l.], v. 52, p. 1–17, 2021. Disponível em: [file:///D:/Arquivos/Documentos/_ConcursoArapiraca/PAA/Tabenet/BoletimEpidemiologicoVol52-N° 48.pdf](file:///D:/Arquivos/Documentos/_ConcursoArapiraca/PAA/Tabenet/BoletimEpidemiologicoVol52-N%00b048.pdf).

BRITO, Anderson Fernandes et al. Lying in wait: the resurgence of dengue virus after the Zika epidemic in Brazil. **Nature Communications** 2021 **12:1**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–13, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-22921-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22921-7>. Acesso em: 8 mar. 2023.

CAMPOS, Jose L. Slon; et al. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. **PLoS ONE**,

[S. l.], v. 12, n. 7, 2017. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0181734. Disponível em: /pmc/articles/PMC5526558/. Acesso em: 6 set. 2021.

CANO-PÉREZ, Eder et al. Climatic factors and the incidence of dengue in Cartagena, Colombian Caribbean Region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 55, p. 2022, 2022. DOI: 10.1590/0037-8682-0072-2022. Disponível em: /pmc/articles/PMC9536800/. Acesso em: 19 mar. 2023.

CAROD-ARTAL, Francisco Javier et al. Neurological complications of dengue virus infection. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 12, p. 906–919, 2013. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70150-9. Disponível em: www.thelancet.com/neurology. Acesso em: 9 set. 2021.

CERQUEIRA, Erenilde Marques de et al. Vigilância Epidemiológica no processo de municipalização do Sistema de Saúde em Feira de Santana-BA. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2003. DOI: 10.5123/s1679-49742003000400005.

CHAN, Kai Rol et al. Serological cross-reactivity among common flaviviruses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 12, 2022. DOI: 10.3389/FCIMB.2022.975398. Disponível em: /pmc/articles/PMC9519894/. Acesso em: 7 jul. 2023.

CHANG, David C. et al. Evasion of early innate immune response by 2'-O-methylation of dengue genomic RNA. **Virology**, [S. l.], v. 499, p. 259, 2016. DOI: 10.1016/J.VIROL.2016.09.022. Disponível em: /pmc/articles/PMC7172056/. Acesso em: 8 set. 2021.

CHOUIN-CARNEIRO, Thaís et al. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of Aedes aegypti and Aedes albopictus Vectors. **Biological Control of Pest and Vector Insects**, [S. l.], 2017. DOI: 10.5772/66946. Disponível em: https://www.intechopen.com/chapters/53702. Acesso em: 6 jul. 2023.

COELHO, Giovanini; JUNIOR, João. Sensibilidade do sistema de vigilância da dengue na detecção de casos hospitalizados pela doença, 2008-2013. [S. l.], 2014.

Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. [S. l.], 2011.

COSTA, Isabelle Matos Pinheiro; CALADO, Daniela Cristina. **Incidence of dengue cases (2007-2013) and seasonal distribution of mosquitoes (Diptera: Culicidae) (2012-2013) in Barreiras, Bahia, Brazil** Artigo originAl Incidência dos casos de dengue (2007-2013) e distribuição sazonal de culicídeos (2012-2013) em Barre. [S. l.], 2016. DOI: 10.5123/S1679-49742016000400007.

DA, Estado; SESAB, Bahia. Boletim Epidemiológico Arboviroses. [S. l.], p. 12–15, 2022.

DA SILVA NETO, Sebastião Rogério et al. Arboviral disease record data - Dengue and Chikungunya, Brazil, 2013–2020. **Scientific Data**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/S41597-022-01312-7. Disponível em: /pmc/articles/PMC9090806/. Acesso em: 19 mar. 2023.

DATTA, S.; WATTAL, C. Dengue NS1 antigen detection: A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection PMID: ****. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 107–117, 2010. DOI: 10.4103/0255-0857.62484. Disponível em: www.ijmm.org. Acesso em: 8 set. 2021.

DE ALMEIDA, Paula Maria Pereira et al. Dengue, Chikungunya, and Zika: Spatial and Temporal Distribution in Rio de Janeiro State, 2015–2019. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [S. l.], v. 7, n. 7, 2022. DOI: 10.3390/TROPICALMED7070141. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9318038/](https://pmc/articles/PMC9318038/). Acesso em: 19 mar. 2023.

