



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara**



***Vigilância viral de dengue, zika e chikungunya em Araraquara, São Paulo***

**Ariane Fagotti Gusmão**

**Araraquara**

**2016**

ARIANNE FAGOTTI GUSMÃO

Vigilância viral de dengue, zika e chikungunya em Araraquara, São  
Paulo

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Análises Clínicas. Linha de pesquisa: Base Fisiopatológica das Doenças: Aspectos Moleculares, Celulares e Epidemiológicos, da Faculdade de Ciências farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia.

Orientador Prof. Dr. Adriano Mondini

Araraquara

2016

---

**G982v** Gusmão, Arianne Fagotti.  
Vigilância viral de dengue, zika e chikungunya em Araraquara, São Paulo / Arianne Fagotti Gusmão. – Araraquara, 2016.  
71 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Análises Clínicas.  
Linha de pesquisa: Base Fisiopatológica das Doenças: Aspectos Moleculares, Celulares e Epidemiológicos.

Orientador: Adriano Mondini.

1. Dengue. 2. Vírus da Zika. 3. Chikungunya. 4. Estudos epidemiológicos. 5. Arboviroses. I. Mondini, Adriano, orient. II. Título.

---

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara  
Vilma Bruna Mastelari Costa - CRB 8/10938

**CAPES: 33004030081P7**  
**Esta ficha não pode ser modificada**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Vigilância viral de dengue, zika e chikungunya em Araraquara, São Paulo

**AUTORA: ARIANNE FAGOTTI GUSMÃO**

**ORIENTADOR: ADRIANO MONDINI**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ADRIANO MONDINI  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. ROBERTA VIEIRA DE MORAIS BRONZONI  
Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Federal do Mato Grosso

Profa. Dra. DANILA VEDOVELLO DE JESUS  
Departamento de Biosistemas (Laboratório de Genética Molecular e Genômica) / Universidade Federal do ABC - UFABC

Araraquara, 13 de junho de 2016

## **AGRADECIMENTOS**

Quando iniciamos os agradecimentos, pensamos em agradecer muitas coisas que aconteceram, muitas pessoas que fizeram parte de tudo isso, mas acredito que o principal motivo de tudo isso ter sido possível foi a minha fé. Fé em Deus, na humanidade, na ciência, no conhecimento e tantas outras que passaria horas descrevendo-as. Portanto, inicio aqui meus agradecimentos a Deus. Pois, terminando meu curso de graduação pensei que só isso não bastava, não me senti satisfeita, pedi mais, queria mais, pensava em crescer profissionalmente e pessoalmente, foi quando ele agiu e tudo começou.

Iniciei minha busca por uma linha de pesquisa, me encantei logo pela Saúde Pública, foi quando encontrei o Prof. Dr. Adriano Mondini. Sendo assim, agradeço não por me aceitar, mas por me acolher, não só como orientador, mas como um amigo e me ajudar a crescer nesse meio.

Agradeço também por ter colocado em me caminho os professores Dr. Cléslei Fernando Zanelli e Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros que me mostraram que nada seria fácil, mas seria uma longa jornada e que para isso seria necessária superação.

Ao longo do tempo, conheci muitas pessoas e todas elas me ensinaram alguma coisa. Agradeço a todas, pois sem elas não seria possível tamanho aprendizado. Aos amigos do laboratório, por me ouvir inúmeras vezes e pelos cafezinhos da Jô. Ao Paulo, pela paciência em trabalhar comigo, me animando quando precisava e me fazendo rir das dificuldades. Ao Fábio e ao Gustavo por me acalmar quando precisei e não foram poucas vezes. Enfim, a todas as pessoas que

passaram e estão chegando ao laboratório, pois cada uma me ajudou de forma única. E aos amigos do departamento pelas parcerias e compreensão.

À minha família pela paciência que tiveram comigo e me ensinaram a ser quem sou. Ao meu pequeno Taylor que me fez ser forte e a minha mãe que nunca soltou as minhas mãos e me mostrou que ser mulher é superar desafios todos os dias.

Enfim, agradeço a Deus por ter enviado muitos anjos ao meu encontro e tornado tudo isso possível.

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

## RESUMO

A dengue é uma doença viral aguda transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, com grande impacto em saúde pública global. Além do dengue, os vírus Zika e Chikungunya, também transmitidos pelos mesmos vetores, têm gerado novas preocupações devido à sua rápida disseminação e complicações graves. Araraquara, cidade de médio porte, localiza-se na região central do estado de São Paulo e pode atuar como centro de convergência entre diversos municípios, configurando-se como um importante dispersor e receptor viral. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar molecular, temporal e espacialmente a presença de DENV, ZIKV e CHIKV em amostras clínicas de pacientes febris que procuraram os Serviços municipais de Saúde. Análises moleculares e geoespaciais foram realizadas entre 2015 e 2016 em pacientes febris que procuraram os serviços públicos de saúde de Araraquara, SP. Durante o período analisado, foram coletadas mais de 420 amostras de pacientes febris atendidos em Araraquara, sem diferença significativa entre os gêneros. A análise demográfica revelou predominância de jovens adultos, com maior concentração na faixa etária de 20 a 30 anos. Quanto à escolaridade, 34,57% dos pacientes possuíam ensino médio completo, e 72,81% pertenciam a famílias com renda entre 1 a 4 salários mínimos. As manifestações clínicas foram comuns entre as diferentes infecções. Laboratorialmente, foram observadas alterações hematológicas, como trombocitopenia e leucopenia, em 48% dos casos de dengue e 75% dos casos de zika. No total, 103 amostras testaram positivo para DENV, 18 para ZIKV e 1 para CHIKV em 2016. O diagnóstico clínico, a identificação dos sorotipos circulantes e a localização geográfica dos casos são fundamentais para uma vigilância ativa. Além disso, a análise espacial é crucial para implementar ações preventivas e mitigar os impactos epidemiológicos. As epidemias podem se disseminar rapidamente e se tornar endêmicas, tornando indispensáveis ferramentas de análise molecular e geoespacial, que oferecem dados valiosos para o monitoramento e controle eficaz das doenças.

**Palavras-chave:** dengue; zika; chikungunya; RT-PCR.

## ABSTRACT

Dengue is an acute viral disease transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus, with a significant global public health impact. In addition to dengue, the Zika and Chikungunya viruses, also transmitted by the same vectors, have raised new concerns due to their rapid spread and severe complications. Araraquara, a medium-sized city located in the central region of São Paulo state, can act as a convergence point between several municipalities, making it an important viral disperser and receptor. Therefore, the aim of this study was to analyze molecularly, temporally, and spatially the presence of DENV, ZIKV, and CHIKV in clinical samples from febrile patients who sought Municipal Health Services. Molecular and geospatial analyses were conducted between 2015 and 2016 on febrile patients attending public health services in Araraquara, SP. During the study period, more than 420 samples were collected from febrile patients, with no significant gender differences. Demographic analysis revealed a predominance of young adults, with the highest concentration in the 20–30 years age group. Regarding education, 34.57% of patients had completed high school, and 72.81% came from families with incomes between 1 and 4 minimum wages. Clinical manifestations were common among the different infections. Laboratory tests showed hematological alterations, such as thrombocytopenia and leukopenia, in 48% of dengue cases and 75% of Zika cases. In total, 103 samples tested positive for DENV, 18 for ZIKV, and 1 for CHIKV in 2016. Clinical diagnosis, identification of circulating serotypes, and geographic location of cases are essential for active surveillance. Additionally, spatial analysis is crucial for implementing preventive actions and mitigating epidemiological impacts. Epidemics can spread rapidly and become endemic, making molecular and geospatial analysis tools indispensable, as they provide valuable data for effective disease monitoring and control.

**Keywords:** dengue; zika; chikungunya; RT-PCR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem representando o vetor <i>Aedes aegypti</i> .....	12
Figura 2 - Imagem representando o vetor <i>Aedes albopictus</i> . ....	12
Figura 3 - Unidades da Federação com casos autóctones de febre pelo vírus zika com confirmação laboratorial, Brasil, 2015.....	15
Figura 4 - Localização de Araraquara no estado de São Paulo.....	19
Figura 5 - Base cartográfica de Araraquara, São Paulo.....	24
Figura 6 - Distribuição dos pacientes febris de acordo com a faixa etária em Araraquara,2016.....	27
Figura 7 - Distribuição das manifestações clínicas em casos febris suspeitos e/ou confirmados para DENV e ZIKV.....	31
Figura 8 - Representação de um gel de agarose (1%) realizado com marcador molecular de 100 pares de base (pb) representado por “M”. Foi utilizado controle negativo (C-) e controle positivo (C+) para o sorotipo 1 de dengue (DENV-1) com amplificação na altura de 472pb.....	33
Figura 9 - Representação de um gel de agarose (1%) realizado com marcador molecular de 100 pares de base (pb) representado por “M”, controle negativo (C-) e controle positivo para DENV-1 (C+). Observa-se que uma amostra apresentou amplificação compatível com DENV-4, na altura de 222pb.....	33
Figura 10 - Representação cartográfica do município de Araraquara - SP apresentando a distribuição dos casos febris notificados em 2016.....	35
Figura 11 - Representação cartográfica dos casos positivos para DENV e ZIKV no município de Araraquara - SP em 2016.....	36
Figura 12 - Representação cartográfica do município de Araraquara - SP, 2016 apresentando a distribuição dos casos positivos para DENV de janeiro a abril.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers espécie-específicos utilizados no estudo.....	21
Tabela 2 - Distribuição percentual da escolaridade entre pacientes febris em Araraquara.....	28
Tabela 3 - Distribuição por renda familiar média dos pacientes febris em Araraquara, 2016.....	30
Tabela 4 - Distribuição do número de amostras analisadas e casos positivos para arbovírus (2015–2016).....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

RNA	Do inglês “Ribonucleic acid”
CHKV	Vírus Chikungunya
nsP	Proteínas não estruturais do CHKV
C	Proteínas estrutural do capsídeo
E	Proteína estrutural do envelope
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
ZIKV	Vírus Zika
UTRs	Do inglês “Untranslated Regions”
prM	Proteína estrutural da pré-membrana
NS	Proteínas não estruturais da família <i>Flaviviridae</i>
DENV	Vírus do Dengue
OMS	Organização Mundial da Saúde
SP	São Paulo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
UMED	Unidade Médica de Diagnóstico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
RT	Reverse Transcriptase
PCR	Polymerase Chain Reaction
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. OBJETIVOS .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1 LOCAL DE ESTUDO .....	19
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E DADOS .....	19
3.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL .....	20
3.4 PRIMERS.....	20
3.5 RT-PCR PARA DETECÇÃO DO DENV E ZIKV .....	21
3.6 PCR PARA DETECÇÃO DO DENV E ZIKV .....	22
3.7 NESTED-PCR.....	22
3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	22
3.9 GEOPROCESSAMENTO .....	23
3.10 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	25
3.11 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS .....	26
4. RESULTADOS .....	27
5. DISCUSSÃO .....	40
6. CONCLUSÕES .....	47
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A - CASE REPORT.....	58