DE TOLEDO, Ana Lucia Araujo; ESCOSTEGUY, Claudia Caminha; DE ANDRADE MEDRONHO, Roberto; DE ANDRADE, Flávia Coutinho. Reliability of the final dengue diagnosis in the epidemic occurring in Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2002. **Cadernos de Saude Publica**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 933–940, 2006. DOI: 10.1590/s0102-311x2006000500006.

DEJNIRATTISAI, Wanwisa et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature immunology**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 1102, 2016. DOI: 10.1038/NI.3515. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4994874/](https://pmc/articles/PMC4994874/). Acesso em: 8 mar. 2023.

DICK, Olivia Brathwaite et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 584, 2012. DOI: 10.4269/AJTMH.2012.11-0770. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3516305/](https://pmc/articles/PMC3516305/). Acesso em: 6 jul. 2023.

DUTRA, Karina Rocha et al. Molecular surveillance of dengue in Minas Gerais provides insights on dengue virus 1 and 4 circulation in Brazil. **Journal of medical virology**, [S. l.], v. 89, n. 6, p. 966–973, 2017. DOI: 10.1002/JMV.24729. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27926790/>. Acesso em: 18 mar. 2023.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 65, n. 5, p. 2467, 1991. Disponível em: [/pmc/articles/PMC240601/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC240601/?report=abstract). Acesso em: 8 set. 2021.

FAUZIAH, M. D KASSIM et al.. Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection. [S. l.], 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51251472_Use_of_dengue_NS1_antigen_for_early_diagnosis_of_dengue_virus_infection. Acesso em: 8 set. 2021.

FENG, Zhilan; VELASCO-HERNÁNDEZ, Jorge X. Competitive exclusion in a vector-host model for the dengue fever. **Journal of Mathematical Biology**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 523–544, 1997. DOI: 10.1007/s002850050064.

FERGUSON, Neil; ANDERSON, Roy; GUPTA, Sunetra. The effect of antibody-dependent enhancement on the transmission dynamics and persistence of multiple-strain pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 790, 1999. DOI: 10.1073/PNAS.96.2.790. Disponível em: [/pmc/articles/PMC15215/](https://pmc/articles/PMC15215/). Acesso em: 28 out. 2021.

FLAMAND, Marie et al. Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 73, n. 7, p. 6104, 1999. Disponível em: /pmc/articles/PMC112675/. Acesso em: 8 set. 2021.

FRITSCH, Hegger et al. Retrospective Genomic Surveillance of Chikungunya Transmission in Minas Gerais State, Southeast Brazil. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 10, n. 5, 2022. DOI: 10.1128/SPECTRUM.01285-22. Disponível em: /pmc/articles/PMC9602355/. Acesso em: 23 mar. 2023.

GIOVANETTI, Marta et al. Emergence of Dengue Virus Serotype 2 Cosmopolitan Genotype, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 1725, 2022. DOI: 10.3201/EID2808.220550. Disponível em: /pmc/articles/PMC9328905/. Acesso em: 9 mar. 2023.

GONZÁLEZ, Daniel; MARTÍNEZ, Raiza; CASTRO, Osvaldo; SERRANO, Teresita; PORTELA, Daniel; VAZQUEZ, Susana; KOURÍ, Gustavo; GUZMÁN, María G. **Evaluation of Some Clinical, Humoral and Imagenological Parameters in Patients of Dengue Haemorrhagic Fever Six Months after Acute Illness** *Dengue Bulletin*. [s.l: s.n.].

GOULD, EA; SOLOMON, T. **Pathogenic flaviviruses** *The Lancet*, 2008. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60238-X.

GUIMARÃES CASALI, Clarisse et al. The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 296–299, 2004. DOI: 10.1590/s0037-86822004000400002.

GULATI, Sameer; MAHESHWARI, Anu. Atypical manifestations of dengue. **Tropical Medicine & International Health**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1087–1095, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2007.01891.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3156.2007.01891.x>. Acesso em: 29 mar. 2021.

GUTSCHE, Irina et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 108, n. 19, p. 8003, 2011. DOI: 10.1073/PNAS.1017338108. Disponível em: /pmc/articles/PMC3093454/. Acesso em: 8 set. 2021.

GUZMAN, Maria G.; HARRIS, Eva. Seminar Dengue. **The Lancet**, [S. l.], v. 370, p. 1644–1652, 2014. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9. Disponível em: www.thelancet.com. Acesso em: 18 out. 2019.

HALES, Simon; WET, Neil De; MAINDONALD, John; WOODWARD, Alistair. Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever : an empirical model. [S. l.], p. 1–5, 2002.

HARAPAN, Harapan; MICHIE, Alice; SASMONO, R. Tedjo; IMRIE, Allison. Dengue: A Minireview. **Viruses**, [S. l.], v. 12, n. 8, 2020. DOI: 10.3390/V12080829. Disponível em: /pmc/articles/PMC7472303/. Acesso em: 19 set. 2021.

HOLMES, Edward C.; TWIDDY, S. Susanna. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 3, p. 19–28, 2003. DOI: 10.1016/S1567-1348(03)00004-2.

IVANYI-NAGY, Roland; LAVERGNE, Jean-Pierre; GABUS, Caroline; FICHEUX, Damien; DARLIX, Jean-Luc. RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 712, 2008. DOI: 10.1093/NAR/GKM1051. Disponível em: /pmc/articles/PMC2241907/. Acesso em: 6 set. 2021.

KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 772, 2013. DOI: 10.1093/MOLBEV/MST010. Disponível em: /pmc/articles/PMC3603318/. Acesso em: 18 mar. 2023.

KATZELNICK, Leah C. et al. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 369, n. 6507, p. 1123, 2020. DOI: 10.1126/SCIENCE.ABB6143. Disponível em: /pmc/articles/PMC8274975/. Acesso em: 23 mar. 2023.

LANTERI, Marion C.; BUSCH, Michael P. **Dengue in the context of “safe blood” and global epidemiology: To screen or not to screen?** Transfusion, 2012. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03747.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2012.03747.x>. Acesso em: 27 mar. 2021.

LARSSON, Anders. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 22, p. 3276, 2014. DOI: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU531. Disponível em: /pmc/articles/PMC4221126/. Acesso em: 18 mar. 2023.

LEQUIME, Sebastian; PAUL, Richard E.; LAMBRECHTS, Louis. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 5, 2016. DOI: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005548. Disponível em: /pmc/articles/PMC4865232/. Acesso em: 6 jul. 2023.

LIBRATY, Daniel H. et al. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], p. 1861165–1861173, 2002. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/>. Acesso em: 9 set. 2021.

LIU, Lihui et al. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. **Frontiers in biology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 286, 2010. DOI: 10.1007/S11515-010-0660-Y. Disponível em: /pmc/articles/PMC3172701/. Acesso em: 8 set. 2021.

LOW, Jenny G. H. et al. The Early Clinical Features of Dengue in Adults: Challenges for Early Clinical Diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. e1191, 2011. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001191. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001191>. Acesso em: 29 mar. 2021.

LUO, Dahai et al. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3

protein. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 27, n. 23, p. 3209, 2008. DOI: 10.1038/EMBOJ.2008.232. Disponível em: /pmc/articles/PMC2599875/. Acesso em: 8 set. 2021.

LUPI, Omar; CARNEIRO, Carlos Gustavo; CASTELO, Ivo; COELHO, Branco. Mucocutaneous manifestations of dengue . **An Bras Dermatol**, [S. l.], v. 82, n. 4, p. 291–305, 2007.

LWANDE, Olivia Wesula et al. Globe-Trotting Aedes aegypti and Aedes albopictus: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 71, 2020. DOI: 10.1089/VBZ.2019.2486. Disponível em: /pmc/articles/PMC7041325/. Acesso em: 8 set. 2021.

MAIO, Federico A. De et al. The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 8, 2016. DOI: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005841. Disponível em: /pmc/articles/PMC5004807/. Acesso em: 8 set. 2021.