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral aguda transmitida por mosquitos hematófagos a hospedeiros vertebrados. Trata-se de uma das doenças virais de maior impacto em saúde pública global. Nas últimas décadas, observou-se um aumento expressivo na sua incidência, impulsionado por fatores antropogênicos. Apesar das subnotificações, estimativas indicam que cerca de 390 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente, das quais aproximadamente 96 milhões desenvolvem formas sintomáticas da doença, enquanto cerca de 294 milhões permanecem assintomáticas ou com manifestações clínicas leves, contribuindo para a circulação viral. (1-4)

Considerada uma doença negligenciada, a dengue continua sendo um dos maiores desafios de saúde pública mundial, com epidemias significativas ocorrendo globalmente. Até 2018, foram registrados surtos em mais de 120 países, sendo considerada endêmica em regiões da Ásia, América do Sul, África e Oceania. Sua disseminação está diretamente relacionada a fatores ambientais e socioeconômicos, como o aquecimento global e urbanização descontrolada. (1)

Nas Américas, a dengue apresenta-se amplamente distribuída, causando epidemias recorrentes. A circulação simultânea dos quatro sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) na região pode contribuir para o desenvolvimento de formas graves da doença, como a dengue hemorrágica e síndrome do choque do dengue (5). A América do Sul apresenta um cenário particularmente complexo em relação à dengue, sendo uma das regiões mais afetadas no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), o Brasil, Argentina, Venezuela e Paraguai foram alguns dos países que mais registraram casos entre 2015 e 2018. O Brasil, em particular, tem sido um dos países com maior incidência, responsável por mais de 1,5 milhões de casos de dengue em 2018. (1,5,6)

As epidemias de dengue no Brasil ocorrem em ciclos, com picos de incidência em anos alternados. A alta densidade populacional, falta de políticas públicas consistentes, infraestrutura deficiente de saneamento básico, urbanização desordenada e as condições ambientais favoráveis à proliferação do vetor explicam

em parte esse cenário. A resistência crescente do *Aedes aegypti* aos inseticidas também é um fator que impacta o controle da doença. (6)

A transmissão do vírus do dengue (DENV) ocorre através do repasto sanguíneo de mosquitos do gênero *Aedes* a hospedeiros vertebrados. O *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor, encontrado principalmente em ambientes urbanos, é amplamente distribuído em cidades de pequeno, médio e grande porte. Enquanto os mosquitos *Aedes albopictus* são comumente encontrados em áreas semi-urbanas e de matas, aparecendo como um vetor secundário. Porém, sabe-se que esta espécie já expandiu seu território em mais de 40% em todo o mundo. (7-8)

**Figura 1:** *Aedes aegypti*.



**Fonte:** Agência Pará – Instituto Oswaldo Cruz, Evandro Chagas e Pasteur.

**Figura 2:** *Aedes albopictus*



**Fonte:** Agência Brasil – Cada minuto

O vírus do dengue (DENV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, distribuído em quatro sorotipos antígenicamente distintos (DENV-1 a DENV-4).

Possui características esféricas com cerca de 50nm de diâmetro, com um genoma de aproximadamente 11kb. É um vírus RNA de polaridade positiva que traduz três proteínas estruturais, capsídeo (C), precursor de membrana (prM) e envelope (E), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (9-11)

O sorotipo DENV-1 foi inicialmente identificado em 1943 na Polinésia Francesa e no Japão. A partir do final da década de 1950, sua presença foi se tornando mais frequente na Ásia. Nas Américas, o DENV-1 só foi reportado a partir de 1977, com detecção inicial em diversos países do Caribe e América do Sul. Desde então, houve um aumento constante na incidência, com destaque para a circulação contínua em países como Brasil, México e Porto Rico. O maior número de notificações foi realizado nos períodos de 2005 e 2006, em grande parte impulsionada pela alta incidência na região das Américas. (12-14)

A presença do sorotipo 2 nas Américas foi identificada inicialmente em 1953, em Trinidad e Tobago. No entanto, a circulação contínua do vírus só se estabeleceu a partir do final dos anos 1960 e início da década de 1970, com destaque para Porto Rico como um dos primeiros focos persistentes. A partir de então, a disseminação do DENV-2 aumentou progressivamente em diversos países da América do Sul, com registros no Brasil desde 1984, que passaram a representar uma proporção significativa dos casos globais. Na década de 1990, observou-se um crescimento na ocorrência de casos graves de febre hemorrágica do dengue (FHD), o que possivelmente está relacionado à substituição do genótipo americano do DENV-2 por uma variante asiática de maior virulência. Esse evento pode ter contribuído para o aumento dos registros do sorotipo na região. (15-18)

O sorotipo DENV-3 foi detectado pela primeira vez em 1953 nas Filipinas e na Tailândia, permanecendo ativo na Ásia desde 1962. A Tailândia, em especial, manteve notificações constantes entre 1973 e 2010, com maior disseminação entre 1999 e 2002. (15-18)

Outros países asiáticos, como Malásia e Indonésia, também relataram presença frequente do DENV-3 desde os anos 1970, e o Sri Lanka a partir da década seguinte. Desde meados dos anos 1990, a China, Vietnã, Camboja e

Cingapura registram o sorotipo de maneira relativamente consistente. Nas Américas, o primeiro registro ocorreu em Porto Rico em 1963, com notificações até 1978 e, posteriormente, de 1994 a 2008, devido à introdução de um novo genótipo originado da Ásia. Outros países americanos começaram a notificar casos predominantemente entre o fim dos anos 1980 e início dos 2000, com surtos relevantes no Brasil em meados da década de 2000. (15-18)

Assim como o DENV-3, o DENV-4 foi inicialmente identificado no mesmo ano nas Filipinas e na Tailândia. A Tailândia apresentou registros mais constantes, especialmente entre 1999 e 2002, enquanto o Sri Lanka notificou casos desde 1978 com recorrência quase que anual. Embora a consistência das notificações varie entre os países, houve maior frequência de relatos na Indonésia, Índia, Mianmar e Polinésia Francesa em períodos específicos. Nas Américas, os primeiros registros ocorreram apenas em 1981, com casos confirmados no Brasil. Desde então, o DENV-4 tem sido detectado anualmente. (15-18)

Além do DENV, o Zika vírus (ZIKV), também pertencente à família *Flaviviridae* ganhou destaque nos últimos anos. Semelhante a outros *Flavivirus*, seu genoma apresenta duas regiões não traduzidas (5' e 3' – UTR) que flanqueiam uma fase de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frame*) em que são codificadas as proteínas estruturais capsídeo (C), pré-membrana (prM), envelope (E) e as proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Seu genoma apresenta baixa similaridade com outros *Flavivirus* humanos patogênicos: 58,1% a 58,9% com DENV-2 e 68,3% a 69% com *Spondweni vírus*. (19-20)

Identificado pela primeira vez em 1947, em primatas sentinelas na floresta Zika, em Uganda, circulou por décadas de forma esporádica, com impacto clínico limitado em regiões da África e do Sudeste Asiático. Somente em 2007, foi registrada a primeira epidemia na Ilha de Yap, Micronésia. A partir de então, o ZIKV demonstrou uma capacidade notável de expansão geográfica, culminando em sua introdução nas Américas a partir de 2014, com transmissão autóctone confirmada no Brasil em 2015. (21-26)

A rápida disseminação do vírus no território brasileiro e em outros países do continente resultou em um número expressivo de casos sintomáticos e

assintomáticos, afetando principalmente regiões tropicais e subtropicais. O Brasil tornou-se o epicentro da epidemia global de Zika, responsável por grande parte dos casos notificados entre 2015 e 2016. Até dezembro de 2015, 18 Unidades da federação confirmaram casos autóctones de Zika (Figura 3). (27-28)

**Figura 3:** Unidades da Federação com casos autóctones de febre pelo vírus zika com confirmação laboratorial, Brasil, 2015.



**Fonte:** SINAN (Ministério da Saúde, 2016).

Além do impacto clínico clássico do ZIKV, caracterizado por quadro febril leve, exantema, conjuntivite e artralgia, a epidemia no Brasil revelou manifestações neurológicas associadas à infecção, como a síndrome de *Guillain-Barré* em adultos e, de maneira particularmente alarmante, casos de microcefalia e outras malformações congênitas em recém-nascidos de mães infectadas durante a gestação. Essas evidências levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar, em fevereiro de 2016, uma Emergência de Saúde Pública de Importância mundial. (28-30)

Assim como o ZIKV, o vírus Chikungunya (CHIKV) se destacou em meio às epidemias de dengue nos últimos anos. Embora transmitido pelo mesmo vetor, pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, e possui cerca de 60 a 70 nm de diâmetro. Assim como o DENV, trata-se de um vírus de RNA de cadeia simples, com polaridade positiva e genoma de aproximadamente 11,7 kb (35), que codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1 a nsP4) e três estruturais (C, E1 e E2). (31)

Historicamente, o CHIKV foi identificado pela primeira vez em 1952, durante um surto na Tanzânia. Durante décadas, sua circulação esteve restrita a regiões da

África e da Ásia. No entanto, a partir de 2004, iniciou-se uma expansão com surtos recorrentes em diversas regiões tropicais e subtropicais, incluindo as Américas, após sua introdução no Caribe em 2013. (32,33)

O Brasil confirmou os primeiros casos autóctones de febre Chikungunya em 2014. Desde então, o país tornou-se uma das regiões mais afetadas pelas epidemias, contribuindo significativamente com o crescente número de notificações na América do Sul. A ampla distribuição do *Aedes aegypti*, a elevada densidade populacional urbana e a circulação simultânea de outros arbovírus criaram um cenário propício para a rápida disseminação do CHIKV. (34-36)

A persistência do vírus no território brasileiro também se reflete em surtos localizados e em casos de infecção crônica, com impactos diretos sobre o sistema de saúde pública, especialmente em regiões Norte e Nordeste. Além disso, a sobreposição de epidemias de CHIKV com outras arboviroses impõe desafios diagnósticos e terapêuticos importantes, exigindo vigilância epidemiológica contínua e estratégias integradas de controle vetorial. (37 - 39)

Com epidemias cada vez mais intensas e dificuldades persistentes no controle dos vetores, áreas urbanas de médio porte tornam-se imprescindíveis no estudo epidemiológico do DENV, ZIKV e CHIKV. (39-40)