MALTA, Juliane Maria Alves Siqueira et al. Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika em municípios da Bahia, 2015. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 9–18, 2017. DOI: 10.5123/S1679-49742017000100002.

LOBO, Maria Raika Guimarães et al. **Citocinas na dengue: Inovações do Sistema Imune**. [S. l.], 2014. Disponível em: <http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2016/06/v3-n1-25-40-2014-.pdf>. Acesso em: 16 set. 2021.

MCKENNA, Kelli; BEIGNON, Anne-Sophie; BHARDWAJ, Nina. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 17, 2005. DOI: 10.1128/JVI.79.1.17-27.2005. Disponível em: /pmc/articles/PMC538703/. Acesso em: 18 set. 2021.

MENDONÇA, Francisco de Assis; SOUZA, Adilson Veiga e; DUTRA, Denecir de Almeida. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 257–269, 2009. DOI: 10.1590/s1982-45132009000300003.

MINH, Bui Quang et al. a. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 1530, 2020. DOI: 10.1093/MOLBEV/MSAA015. Disponível em: /pmc/articles/PMC7182206/. Acesso em: 18 mar. 2023.

MODIS YORGO et al. **Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion**. [S. l.], 2004. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1038/nature02165>. Acesso em: 6 set. 2021.

MORENO GLASSER, Carmen; DE CASTRO GOMES, Almério. Climate and the superimposed distribution of Aedes aegypti and Aedes albopictus on infestation of São Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Publica**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 166–172, 2002. DOI: 10.1590/s0034-89102002000200008. Disponível em: www.fsp.usp.br/rsp. Acesso em: 27 mar. 2021.

MUÑOZ-JORDÁN, Jorge L. et al. Highly sensitive detection of Dengue virus nucleic acid in samples from clinically ill patients. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 927–931, 2009. DOI: 10.1128/JCM.01564-08. Disponível em: <http://jcm.asm.org/>. Acesso em: 29 mar. 2021.

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. **Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control** **Medical Journal Armed Forces India** **Medical Journal Armed Forces India**, , 2015. DOI: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011. Disponível em: </pmc/articles/PMC4297835/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

NAVECA, Felipe Gomes et al. Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 3, 2019. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0007065. Disponível em: </pmc/articles/PMC6424459/>. Acesso em: 23 mar. 2023.

NOGUEIRA, Rita Maria R.; MIAGOSTOVICH, Marize P.; DE FILIPPIS, Ana Maria B.; PEREIRA, Maria Aparecida S.; SCHATZMAYR, Hermann G. Dengue Virus Type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 96, n. 7, p. 925–926, 2001. DOI: 10.1590/S0074-02762001000700007.

NUNES, Marcio Roberto Teixeira et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 102, 2015. DOI: 10.1186/S12916-015-0348-X. Disponível em: </pmc/articles/PMC4433093/>. Acesso em: 2 mar. 2023.

OHAINLE, Molly et al. Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics and Serotype-Specific Immunity HHS Public Access. **Sci Transl Med**, [S. l.], v. 3, n. 114, p. 114–128, 2011. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003084. Disponível em: www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/XXX/XXXraXX/DC1. Acesso em: 28 mar. 2021.

ORGANIZATION, Pan American Health. Dengue: guidelines for patient care in the Region of the Americas. 2. ed. **2nd Edition of the Dengue Guideline**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/31207>. Acesso em: 17 mar. 2023.

PAIXÃO, Enny S.; TEIXEIRA, Maria Gloria; RODRIGUES, Laura C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, [S. l.], v. 3, n. Suppl 1, 2018. DOI: 10.1136/BMJGH-2017-000530. Disponível em: </pmc/articles/PMC5759716/>. Acesso em: 23 mar. 2023.

PEREIRA GUSMÃO MAIA, Zuinara et al. Return of the founder Chikungunya virus to its place of introduction into Brazil is revealed by genomic characterization of exanthematic disease cases. **Emerging Microbes & Infections**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 53, 2020. DOI: 10.1080/22221751.2019.1701954. Disponível em: </pmc/articles/PMC6968431/>. Acesso em: 23 mar. 2023.

PEREZ, Freddy et al. The decline of dengue in the Americas in 2017: discussion of multiple hypotheses. **Tropical Medicine & International Health**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 442, 2019. DOI: 10.1111/TMI.13200. Disponível em: </pmc/articles/PMC6850595/>. Acesso em: 23 mar. 2023.

PERRET, Cecilia et al. Dengue infection during pregnancy and transplacental antibody transfer in Thai mothers. **Journal of Infection**, [S. l.], v. 51, p. 287–293, 2005. DOI: 10.1016/j.jinf.2004.10.003. Disponível em: [www.elsevierhealth.com/journals/jinf0163-4453/\\$30.00](http://www.elsevierhealth.com/journals/jinf0163-4453/$30.00). Acesso em: 8 set. 2021.

PESCARINI, Julia M. et al. Dengue, Zika, and Chikungunya viral circulation and hospitalization rates in Brazil from 2014 to 2019: An ecological study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 16, n. 7, 2022. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0010602. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9359537/](http://pmc/articles/PMC9359537/). Acesso em: 23 mar. 2023.

PMFS. Situação Epidemiológica dos Casos de Dengue, Zika e Chikungunya em Feira de Santana. [S. l.], v. 11, p. 3, 2020. Disponível em: www.feiradesantana.ba.gov.br. Acesso em: 19 mar. 2023.

QURESHI, N. K.; BEGUM, A.; SAHA, P. R.; HOSSAIN, M. I. Guillain-Barre syndrome following Dengue fever in adult patient. **Journal of Medicine (Bangladesh)**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 246–249, 2012. DOI: 10.3329/jom.v13i2.12772. Disponível em: <https://www.banglajol.info/index.php/JOM/article/view/12772>. Acesso em: 29 mar. 2021.

SAMSA, M. M.; MONDOTTE, J. A.; IGLESIAS, N. G.; BARBOSA-LIMA, Assunção-Miranda I. Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. **PLoS Pathog**, [S. l.], v. 5, n. 10, p. 1000632, 2009. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000632. Disponível em: <http://hhminews.org/research/scholars/>. Acesso em: 6 set. 2021.

SANTIAGO, Gilberto A. et al. Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 2311, 2013. DOI: 10.1371/annotation/ae27d48b-025f-47ce-8427-4af59f821ad7. Disponível em: www.cdc.gov/dengue. Acesso em: 29 mar. 2021.

SILVA, Mayara; GIL, Laura; OLIVEIRA, Renato. IMUNIDADE INATA AO VÍRUS DA DENGUE: UM ESTUDO DO INTERFERON DO TIPO I. [S. l.], 2013.

SINGHI, Sunit; KISSOON, Niranjana; BANSAL, Arun. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva. [S. l.], 2007. DOI: 10.2223/JPED.1622. Disponível em: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/>. Acesso em: 9 set. 2021.

SINGLETON, Martin R.; WIGLEY, Dale B. Modularity and Specialization in Superfamily 1 and 2 Helicases. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 184, n. 7, p. 1819, 2002. DOI: 10.1128/JB.184.7.1819-1826.2002. Disponível em: [/pmc/articles/PMC134918/](http://pmc/articles/PMC134918/). Acesso em: 8 set. 2021.

SOUSA RIBEIRO, Guilherme et al. Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue? [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30496-5. Disponível em: www.thelancet.com/lancetgh. Acesso em: 23 mar. 2023.

STEWART-IBARRA, Anna M.; LOWE, Rachel. Climate and Non-Climate Drivers of Dengue Epidemics in Southern Coastal Ecuador. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 88, n. 5, p. 971, 2013. DOI: 10.4269/AJTMH.12-0478. Disponível em:

/pmc/articles/PMC3752767/. Acesso em: 19 mar. 2023.

STICA, Caleb J. et al. Global Evolutionary History and Dynamics of Dengue Viruses Inferred from Whole Genome Sequences. **Viruses**, [S. l.], v. 14, n. 4, 2022. DOI: 10.3390/V14040703/S1. Disponível em: /pmc/articles/PMC9030598/. Acesso em: 23 mar. 2023.