A emergência e disseminação de arbovirus, como dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV), representam desafios importantes para a saúde pública mundial. A circulação simultânea desses vírus em áreas urbanas tem implicações complexas, incluindo aumento da morbidade, sobrecarga dos sistemas de saúde e dificuldades no controle vetorial. Estudos indicam que a circulação viral simultânea pode resultar em viremias mais intensas e outras alterações imunológicas, potencializando manifestações clínicas graves e complicações, como a síndrome de *Guillain-Barré*. (39-42)

No contexto brasileiro, as cidades de médio porte desempenham um papel crucial na dinâmica dessas epidemias. Estudos realizados nas cidades de São José do Rio Preto e Araraquara destacam a correlação entre o aumento das incidências de dengue e os períodos de maior pluviosidade, bem como as infestações pelo vetor *Aedes aegypti*. Além disso, foi registrado um pico significativo de notificações,

incluindo casos graves, na cidade de Araraquara em 2015. A compreensão da epidemiologia da dengue em cidades de médio porte tem impacto significativo em outras arboviroses transmitidas pelo mesmo vetor. (43-44)

A mobilidade populacional, tanto voluntária quanto forçada, aumenta o risco de introdução e disseminação de novos arbovírus ou cepas mais resistentes, exacerbando os desafios enfrentados por essas cidades. A interação entre fatores ambientais, sociais e econômicos contribui para a vulnerabilidade dessas áreas, tornando-as focos críticos para a implementação de estratégias integradas de vigilância, controle vetorial e educação em saúde. (45)

Araraquara, por localizar-se na região central do estado de São Paulo e atuar como centro de convergência entre diversos municípios, pode configurar-se como um importante dispersor e receptor viral. Além disso, teve um aumento significativo dos casos de dengue a partir de 2005 (44). Sendo assim, a realização da vigilância viral se faz necessária para compreensão dos fatores associados à dispersão viral e epidemiologia do DENV, ZIKV e CHIKV.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi analisar molecular, temporal e espacialmente a presença de DENV, ZIKV e CHIKV em amostras clínicas de pacientes febris que procuraram os Serviços de Saúde de Araraquara.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar áreas críticas para a transmissão de dengue;
- Identificar o sorotipo de DENV circulando predominantemente na cidade de Araraquara (SP).
- Avaliar alterações hematológicas em casos positivos para o DENV, ZIKV e CHIKV.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi conduzido no município de Araraquara, com área territorial de 1.003,625 km<sup>2</sup> está localizado na região central do estado de São Paulo, a aproximadamente 270 km da capital. Em 2015, o município apresentava uma população estimada de 226.508 habitantes e, segundo dados de 2010, um Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de 0,815. (Figura 4).

**Figura 4:** Localização de Araraquara no estado de São Paulo



**Fonte:** Laboratório de Saúde Pública (FCF/UNESP).

#### 3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E DADOS

Pacientes febris que procuraram as Unidades de Saúde do município de Araraquara, entre 2015 e 2016, com suspeita clínica de infecção pelos vírus DENV ou ZIKV foram encaminhados para coleta de sangue ou urina na Unidade Médica de

Diagnóstico (UMED). As coletas foram realizadas por membros do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCF/UNESP). Quando o deslocamento até a UMED não era possível, a coleta foi efetuada pela equipe de enfermagem das Unidades de Saúde da Família, sendo as amostras posteriormente recolhidas por profissionais do referido laboratório. Durante a coleta, foi aplicado um inquérito epidemiológico com o objetivo de obter informações sobre a evolução clínica da infecção, dados sociodemográficos e endereço do paciente. Nos casos em que a coleta foi realizada nas Unidades de Saúde da Família, apenas o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi solicitado e não houve aplicação do inquérito epidemiológico.

### 3.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

O RNA viral foi extraído a partir de 140 µl das amostras clínicas (soro/urina), utilizando o *Qiamp Viral RNA Kit* (QIAGEN, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.4 PRIMERS

Os *primers* utilizados para detecção do DENV e ZIKV se ligam a regiões do gene da proteína NS5 conforme especificações da tabela 1.

**Tabela 1:** Primers espécie-específicos utilizados no estudo.

<b>Primers espécie-específicos</b>			
NDEN1 (-)	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472pb	Bronzoni et al., 2005
NDEN2 (-)	GAACCAGTTTGGTDRTTTTCATCGCTGCC	316 pb	
NDEN3 (-)	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659 pb	
NDEN4 (-)	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222 pb	
NZIKV (+)	GGATGACCACTGAGGACATG	315 pb	Metodologia não publicada

**Fonte:** elaborado pela própria autora

### 3.5 RT-PCR PARA DETECÇÃO DO DENV E ZIKV

A metodologia de RT-PCR utilizada neste estudo foi descrita por Bronzoni et al.<sup>42</sup>, baseada na amplificação do gene da proteína NS5. A reação de RT-PCR foi composta por 8 µL da amostra de RNA, 4 µL de solução tampão 5× (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,4 µL de DTT (dithiothreitol) a 0,1 M, 1 µL de primer FG2 a 15 pmol (para detecção de DENV) e do primer R\_zikNS5 (para ZIKV), 1,6 µL de uma mistura contendo 250 µM de cada dNTP (trifosfato de desoxirribonucleotídeo), 20 U de inibidor de RNase (RNaseOUT – Invitrogen, EUA), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript II Reverse Transcriptase – Invitrogen, EUA) e água livre de RNase para completar o volume final de 20 µL. A mistura foi incubada a 50 °C por 50 minutos e a 70 °C por 15 minutos. O ciclo térmico foi realizado em um termociclador Bio-Rad T100.

### 3.6 PCR PARA DETECÇÃO DO DENV E ZIKV

A reação de PCR foi composta por 8 µL de cDNA obtido na etapa de RT-PCR, 5 µL de solução tampão 10×, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 1 µL do primer FG1 (para detecção de DENV) ou 1 µL do iniciador F\_zikNS5 (para ZIKV), ambos a 15 pmol, 4 µL da mistura de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase e água livre de nucleases para completar o volume final de 50 µL. A reação foi submetida a um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, com uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 minutos. O ciclo térmico foi realizado em um termociclador Bio-Rad T100.

### 3.7 NESTED-PCR

Uma vez realizada a PCR para detecção gênero-específica, o Nested-PCR foi utilizado para detecção espécie-específica dos quatro sorotipos de dengue (DENV 1-4), e com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade do método diagnóstico utilizado de ambos os vírus.

### 3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, com a adição de 2 µL de carreador de amostra (BlueJuice – Invitrogen, EUA), 2 µL de corante fluorescente (GelRed™ – Uniscience) e 6 µL do produto amplificado. Para estimativa do tamanho dos fragmentos, foram utilizados 4 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (Kasvi).

### 3.9 GEOPROCESSAMENTO

O geoprocessamento dos endereços foi realizado com o auxílio das ferramentas do software ArcGIS 10.3 (ESRI), utilizando-se a base cartográfica do município de Araraquara, em projeção Universal Transversa de Mercator (UTM), com eixos viários fornecidos pela Prefeitura Municipal de Araraquara-SP (Figura 5). Os endereços foram ajustados à base de dados oficial com o objetivo de minimizar perdas durante o processo de geocodificação.

Assim, os endereços foram ajustados à base de dados oficiais, de forma a reduzir as possíveis perdas na geocodificação.

**Figura 5:** Base cartográfica de Araraquara, São Paulo.



**Fonte:** elaborado pela própria autora.

### 3.10 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os produtos da PCR foram purificados e submetidos ao sequenciamento automático no equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA), utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, EUA). A metodologia empregada baseia-se no método de terminação de cadeia automatizado descrito por Sanger et al. (1977).

Após o sequenciamento dos fragmentos de DNA, as sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas a sequências de DENV-1 selecionadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a construção filogenética, foi utilizado o método de Máxima Verossimilhança, o qual seleciona o filograma com maior probabilidade, de acordo com um modelo de evolução molecular.

Para a identificação dos genótipos das sequências obtidas a partir das amostras analisadas, foram utilizadas sequências com genótipos previamente determinados e descritos na literatura, também obtidas no GenBank (Quadro 2). O alinhamento múltiplo, com o objetivo de avaliar a homologia entre as sequências, foi realizado com o programa CLUSTAL W, integrado ao editor de sequências BioEdit (<https://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). O alinhamento resultante foi utilizado para a inferência filogenética por meio do método Neighbor-Joining, implementado no software MEGA 6.0 (<https://www.megasoftware.net/mega.php>).

### 3.11 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP (Protocolo 619.669/2014).

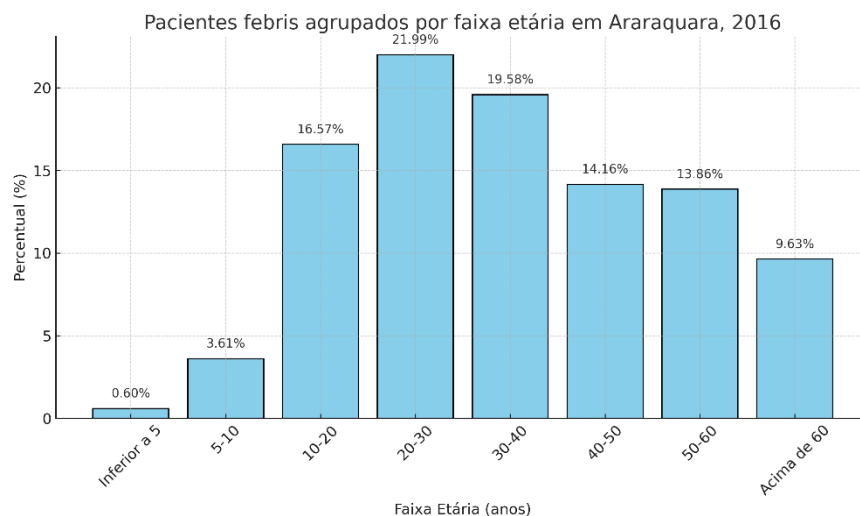
#### 4. RESULTADOS

Durante o período de estudo, mais de 420 amostras foram coletadas (2015 e 2016). Porém, não houve diferença significativa ( $p>0,99$ ) em relação ao gênero.

A análise da distribuição percentual da população por faixa etária revela um perfil demográfico predominantemente jovem-adulto, conforme pode ser observado na Figura 5. A maior proporção concentra-se na faixa de 20 a 30 anos, representando 21,99% do total. Este grupo é seguido pelas faixas de 30 a 40 anos (19,58%) e 10 a 20 anos (16,57%), evidenciando uma população majoritariamente composta por indivíduos em idade escolar, produtiva e economicamente ativa.

As faixas de 40 a 50 anos e 50 a 60 anos também apresentam participação expressiva, com 14,16% e 13,86%, respectivamente, reforçando o predomínio de adultos. A população com mais de 60 anos representa 9,63%, enquanto as faixas etárias mais jovens, inferior a 5 anos (0,60%) e 5 a 10 anos (3,61%), somam apenas 4,21%.

**Figura 6:** Distribuição dos pacientes febris de acordo com a faixa etária em Araraquara, 2016.



**Fonte:** elaborado pela própria autora.

A análise da escolaridade (Tabela 1) dos pacientes febris atendidos em Araraquara no ano de 2016 revela a prevalência significativa de indivíduos com ensino médio completo, correspondendo a 34,57% do total. Esse dado é seguido pela proporção de pacientes com ensino superior completo (22,63%) e ensino médio incompleto (11,11%), indicando que a maioria dos indivíduos atendidos possui ao menos o ensino médio.

As demais faixas de escolaridade apresentam percentuais menores: ensino superior incompleto (8,64%), 5º ao 9º ano incompleto (9,05%), e completo (6,17%). As categorias com menor representação são o 1º ao 4º ano incompleto (3,71%), completo (3,30%) e os que declararam não possuir escolaridade (0,82%).

Os dados evidenciam que os atendimentos febris em 2016 se concentraram majoritariamente em indivíduos com formação educacional a partir do ensino médio.

**Tabela 2:** Distribuição percentual da escolaridade entre pacientes febris em Araraquara. 2016

<b>Escolaridade</b>	<b>Percentual (%)</b>
1º ao 4º ano incompleto	3,71
1º ao 4º ano completo	3,30
5º ao 9º ano incompleto	9,05
5º ao 9º ano completo	6,17
Ensino Médio incompleto	11,11
Ensino Médio completo	34,57
Ensino Superior incompleto	8,64

<b>Escolaridade</b>	<b>Percentual (%)</b>
Ensino Superior completo	22,63
Não tem escolaridade	0,82
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

**Fonte:** elaborado pela própria autora.

A distribuição da renda familiar indica uma concentração significativa de pacientes nas faixas de 1 a 4 salários mínimos, que, somadas, representam 72,81% da população analisada. Esse dado evidencia a maior proporção de famílias de baixa renda atendidas nas unidades municipais de saúde.

A faixa de renda entre 2 a 4 salários mínimos concentra a maior frequência (39,17%), sugerindo que essa é a faixa modal da amostra. Já a parcela de famílias com renda superior a 7 salários mínimos corresponde a apenas 9,22%, denotando um estrato mais restrito de alta renda. Assim como, a proporção mínima de famílias com renda inferior a 1 salário mínimo (0,46%).

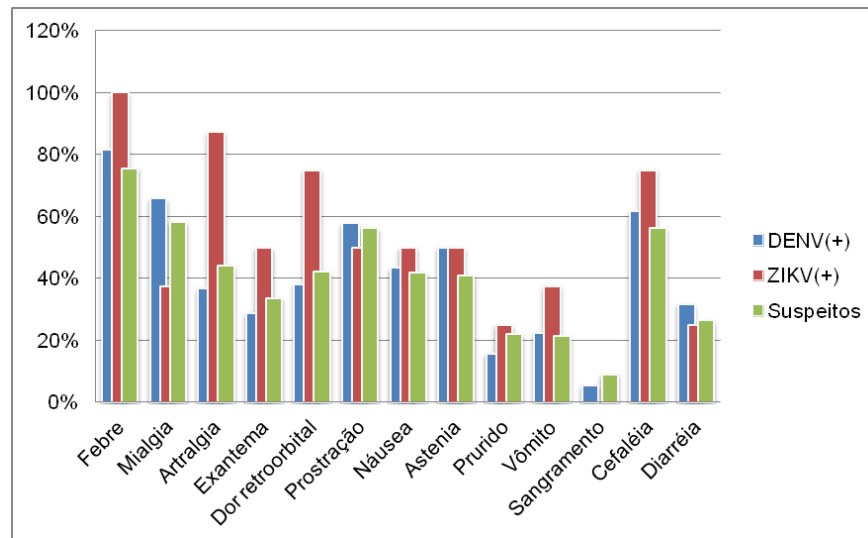
**Tabela 3:** Distribuição por renda familiar média dos pacientes febris em Araraquara, 2016.

<b>Faixa de Renda Familiar (em salários mínimos)</b>	<b>Percentual da População (%)</b>
Abaixo de 1	0,46%
1 a 2	33,64%
2 a 4	39,17%
4 a 7	17,51%
Acima de 7	9,22%
<b>Total</b>	<b>100%</b>

**Fonte:** elaborado pela própria autora.

Em relação às manifestações clínicas da coorte analisada, os relatos mais frequentes incluíram febre, mialgia, prostração, cefaleia, artralgia, dor retroorbital, náusea e astenia. Tais sintomas demonstram um padrão compatível com quadros virais agudos. Notavelmente, observou-se uma frequência elevada e intensidade acentuada dessas manifestações nos casos confirmados de infecção pelo ZIKV, conforme evidenciado na Figura 6.

**Figura 7:** Distribuição das manifestações clínicas em casos febris suspeitos e/ou confirmados para DENV e ZIKV.



**Fonte:** elaborado pela própria autora.

Nos casos de infecção por dengue, além das manifestações clínicas mais frequentemente relatadas, observou-se a presença de sintomas adicionais como tontura, tosse seca, dor lombar, odinofagia, parestesia em membros superiores, hipotensão arterial, cefaleia occipital, edema, calafrios, dispneia, hipertensão arterial, ardência ocular, sudorese e episódios de síncope.

Do ponto de vista laboratorial, considerando o hemograma como ferramenta amplamente utilizada na suspeita clínica de arboviroses, verificaram-se alterações hematológicas em 48% dos casos de dengue e em 75% dos casos de zika. As alterações mais recorrentes incluíram trombocitopenia, leucopenia e linfocitopenia, comuns a ambas as infecções. No entanto, é importante ressaltar que esse mesmo perfil hematológico foi identificado também em pacientes com resultados negativos para os arbovírus testados.

Durante os anos de 2015 e 2016, foram analisadas, ao todo, 423 amostras biológicas para realização da vigilância viral de infecções por arbovírus, conforme

descrito na Tabela 3. No ano de 2015, foram processadas 43 amostras, das quais 17 apresentaram resultado positivo para o vírus da dengue (DENV), e nenhuma positividade foi observada para Zika vírus (ZIKV) ou Chikungunya vírus (CHIKV). Já em 2016, houve um aumento expressivo no número de amostras submetidas à análise, totalizando 380, das quais 103 foram positivas para DENV, 18 para ZIKV e 1 para CHIKV.

Considerando o total do período avaliado, foram detectados 120 casos positivos para DENV. Com isso, é possível observar a predominância do vírus da dengue como o principal arbovírus circulante na região durante o período analisado.

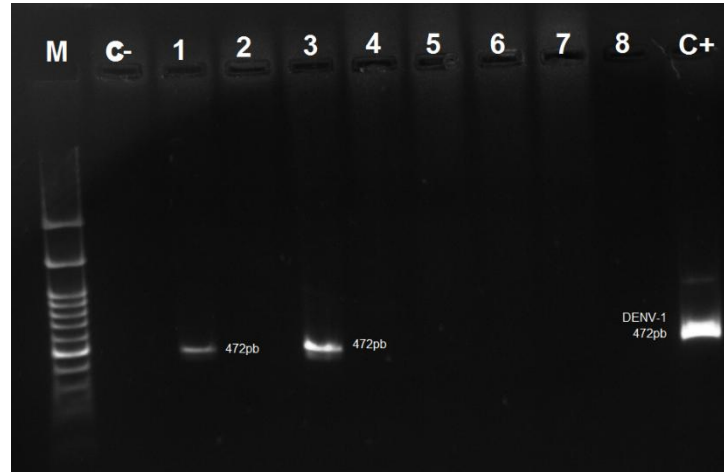
**Tabela 4:** Distribuição do número de amostras analisadas e casos positivos para arbovírus (2015–2016).

Ano	Nº de Amostras	DENV	ZIKV	CHIKV
2015	43	17	0	0
2016	380	103	18	1
<b>Total</b>	<b>423</b>	<b>120</b>	<b>18</b>	<b>1</b>

**Fonte:** elaborado pela própria autora.

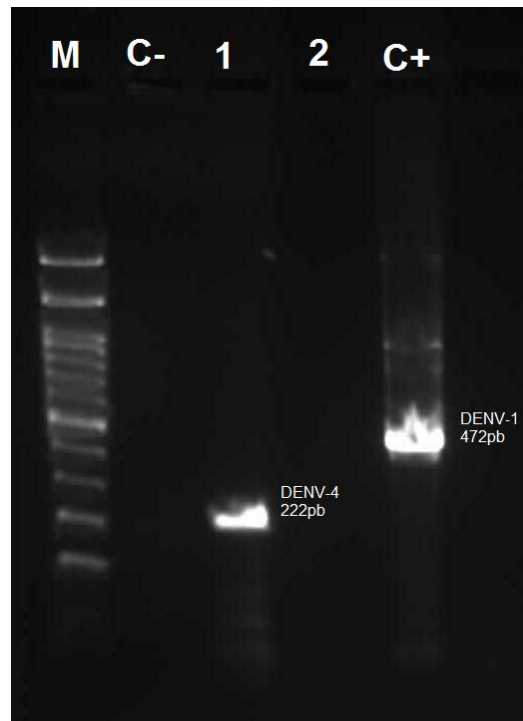
Dentre os casos de dengue, 119 correspondem ao sorotipo DENV-1 e apenas uma amostra foi positiva para o sorotipo DENV-4. A confirmação do sorotipo DENV-1 foi obtida por meio de eletroforese em gel, conforme ilustrado na Figura 7, onde as amostras positivas apresentaram bandas de amplificação em aproximadamente 472 pares de bases (pb), correspondentes ao fragmento característico do DENV-1. Enquanto na Figura 8 é possível observar o fragmento referente ao DENV-4 com aproximadamente 222pb.

**Figura 8:** Representação de um gel de agarose (1%) realizado com marcador molecular de 100 pares de base (pb) representado por "M". Foi utilizado controle negativo (C-) e controle positivo (C+) para o sorotipo 1 de dengue (DENV-1) com amplificação na altura de 472pb.