STODDARD, Steven T. et al. House-to-house human movement drives dengue virus transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 3, p. 994–999, 2013. a. DOI: 10.1073/pnas.1213349110. Disponível em: /pmc/articles/PMC3549073/. Acesso em: 12 abr. 2021.

STODDARD, Steven T. et al. House-to-house human movement drives dengue virus transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 3, p. 994–999, 2013. b. DOI: 10.1073/pnas.1213349110. Disponível em: /pmc/articles/PMC3549073/. Acesso em: 27 mar. 2021.

SUSANA ORTIZ-BAEZ, Ayda et al. Origin, tempo, and mode of the spread of DENV-4 Genotype IIB across the state of São Paulo, Brazil during the 2012-2013 outbreak. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 114, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1590/0074-02760180251. Disponível em: <http://www.microbesonline.org/fasttree/>. Acesso em: 18 mar. 2023.

SWARBRICK, Crystall M. D. et al. NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. 22, p. 12904, 2017. DOI: 10.1093/NAR/GKX1127. Disponível em: /pmc/articles/PMC5728396/. Acesso em: 8 set. 2021.

TEIXEIRA, Maria da Glória. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cadernos de Saúde Pública**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1307–1315, 2005. DOI: 10.1590/s0102-311x2005000500002.

TEMPORÃO, José Gomes et al. **Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil** *Emerging Infectious Diseases*, 2011. DOI: 10.3201/eid1705.101681.

TEO, Catherine Su Hui; CHU, Justin Jang Hann. Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus Replication Complexes through Interaction with NS4A Protein. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 88, n. 4, p. 1897, 2014. DOI: 10.1128/JVI.01249-13. Disponível em: /pmc/articles/PMC3911532/. Acesso em: 8 set. 2021.

SOLOMON, Tom et al. **Neurological manifestations of dengue infection**. [S. l.], 2000. Disponível em: [https://sci-hub.se/10.1016/S0140-6736\(00\)02036-5](https://sci-hub.se/10.1016/S0140-6736(00)02036-5). Acesso em: 9 set. 2021.

VASILAKIS, Nikos et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews. Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 532, 2011. DOI: 10.1038/NRMICRO2595. Disponível em: /pmc/articles/PMC3321645/. Acesso em: 8 set. 2021.

VASILAKIS, Nikos; WEAVER, Scott C. **Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence** *Advances in Virus Research*, 2008. DOI: 10.1016/S0065-3527(08)00401-6.

VERDEAL, Juan Carlos Rosso et al. Recomendações para o manejo de pacientes com formas graves de dengue. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 125–133, 2011. DOI: 10.1590/s0103-507x2011000200004. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf. Acesso em: 29 maio. 2021.

VILLABONA-ARENAS, Christian Julián et al. Detection Of Four Dengue Serotypes Suggests Rise In Hyperendemicity In Urban Centers Of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 2, 2014. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0002620. Disponível em: </pmc/articles/PMC3937275/>. Acesso em: 18 mar. 2023.

VILLABONA-ARENAS, Christian Julian et al. Dengue Virus Type 3 Adaptive Changes during Epidemics in São Jose de Rio Preto, Brazil, 2006–2007. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 63496, 2013. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0063496. Disponível em: </pmc/articles/PMC3646734/>. Acesso em: 18 mar. 2023.

VILSKER, Michael et al. Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 871, 2019. DOI: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTY695. Disponível em: </pmc/articles/PMC6524403/>. Acesso em: 18 mar. 2023.

WEAVER, Scott C.; VASILAKIS, Nikos. Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 523, 2009. DOI: 10.1016/J.MEEGID.2009.02.003. Disponível em: </pmc/articles/PMC3609037/>. Acesso em: 17 mar. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **PAHO/WHO - Dengue Content**. 2009a. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=901&lang=en&limitstart=15&Itemid=101. Acesso em: 19 out. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control treatment, prevention and control treatment, prevention and control**. [s.l: s.n.]. Disponível em: www.who.int/tdr. Acesso em: 29 mar. 2021b.

XU, Ting. et al. Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4 Å. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 16, p. 10278, 2005. DOI: 10.1128/JVI.79.16.10278-10288.2005. Disponível em: </pmc/articles/PMC1182654/>. Acesso em: 8 set. 2021.