**Fonte:** elaborado pela própria autora.

**Figura 9:** Representação de um gel de agarose (1%) realizado com marcador molecular de 100 pares de base (pb) representado por "M", controle negativo (C-) e controle positivo para DENV-1 (C+). Observa-se que uma amostra apresentou amplificação compatível



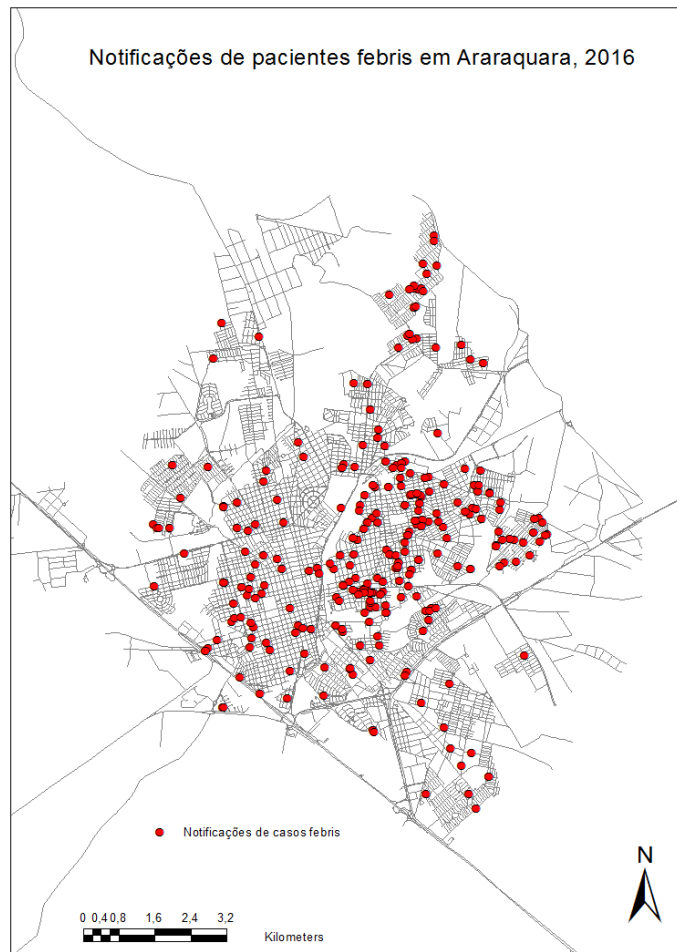
**Fonte:** elaborado pela própria autora.

Em relação ao Zika vírus (ZIKV), a infecção foi confirmada laboratorialmente em 18 pacientes. Ressalta-se que a extração do material genético foi realizada tanto em amostras de soro quanto de urina; no entanto, apenas uma amostra de urina apresentou resultado positivo para ZIKV.

A análise da distribuição espacial dos casos febris registrados no município de Araraquara revelou uma dispersão geográfica ampla, com ocorrência de casos em diversas regiões do território municipal, conforme ilustrado na Figura 9. Os casos confirmados de infecção por vírus da dengue (DENV) e Zika vírus (ZIKV), embora também distribuídos de forma relativamente difusa, apresentaram áreas com indícios de aglomeração espacial, sugerindo possíveis focos de transmissão ativa.

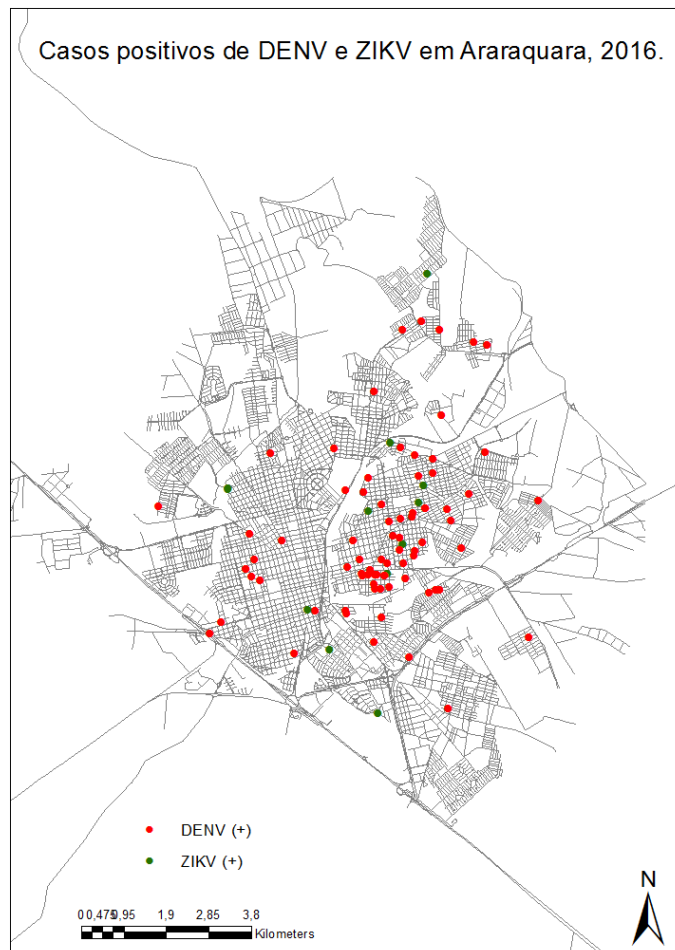
Observou-se, ainda, a presença de regiões com sobreposição da circulação dos dois arbovírus, ZIKV e DENV, conforme evidenciado na Figura 10.

**Figura 10:** Representação cartográfica do município de Araraquara - SP apresentando a distribuição dos casos febris notificados em 2016.



**Fonte:** elaborado pela própria autora.

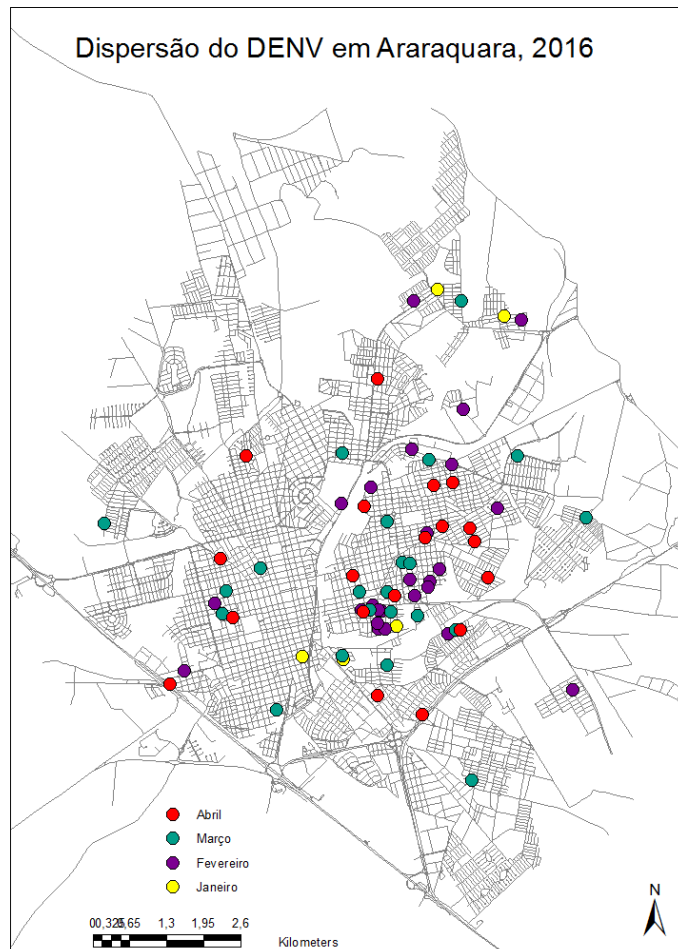
**Figura 11:** Representação cartográfica dos casos positivos para DENV e ZIKV no município de Araraquara - SP em 2016.



**Fonte:** elaborado pela própria autora.

A Figura 14 ilustra a progressão temporal e espacial dos casos confirmados de infecção por Zika vírus (ZIKV) e vírus da dengue (DENV) ao longo do ano de 2016 no município de Araraquara. Em janeiro, os casos confirmados estavam restritos a algumas regiões específicas do território municipal. Contudo, nos meses subsequentes — particularmente em fevereiro e março — observou-se uma expansão significativa da área de ocorrência, com dispersão dos casos por praticamente todo o município.

**Figura 12:** Representação cartográfica do município de Araraquara - SP, 2016 apresentando a distribuição dos casos positivos para DENV de janeiro a abril.



**Fonte:** elaborado pela própria autora.

Os resultados obtidos ao longo deste estudo evidenciam um panorama abrangente e multifacetado da ocorrência das arboviroses no município de Araraquara entre os anos de 2015 e 2016. A análise demográfica revelou que a população acometida foi majoritariamente composta por adultos jovens em idade produtiva, com distribuição equilibrada entre os gêneros. Do ponto de vista socioeconômico, observou-se que a maioria dos pacientes apresentava escolaridade

a partir do ensino médio completo e renda familiar entre 1 e 4 salários mínimos, indicando que os casos febris se concentraram em uma parcela da população com condições socioeducacionais medianas.

As manifestações clínicas relatadas foram compatíveis com quadros virais agudos, sendo a febre, mialgia, cefaleia, prostração e dor retroorbital os sintomas mais frequentes. Casos de ZIKV, em particular, apresentaram sintomas intensos e bem definidos, enquanto os casos de DENV se destacaram pela diversidade de sintomas, incluindo sinais neurológicos e cardiovasculares. A análise laboratorial revelou alterações hematológicas comuns entre os casos de dengue e zika — como trombocitopenia, leucopenia e linfocitopenia —, embora tais achados também tenham sido registrados em pacientes com testes negativos para arbovírus, o que ressalta a necessidade de critérios diagnósticos mais específicos.

Em relação à vigilância viral, foram analisadas 423 amostras. O DENV foi o arbovírus mais prevalente, com 120 casos confirmados, dos quais 119 foram atribuídos ao sorotipo DENV-1 e apenas um ao DENV-4. A infecção por ZIKV foi confirmada em 18 pacientes, e CHIKV em apenas um, apontando para a menor circulação destes vírus durante o período estudado.

A análise geoespacial permitiu visualizar uma ampla dispersão dos casos febris por todo o município, com áreas de aglomeração específicas para DENV e ZIKV. Observou-se ainda sobreposição da circulação desses vírus em determinadas regiões, o que reforça a complexidade epidemiológica. Temporalmente, os meses de fevereiro e março de 2016 concentraram o maior número de infecções confirmadas, com redução gradual a partir de abril.

De forma geral, os achados apresentados nesta seção contribuem para a caracterização epidemiológica, clínica, laboratorial e espacial das arboviroses na

população analisada, fornecendo subsídios relevantes para a formulação de estratégias de prevenção, diagnóstico e controle.

## 5. DISCUSSÃO

As notificações baseadas exclusivamente em critérios clínicos e alterações hematológicas, embora amplamente utilizadas na prática assistencial, mostraram-se insuficientes para a elucidação etiológica precisa dos quadros febris registrados no município de Araraquara durante o período analisado. Tal limitação compromete a acurácia do diagnóstico e restringe o entendimento sobre a real diversidade de arbovírus em circulação na região.

No presente estudo, foi possível confirmar laboratorialmente a presença de três importantes arbovírus — DENV, ZIKV e CHIKV —, além de identificar a co-circulação de dois sorotipos distintos de dengue (DENV-1 e DENV-4), evidenciando a complexidade do cenário epidemiológico local. A ausência de associação estatisticamente significativa entre gênero e infecção sugere uma distribuição equitativa entre os sexos. No entanto, observou-se maior incidência entre indivíduos em faixas etárias produtivas e pertencentes a estratos socioeconômicos mais vulneráveis, refletindo potenciais desigualdades no impacto das arboviroses sobre a população. Diante do exposto, ressalta-se que o perfil epidemiológico identificado neste estudo pode ser representativo de outros municípios brasileiros de médio porte, com características demográficas e socioeconômicas semelhantes.

A análise da distribuição percentual da população por faixa etária revela um perfil demográfico predominantemente jovem-adulto, com maior concentração nas faixas etárias de 20 a 40 anos. Esse padrão também pode ser observado em outros estudos que identificam a maior incidência de casos de dengue entre indivíduos de 20 a 59 anos, representando 38% dos casos em nível nacional. Além disso, a predominância de adultos jovens e economicamente ativos pode refletir fatores

como mobilidade urbana e exposição a ambientes propensos à proliferação do vetor.

(46)

Quanto à distribuição de renda familiar, verificou-se que 72,81% dos pacientes pertencem às faixas de 1 a 4 salários mínimos, evidenciando uma maior concentração entre famílias de baixa renda. Estudos indicam que populações com menor poder aquisitivo têm maior risco de ser acometido por dengue, devido a fatores como condições precárias de saneamento básico e maior exposição ao vetor. Além disso, a baixa renda também pode estar associada a dificuldades no acesso a serviços de saúde e na implementação de medidas preventivas eficazes.

(46)

Segundo estudos de Ferreira et al. (2018) e Mondini et al. (2007), áreas caracterizadas por condições socioeconômicas menos favorecidas tendem a apresentar maior número de notificações de casos de dengue. Esse padrão está associado à presença de fatores estruturais, como deficiências no saneamento básico, que favorecem a proliferação do vetor *Aedes aegypti*. Adicionalmente, elementos como a elevada densidade populacional e a ocupação urbana desordenada contribuem para a manutenção de ambientes propícios à transmissão viral. No entanto, os autores destacam que a influência desses fatores pode apresentar variações significativas dentro de um mesmo município, em função da heterogeneidade espacial e das particularidades de cada área urbana. (44,46)

Portanto, os dados apresentados ressaltam a importância de considerar fatores sociodemográficos, como idade, escolaridade e renda, na compreensão da epidemiologia da dengue. Esses elementos podem influenciar tanto a exposição ao vetor quanto o acesso e a adesão a medidas preventivas e terapêuticas, impactando diretamente na incidência e gravidade da doença. (44,46,47)

O diagnóstico exclusivo com base nas manifestações clínicas e nos parâmetros hematológicos pode comprometer a acuracidade das estatísticas de saúde. Durante epidemias em diversas regiões mundiais, observa-se uma variação nas manifestações clínicas entre populações com diferentes características genéticas humanas e virais. Essa diversidade pode impactar o potencial epidêmico dos arbovirus, em especial do DENV, além de alterar suas apresentações clínicas, resultando em uma ampla gama de sintomas e alterações de parâmetros laboratoriais. (48 - 49)

Alterações hematológicas, como trombocitopenia, leucopenia e linfocitopenia, são frequentemente observadas em casos de dengue. Contudo, é importante ressaltar que casos confirmados podem ocorrer sem alterações hematológicas, e tais pacientes não devem ser descartados do diagnóstico. (48-51)

A confirmação dos casos de dengue requer a utilização de métodos laboratoriais específicos, como a sorologia, a detecção da proteína não estrutural NS1 e a reação em cadeia da polimerase (PCR). A sorologia, baseada na detecção de anticorpos IgM e IgG, é indicada a partir do sétimo dia após o início dos sintomas clínicos, sendo fundamental para a acurácia diagnóstica em estágios mais avançados da infecção. No entanto, essa metodologia não permite a identificação dos sorotipos virais circulantes, limitando sua utilidade para a compreensão da dinâmica epidemiológica da doença nos municípios. Nesse contexto, técnicas moleculares, como a RT-PCR, são imprescindíveis para a caracterização dos sorotipos e para a vigilância epidemiológica mais precisa. (52-54)

A detecção da proteína viral NS1 é considerada uma ferramenta rápida e eficiente para o diagnóstico precoce da dengue, sendo indicada preferencialmente até o terceiro dia após o início dos sintomas clínicos. Contudo, assim como os testes

sorológicos, essa metodologia não permite a diferenciação entre os sorotipos do vírus, o que limita sua aplicabilidade no monitoramento da diversidade viral durante surtos epidêmicos. Outro aspecto relevante refere-se à sensibilidade do teste, que pode variar de acordo com a carga viral e o tempo de coleta da amostra. No presente estudo, foi observado que alguns pacientes inicialmente testados como negativos para DENV por meio da detecção de NS1 apresentaram confirmação da infecção viral por meio da amplificação do material genético via RT-PCR, evidenciando a importância da utilização de métodos moleculares complementares para aumentar a sensibilidade diagnóstica. (52-54)

Considerando a possibilidade de co-circulação de diferentes arbovírus durante epidemias de dengue, bem como a semelhança entre os quadros clínicos causados por esses agentes, destaca-se a relevância da realização de diagnóstico molecular como ferramenta essencial para a elucidação etiológica precisa. A sobreposição de sintomas entre infecções por dengue, Zika, Chikungunya e outros arbovírus pode comprometer o diagnóstico quando baseado exclusivamente em critérios clínicos e sorológicos. Em estudo realizado nos municípios de Sinop (Mato Grosso) e São José do Rio Preto (São Paulo), foi detectada a presença do vírus Mayaro durante um período epidêmico de dengue, evidenciando a circulação simultânea de diferentes arbovírus em regiões endêmicas. (55,56)

A circulação simultânea de dois sorotipos do vírus da dengue pode estar associada ao aumento da gravidade clínica dos casos, uma vez que infecções secundárias por sorotipos diferentes estão relacionadas a um maior risco de manifestações graves, devido ao fenômeno de amplificação dependente de anticorpos (ADE – *antibody-dependent enhancement*). No município de Araraquara, desde a ocorrência da primeira epidemia registrada em 2008, tem-se observado um

crescimento progressivo tanto na quantidade quanto na severidade dos casos notificados, acompanhado por epidemias de maior magnitude ao longo dos anos. (57)

O diagnóstico molecular configura-se como uma ferramenta essencial e dinâmica para a vigilância viral nos municípios, permitindo a detecção do vírus da dengue (DENV) em diferentes fluidos biológicos. Em pacientes com febre aguda, observou-se a presença de RNA viral em amostras de urina mesmo quando os resultados obtidos a partir do soro foram negativos. A detecção do genoma viral em urina tem se mostrado particularmente útil em casos nos quais a viremia já está em declínio, ampliando a janela de detecção diagnóstica. Estudos demonstram que a sensibilidade da confirmação da infecção por dengue por meio da técnica de qRT-PCR aumentou de 79,6% para 82,6% quando a análise foi realizada simultaneamente em amostras de urina e plasma coletadas após o quinto dia do início da febre, em comparação com a análise apenas em plasma. (58-60)

De maneira semelhante ao observado no município de Araraquara, aproximadamente 93% dos isolamentos virais realizados no Brasil nos anos de 2015 e 2016 foram positivos para o sorotipo 1 do vírus da dengue (DENV-1), evidenciando sua predominância no cenário nacional. O segundo sorotipo mais prevalente no período foi o DENV-4, reforçando a co-circulação de diferentes sorotipos em distintas regiões do país. (61)

A incidência de casos de dengue no Brasil tende a aumentar no início do ano, com maior concentração entre os meses de janeiro e maio, período que costuma ser seguido por uma redução progressiva. Esses surtos sazonais estão fortemente associados ao aumento da densidade populacional do vetor *Aedes aegypti*, favorecido por condições climáticas típicas desse período, como elevação da

temperatura e maior volume de chuvas. Assim como observado durante o período estudado em Araraquara, dados do Ministério da Saúde, informam que os picos de notificações registrados em 2016 ocorreram principalmente nos meses de fevereiro e março. (44,61,62,63,64,65)

O vírus Zika foi identificado no Brasil em 2015, e a magnitude completa da doença ainda permanece desconhecida. O Ministério da Saúde estima que o número de casos tenha variado entre 400 mil e 1,4 milhões de ocorrências no país. A infecção pelo Zika vírus (ZIKV) tem sido associada ao aumento significativo de casos de microcefalia em recém-nascidos e da síndrome de Guillain-Barré em adultos. Em virtude das recentes advertências sobre a disseminação do ZIKV em território nacional, especialmente em relação ao risco para gestantes, é imperativo que os casos febris sejam minuciosamente investigados para garantir um diagnóstico adequado e a implementação de medidas de controle eficazes. (29,30,47)

Atualmente, não existem vacinas licenciadas para a dengue. Assim, a principal estratégia de prevenção continua sendo o controle dos vetores. No entanto, quando ocorre a circulação de múltiplos sorotipos, as estratégias de bloqueio e controle do vetor enfrentam consideráveis desafios, devido à complexidade epidemiológica envolvida. (66-68)

Para a implementação eficaz da vigilância, é fundamental considerar um conjunto de fatores essenciais, incluindo a notificação de casos, investigação epidemiológica, vigilância laboratorial, monitoramento das formas clínicas e vigilância entomológica, entre outros. Diversas dificuldades são enfrentadas, começando pelo diagnóstico clínico. A confirmação dos primeiros casos, a

identificação dos sorotipos circulantes e a localização geográfica dos casos são cruciais para a realização de uma vigilância ativa e eficaz. (69-71)

Diversos fatores estão envolvidos no processo de transmissão de doenças, o que demanda a realização de avaliações mais aprofundadas e precisas. Nesse contexto, torna-se evidente a importância do estudo do espaço social organizado na análise das incidências e prevalências de doenças. A identificação das áreas afetadas possibilita a implementação de ações coletivas direcionadas à prevenção, promovendo a mitigação dos impactos epidemiológicos. (71)

As epidemias têm o potencial de se disseminar rapidamente, evoluindo em um curto período, seguidas de uma fase de circulação endêmica. Diante disso, destaca-se a importância do uso de ferramentas de análise molecular e geoespacial, que fornecem dados cruciais para as atividades de vigilância epidemiológica, permitindo o monitoramento eficaz e a implementação de estratégias de controle direcionadas. (38,39,43,44,72,73)

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo forneceu uma análise detalhada do perfil epidemiológico das infecções por arbovírus, especificamente o vírus do dengue (DENV), o vírus Zika (ZIKV) e o vírus Chikungunya (CHIKV), no município de Araraquara durante os anos de 2015 e 2016. A partir da coleta e análise de mais de 420 amostras biológicas, foi possível evidenciar a predominância do DENV, especialmente o sorotipo DENV-1, como o principal arbovírus circulante na região, com um aumento considerável nos casos notificados ao longo do período estudado. A co-circulação de múltiplos arbovírus, como o DENV e o ZIKV, destacou a complexidade do cenário epidemiológico local, demandando uma vigilância mais precisa e o uso de ferramentas laboratoriais avançadas para a confirmação diagnóstica.