YAVARI NEJAD, Felestin; VARATHAN, Kasturi Dewi. Identification of significant climatic risk factors and machine learning models in dengue outbreak prediction. **BMC Medical Informatics and Decision Making**, [S. l.], v. 21, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/S12911-021-01493-Y. Disponível em: </pmc/articles/PMC8086151/>. Acesso em: 19 mar. 2023.

YON, Changsuek et al. Modulation of the Nucleoside Triphosphatase/RNA Helicase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Dengue Virus Type 2 Nonstructural Protein 3 (NS3) by

Interaction with NS5, the RNA-dependent RNA Polymerase *. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 29, p. 27412–27419, 2005. DOI: 10.1074/JBC.M501393200. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820567677/fulltext>. Acesso em: 8 set. 2021.

YOON, In Kyu et al. Fine scale spatiotemporal clustering of dengue virus transmission in children and aedes aegypti in rural Thai villages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 6, n. 7, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001730. Disponível em: </pmc/articles/PMC3398976/>. Acesso em: 27 mar. 2021.

YU, I. M. et al. Association of the pr Peptides with Dengue Virus at Acidic pH Blocks Membrane Fusion. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 83, n. 23, p. 12101, 2009. DOI: 10.1128/JVI.01637-09. Disponível em: </pmc/articles/PMC2786737/>. Acesso em: 6 set. 2021.

YU, I. et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. [S. l.], 2008. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1126/science.1153264>. Acesso em: 6 set. 2021.

ZAGO, Marco Antônio. A pesquisa clínica no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 363–374, 2004. DOI: 10.1590/s1413-81232004000200013.

ZHANG, Qian et al. The Stem Region of Premembrane Protein Plays an Important Role in the Virus Surface Protein Rearrangement during Dengue Maturation. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 48, p. 40525, 2012. DOI: 10.1074/JBC.M112.384446. Disponível em: </pmc/articles/PMC3504767/>. Acesso em: 6 set. 2021.

ZOU, Jing et al. Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 89, n. 7, p. 3455, 2015. DOI: 10.1128/JVI.03453-14. Disponível em: </pmc/articles/PMC4403404/>. Acesso em: 8 set. 2021.

Apêndice A - Capa do artigo com seguimento desse trabalho anteriormente publicado e disponível no PubMed. doi:10.3390/v15051073.



Article

Phylogenetic Reconstructions Reveal the Circulation of a Novel Dengue Virus-1V Clade and the Persistence of a Dengue Virus-2 III Genotype in Northeast Brazil

Hegger Fritsch ^{1,†} , Keldenn Moreno ^{1,†} , Italo Andrade Barbosa Lima ^{2,†}, Cleiton Silva Santos ², Bernardo Gratival Gouvea Costa ², Breno Lima de Almeida ², Ronald Alves dos Santos ², Marcos Vinicius Lima de Oliveira Francisco ² , Maria Paula Souza Sampaio ², Maricelia Maia de Lima ^{3,4} , Felicidade Mota Pereira ⁵ , Vagner Fonseca ⁶ , Stephane Tosta ¹, Joilson Xavier ¹ , Carla de Oliveira ⁷ , Talita Adelino ⁸, Arabela Leal e Silva de Mello ⁴, Tiago Gräf ⁹ , Luiz Carlos Junior Alcantara ^{10,*}, Marta Giovanetti ^{10,11}  and Isadora Cristina de Siqueira ^{2,*} 

Anexos A – Autorização para Publicação



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

CESSÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Teses, Dissertações e Trabalhos de Conclusão de Curso

Eu, ÍTALO ANDRADE BARBOSA LIMA, inscrito no CPF sob o nº 044.376.185-02 ou, se estrangeiro, portador do Passaporte nº _____, emitida pelo país _____, Autor(a) da obra intitulada EPIDEMIA DE DENGUE EM PEIRA DE SANTANA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES defendida como () Tese de Doutorado (x) Dissertação de Mestrado () Trabalho de Conclusão de Curso, em 19/05/2023 no programa de pós-graduação BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA da unidade técnico-científica: INSTITUTO GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ BAHIA sob orientação de: ISADORA CRISTINA DE SIQUEIRA, em consonância com a “Política de Acesso Aberto ao Conhecimento da Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz”:

(Marque somente uma das opções abaixo)

(x) CEDO e TRANSFIRO, total e gratuitamente, à FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, em caráter permanente, irrevogável e NÃO EXCLUSIVO, todos os direitos patrimoniais NÃO COMERCIAIS de utilização da obra artística e/ou científicas indicada acima, durante todo o prazo de duração dos direitos autorais, em qualquer idioma e em todos os países, de acordo com os Termos e Condições desta Cessão,

(x) imediatamente, a partir desta data

OU

() a partir de _____ meses a contar desta data.

() NÃO AUTORIZO o uso do TEXTO INTEGRAL da obra supracitada, em qualquer meio ou veículo, uma vez que a obra está em estudo de patenteamento ou sob sigilo; entretanto, CEDO e TRANSFIRO, gratuitamente, à FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, denominada CESSIONÁRIA, os direitos de disponibilização, comunicação ao público e qualquer utilização para fins não comerciais dos dados descritivos - autor, orientador, programa, título, ano, resumo - da obra, de acordo com os Termos e Condições desta Cessão.

Salvador, 19 de JULHO de 2023

Ítalo Andrade Barbosa Lima

Nome e Assinatura do(a) Autor(a)

Documento assinado digitalmente
gov.br ISADORA CRISTINA DE SIQUEIRA
Data: 20/07/2023 01:24:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Nome e Assinatura do(a) Orientador(a)

TERMOS E CONDIÇÕES

1 – DIREITOS CEDIDOS

A cessão total não exclusiva, permanente e irrevogável dos direitos autorais patrimoniais não comerciais de utilização de que trata este documento inclui, exemplificativamente, os direitos de disponibilização e comunicação pública da(s) obra(s), em qualquer meio ou veículo, inclusive em Repositórios Digitais, bem como os direitos de reprodução, exibição, execução, declamação, exposição, arquivamento, inclusão em banco de dados, preservação, difusão, distribuição, divulgação, empréstimo, tradução, inclusão em novas obras ou coletâneas, reutilização, edição, produção de material didático e cursos ou qualquer forma de utilização não comercial.

2 – AUTORIZAÇÃO A TERCEIROS

A cessão aqui especificada concede à FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ o direito de autorizar qualquer pessoa – física ou jurídica, pública ou privada, nacional ou estrangeira - acessar e utilizar amplamente a(s) OBRA(s), sem exclusividade, para quaisquer finalidades não comerciais, nos termos deste instrumento.

3 – USOS NÃO COMERCIAIS

Usos não comerciais são aqueles em que as obras são disponibilizadas gratuitamente, sem cobrança ao usuário e sem intuito de lucro direto por parte daquele que as disponibiliza e utiliza.

4 – NÃO EXCLUSIVIDADE

A não exclusividade dos direitos cedidos significa que tanto o AUTOR como a FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ ou seus autorizados poderão exercê-los individualmente de forma independente de autorização ou comunicação, prévia ou futura.

5 – DIREITOS RESERVADOS

Ficam reservados exclusivamente ao AUTOR os direitos morais sobre as obras de sua autoria e/ou titularidade, assim como os usos comerciais da(s) obra(s) incluídas no âmbito deste instrumento.

6 – AUTORIA E TITULARIDADE

O AUTOR declara ainda que a obra é criação original própria, responsabilizando-se integralmente pelo conteúdo e outros elementos que fazem parte da(s) obra(s), obrigando-se a indenizar terceiros por danos, bem como indenizar e ressarcir a FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ de eventuais despesas que vierem a suportar, em razão de qualquer ofensa a direitos autorais alheios, principalmente no que diz respeito a plágios e violações de direitos autorais.

7 - GRATUIDADE

A cessão dos direitos autorais de utilização da(s) obra(s) artística(s) e/ou intelectuais(s) listada(s) em anexo, conforme estabelecidos neste instrumento, será gratuita, não sendo devida qualquer remuneração, a qualquer título, ao autor e/ou titular.