A análise demográfica e socioeconômica da população afetada revelou uma concentração significativa de casos nas faixas etárias produtivas e economicamente ativas, especialmente entre 20 e 40 anos. Além disso, foi observada uma prevalência de indivíduos socioeconomicamente afetados, o que pode refletir desigualdades no acesso a serviços de saúde e a medidas de prevenção adequadas. A análise das manifestações clínicas e laboratoriais demonstrou padrões comuns entre as infecções, com febre, dor no corpo e alterações hematológicas, como trombocitopenia, leucopenia e linfocitopenia.

Os dados obtidos corroboram a importância do diagnóstico molecular, especialmente a detecção de RNA viral. Amostras de urina, também podem ser utilizadas como uma estratégia eficaz para a ampliação da janela de diagnóstico, contribuindo para a melhoria da precisão diagnóstica em pacientes com viremia já em declínio. A ausência de uma vacina licenciada para a dengue torna a vigilância epidemiológica e o controle do vetor *Aedes aegypti* essenciais para a redução dos surtos e da disseminação das arboviroses, sendo necessário o uso integrado de metodologias, como a PCR e a análise geoespacial, para monitoramento contínuo da circulação viral e identificação de áreas de risco.

Em termos de estratégias de controle e prevenção, é fundamental a implementação de ações que considerem os aspectos socioeconômicos e demográficos da população, como o fortalecimento das campanhas educativas nas

faixas etárias mais vulneráveis e em áreas de maior concentração de casos. A vigilância viral ativa, a investigação de casos e a análise dos dados epidemiológicos em tempo real são práticas indispensáveis para mitigar o impacto das epidemias e melhorar a resposta frente a futuras ocorrências. A complexidade do cenário evidenciado neste estudo reflete a necessidade de uma abordagem multidisciplinar e interinstitucional para o enfrentamento das arboviroses no Brasil, com foco na ampliação do acesso ao diagnóstico, à informação e a medidas de controle eficazes, adaptadas às características locais.

## REFERÊNCIAS

- 1 **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Dengue and severe dengue. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: Maio, 2024.
- 2 SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A.; STAPLES, J. E. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 935–941, 2016. Disponível em: <https://www.healthdata.org/research-analysis/library/global-economic-burden-dengue-systematic-analysis>. Acesso em: Setembro, 2016.
- 3 Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev.** 1998 Jul;11(3):480-96. doi: 10.1128/CMR.11.3.480. PMID: 9665979; PMCID: PMC88892.
- 4 Bhatt, S., Gething, P., Brady, O. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature** 496, 504–507 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature12060>. Acesso em: Setembro, 2014.
- 5 **ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS)**. Informe epidemiológico sobre a dengue. Washington, D.C.: OPAS, 2018. Disponível em: <https://www.paho.org>. Acesso em: Dezembro, 2018.
- 6 BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, 1 dez. 2008.
- 7 BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 1 jun. 2007.
- 8 LOPES, N.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**. v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
- 9 KUNO, G.; CHANG, G. J. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and

- Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 608–637, 2005.
- 10 WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. **Antiviral Res.** v. 85, n. 2, p. 328, 2010.
- 11 KARABATSOS N. International catalogue of arthropod-borne viruses. 3rd ed. **San Antonio: American Society for Tropical Medicine and Hygiene**, 1985.
- 12 Guo C, et al. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990-2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Front Cell Infect Microbiol.** 2017 Jul 12;7:317. doi: 10.3389/fcimb.2017.00317. PMID: 28748176; PMCID: PMC5506197.
- 13 Messina JP, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends Microbiol.** 2014 Mar;22(3):138-46. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.011. Epub 2014 Jan 24. PMID: 24468533; PMCID: PMC3946041.
- 14 **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf>. Acesso em: Janeiro, 2017.
- 15 GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1 jul. 1998.
- 16 HOLMES, E.; TWIDDY, S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19–28, maio 2003.
- 17 TRENT, D. W. et al. The Molecular Epidemiology of Dengue Viruses. **Springer eBooks**, p. 293–315, 1 jan. 1990.
- 18 PAN. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas. [s.l.] **Pan American Health Organization**, 1994.
- 19 WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, n. 130, p. 69–80, jun. 2016.

- 20 KUNO, G.; CHANG, G.-J. . J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Zenodo**, 1 fev. 2007.
- 21 DUFFY, M. R.; et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0805715>. Acesso em: Maio, 2015.
- 22 **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. The history of zika virus. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-history-of-zika-virus>>. Acesso em: Maio, 2015.
- 23 **CDC**. Zika virus spreads to new areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 65, n. 3, p. 55-58, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/pdfs/mm6503e1.pdf>. Acesso em: Maio, 2016.
- 24 WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. e119–e126, jul. 2016.
- 25 SIDDIQUE, H. **Zika virus likely to spread throughout the Americas, says WHO**. Disponível em: <<https://www.theguardian.com/world/2016/jan/25/zika-virus-likely-spread-throughout-americas-says-who>>. Acesso em: Abril, 2016.
- 26 GOSTIN, L. O.; HODGE, J. G. Zika virus and global health security. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1099–1100, out. 2016.
- 27 BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde divulga primeiro balanço com casos de Zika no país**. *Ministério da Saúde*, 26 apr. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2016/abril/saude-divulga-primeiro-balanco-com-casos-de-zika-no-pais>. Acesso em: Maio, 2016.
- 28 MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 30 mar. 2016.

- 29 DE ARAÚJO, T. V. B. et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 328–336, mar. 2018.
- 30 MUSSO, D.; KO, A. I.; BAUD, D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 15, p. 1444–1457, 10 out. 2019.
- 31 TSETSARKIN, K. A. et al. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 4, p. 310–317, out. 2011.
- 32 CAGLIOTI C; LALLE E; CASTILLETTI C; CARLETTI F; CAPOBIANCHI MR. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiologica**. 36, 211-227, 2013.
- 33 DAS, B. et al. Molecular investigations of chikungunya virus during outbreaks in Orissa, Eastern India in 2010. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 1094–1101, 1 jul. 2012.
- 34 **MINISTERIO DA SAUDE**. Boletim Epidemiológico. Secretaria da Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. v. 46, n. 20, 2014
- 35 **MINISTERIO DA SAUDE**. Boletim Epidemiológico. Secretaria da Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. v. 47, n. 20 2016
- 36 AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 0, p. 1–6, 2015.
- 37 DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283–285, mar. 2015.
- 38 QUEIROZ, E. R. DA S.; MEDRONHO, R. DE A. Spatial analysis of the incidence of Dengue, Zika and Chikungunya and socioeconomic determinants in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 149, 2021.

- 39 SOUZA, J. H. M. et al. Dynamics of Transmission of Urban Arbovirus Dengue, Zika and Chikungunya in Southwestern Region of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 3, 2021.
- 40 DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, 2017.
- 41 VIEIRA, M. A. DA C. E S. et al. Potential role of dengue virus, chikungunya virus and Zika virus in neurological diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, 29 out. 2018.
- 42 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome**. Genebra: WHO, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barr%c3%a9-syndrome>. Acesso em: Dezembro, 2016.
- 43 MONDINI, A. et al. Análise espacial da transmissão de dengue em cidade de porte médio do interior paulista. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 444–451, 1 jun. 2005.
- 44 FERREIRA, A. C.; CHIARAVALLOTI NETO, F.; MONDINI, A. Dengue in Araraquara, state of São Paulo: epidemiology, climate and Aedes aegypti infestation. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, p. 18, 26 fev. 2018.
- 45 AGUILAR, J. et al. Impact of urban structure on infectious disease spreading. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 9 mar. 2022.
- 46 MONDINI, A.; CHIARAVALLOTI NETO, F. Variáveis socioeconômicas e a transmissão de dengue. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 6, p. 923–930, dez. 2007.
- 47 BRIZZI, A. C. B. et al. Microcefalia e Zika Vírus: cenário do perfil epidemiológico do Brasil nos anos de 2015 a 2021. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 11, p. 73048–73059, 11 nov. 2022.

- 48 WHITEHORN, J. et al. Genetic variants of MICB and PLCE1 and associations with the laboratory features of dengue. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 9 jun. 2017.
- 49 LEE, I.-K.; LIU, J.-W.; YANG, K. D. Clinical and laboratory characteristics and risk factors for fatality in elderly patients with dengue hemorrhagic fever. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 2, p. 149–53, ago. 2008.
- 50 SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423–1432, 12 abr. 2012.
- 51 OLIVEIRA, É. C. L. DE et al. Alterações hematológicas em pacientes com dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 682–685, 1 dez. 2009.
- 52 DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. DA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 390–398, 1 dez. 2004.
- 53 KUMAR, D. et al. Evaluation of NS1, IgM ELISA and RT-PCR in diagnosis of dengue fever. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 2440, 25 jun. 2018.
- 54 MOI, M. L. et al. Detection of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) by using ELISA as a useful laboratory diagnostic method for dengue virus infection of international travelers. **Journal of travel medicine**, v. 20, n. 3, p. 185–93, 2013.
- 55 PESCARINI, J. 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**, v. 16, n. 7, p. e0010602, 27 jul. 2022.

- 56 VIEIRA, C. J. DA S. P. et al. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, v. 147, p. 12–16, jul. 2015.
- 57 TAUZYNE MENEGALDO PINHEIRO et al. Viral immunogenicity determines epidemiological fitness in a cohort of DENV-1 infection in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006525–e0006525, 29 maio 2018.
- 58 HIRAYAMA, T. et al. Detection of Dengue Virus Genome in Urine by Real-Time Reverse Transcriptase PCR: a Laboratory Diagnostic Method Useful after Disappearance of the Genome in Serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2047–2052, 21 mar. 2012.
- 59 CARABALLO, E. et al. The detection of anti-dengue virus IgM in urine in participants enrolled in an acute febrile illness study in Puerto Rico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007971, 29 jan. 2020.
- 60 SAITO, Y. et al. Detecting Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) in Urine Samples Using ELISA for the Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 68, n. 6, p. 455–460, 2015.
- 61 BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico nº 33/2016**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2016.  
Disponível em:  
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf>. Acesso em: Dezembro, 2016.
- 62 BHATIA, S. et al. A Retrospective Study of Climate Change Affecting Dengue: Evidences, Challenges and Future Directions. **Frontiers in Public Health**, v. 10, 27 maio 2022.
- 63 DE SOUSA, S. C. et al. Factors associated with the occurrence of dengue epidemics in Brazil: a systematic review. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 45, p. 1, 6 ago. 2021.

- 64 VIANA, D. V. et al. The occurrence of dengue and weather changes in Brazil: A systematic review. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240–256, 1 jun. 2013.
- 65 GUERRA-GOMES, I. C. et al. Molecular and clinical epidemiological surveillance of dengue virus in Paraíba, Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 19–26, 2017.
- 66 HALSTEAD, S. B. Licensed Dengue Vaccine: Public Health Conundrum and Scientific Challenge. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 741–745, 5 out. 2016.
- 67 VILLAR, L. et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p. 113–123, 8 jan. 2015.
- 68 GUIRAKHOO, F. et al. Live Attenuated Chimeric Yellow Fever Dengue Type 2 (ChimeriVax<sup>TM</sup>-DEN2) Vaccine: Phase I Clinical Trial for Safety and Immunogenicity: Effect of Yellow Fever Pre-immunity in Induction of Cross Neutralizing Antibody Responses to All. **Human Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 60–67, 3 mar. 2006.
- 69 CHANG, M. S. et al. Challenges and future perspective for dengue vector control in the Western Pacific Region. **Western Pacific Surveillance and Response**, v. 2, n. 2, p. e1–e1, 5 jul. 2011.
- 70 TEIXEIRA, M. DA G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. **Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. Informe Epidemiológico do Sus**, v. 8, n. 4, p. 5–33, 1 dez. 1999.
- 71 MAMMEN, M. P. et al. Spatial and Temporal Clustering of Dengue Virus Transmission in Thai Villages. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. e205, 4 nov. 2008.
- 72 JOHANSSON, M. A.; DOMINICI, F.; GLASS, G. E. Local and global effects of climate on dengue transmission in Puerto Rico. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 2, p. e382, 2009.

73 ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Estratégia de vigilância genômica regional para preparação e resposta a epidemias e pandemias.** *CSP30/12*, 2022. Disponível em:  
<<https://www.paho.org/pt/documentos/csp3012-estrategia-vigilancia-genomica-regional-para-preparacao-e-resposta-epidemias-e>>. Acesso em: Agosto, 2022.

## ANEXO A - CASE REPORT

### DENV-1 in urine: an alternative for late and less evasive diagnosis?

Authors: Arianne Fagotti Gusmão<sup>1</sup>, Paulo Eduardo de Lima Lopes Filho<sup>1</sup>, Fabiana do Carmo Araújo<sup>2</sup>, Marília Mazzi Morais<sup>1</sup>, Cleslei Fernando Zanelli<sup>1</sup>, Roberta Vieira de Moraes Bronzoni<sup>3</sup>, Maurício Lacerda Nogueira<sup>4</sup>, Rodolpho Telarolli Junior<sup>1</sup>, Adriano Mondini<sup>1∞</sup>

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Univ. Estadual Paulista (FCF/UNESP); 2. Secretaria Municipal de Saúde de Araraquara; 3. Universidade Federal do Mato Grosso, campus SINOP; 4. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

∞ Corresponding author: [amondini@fcar.unesp.br](mailto:amondini@fcar.unesp.br)

#### 1. Introduction

The infection by any of the four serotypes of dengue (DENV 1-4) and Zika (ZIKV) viruses usually presents similar symptoms that make clinical diagnosis difficult. Patients typically suffer from fever, headache, nausea, vomiting, myalgia, rash, and severe arthralgia. Typically, DENV and ZIKV cases overlap considerably in signs and symptoms, so cases are underreported in sites where laboratory diagnostics is lacking (Weaver and Reisen, 2009). Brazil has been presenting dengue circulation since 1981, when DENV-1 and DENV-4 were introduced in the country. The other serotypes were introduced on the following decades, always causing explosive outbreaks. In 2015, 1,6 million cases were reported in the country, mostly caused by serotype 1, which represents an increase of approximately 65% in the number of cases compared to the previous year. Dengue with warning signs increased 58% (n= 20,329) and there were 863 deaths (Brazilian Ministry of Health, 2016 (a)). ZIKV has been detected in Brazil in 2015 (Campos et al 2015) and the magnitude of the disease in the

country is still unknown. Brazilian Ministry of Health estimated that 400,000 to 1,4 million cases may have occurred in the country (Brazilian Ministry of Health, 2016 (b)). However, these estimates have yet to be confirmed. An official bulletin from Brazilian Ministry of Health reported more than 120,000 cases until April 2016 (Brazilian Ministry of Health, 2016 (c)). ZIKV infection has been involved in the sudden increase of cases of microcephaly in babies (Fauci and Morens, 2016, Schuller-Faccini et al 2016), with strong evidence from a microcephaly case report (Mlakar et al 2016). ZIKV infection has also been involved in Guillain-Barré Syndrome manifestation (Cao-Lormeau, 2016)

Due to the recent warnings on Zika dispersion throughout Brazil and its possible outcomes for pregnant women and for general population, febrile cases have been thoroughly investigated. Since viremia and viremia have been reported in ZIKV infections, urine and blood samples have been investigated for the presence of virus (Chang et al 2016). Viremia in ZIKV infection supposedly lasts six days and the presence of virus in patient's urine can be detected 10 days after the onset of the symptoms (Gourinat et al 2016).

As we are conducting an arboviral surveillance study, we were able to detect DENV in the urine and in blood samples of three febrile patients that sought medical attention in Araraquara, central portion of São Paulo State, Brazil.

## **2. Case report**

We have collected urine and blood samples from three patients who had presented mild fever, arthralgia, and myalgia. One of the patients presented thrombocytopenia. Although their initial clinical diagnosis was dengue, we also collected urine to test for the presence of ZIKV. The collection was performed eight/nine days after the onset of the disease. Table 1 shows clinical information of the patients. We were not able to collect blood from the 6-year-old patient, who was

at the hospital under medical observation. His platelet count was around 138,000. He was also presenting abdominal pain and rash.

As DENV is widely circulating in the city, we initially tested samples for the presence of the four-dengue serotypes. They were also tested for other flaviviruses and for alphaviruses. We have been using a highly sensitive and specific RT-PCR (Morais-Bronzoni et al 2005) to detect DENV 1-4 in a daily base routine. Briefly, viral RNA was extracted from both serum and urine samples using QIAMP Viral RNA mini kit (QIAGEN, Germany). We used 8 $\mu$ L of the final product to assess viral infection. The first RT-PCR was performed using Flavivirus generic primers based on non-structural protein (NS5). In the second PCR, nested assays based on multiplex or conventional systems were used with species-specific primers for virus identification. Finally, the amplicons were loaded onto a 1% agarose gel and visualized under ultra violet illumination. We used positive and negative controls to avoid contamination in all reactions. The presence of DENV-1 in urine, known as viremia, was detected. No traces of viremia were found in serum samples. PCR fragments were purified and sequenced using the BigDye v3.1 Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI377 Automatic Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were analyzed using the DS Gene 2.0 Software (Accelrys, USA) and were confirmed as DENV-1. We have performed a simple phylogenetic analysis to using other DENV-1 sequences (Supplementary material) to understand how this sample has spread (Figure 1). The DENV-1 virus in urine belongs to genotype V.

The addresses of the patients were geocoded using ARCGIS 10.3 (ESRI) (Figure 2). Apparently, no clusters of transmission were detected.

### **3. Discussion**

We were able to detect DENV-1 in urine of patients after nine days of the onset of the disease. The detection of viraemia is an important epidemiological finding since urine can be an alternative clinical specimen for late and less evasive diagnosis. Instead of using an invasive method to draw blood, especially in vulnerable groups such as young and elderly patients, the collection of urine can be harmless and less risky.

According to the World Health Organization (2009), after the onset of illness, the virus can be detected in serum, plasma, circulating blood cells, and other tissues for up to 5 days. At the end of the acute phase of infection, serology is the method of choice for diagnosis. Our results, however, indicate that urine can be used to detect dengue virus.

Previous studies have demonstrated that urine could be used as an alternative to blood for virological diagnosis of dengue. In a study from Ribeirão Preto, which is located 100 km from Araraquara, two patients presented DENV-2 and DENV-3 in urine and serum during the acute phase. However, they were not detected after the 9<sup>th</sup> post onset of the symptoms (Poloni et al 2010). The presence of DENV was also detected with the non-structural protein 1 (NS1) antigen test in the urine of febrile patients (Chuansumrit et al 2011).

The DENV-1, DENV-2 and DENV-3 were recovered in the urine of patients within different days after the onset of the disease with real-time RT-PCR. Twenty-one patients were followed up for 60 days and the virus could be detected after 37 days after the first symptoms (Van den Bosche, et al 2015). Serial plasma, urine and saliva samples were tested at several points in patients from Cambodia and DENV-1, DENV-2 and DENV-4 were detected in the urine. The viruses could be detected until two weeks after the onset of the disease (Andries et al 2015).

Urine specimens were appropriate for diagnosing West-Nile virus (WNV) and Zika virus (ZIKV) infections since viraemia can be detected for a longer time than viremia (Barzon et al 2013; Gourinat et al 2015). Urine is probably the preferred specimen type to identify acute Zika virus disease (Bingham et al

2016). Both ZIKV and WNV were infectious when recovered from urine (Fonseca et al 2014; Papa et al 2014).

Although the presence of DENV and other *flaviviruses* in the urine has been documented, studies to explain the permanence of the virus in the renal system are necessary. Tonry et al 2005 showed that adult hamsters that survived experimental WNV infection developed persistent viruria for up to 52 days. Immunohistochemistry in kidneys of viruric animals showed foci of WNV antigen in renal tubular epithelial and vascular endothelial cells. Virus could not be isolated from kidney homogenates of the animals. The authors also highlight the use of urine as a possible diagnostic tool.

Syndromes related to the renal system have been reported on dengue infection. The acute kidney injury (AKI) is an important manifestation of dengue albeit poorly studied, according to Oliveira and Burdmann (2015). In their review, they discuss forms of renal involvement that may lead to AKI, such as the action of the virus in the renal tissue, rhabdomyolysis, glomerulonephritis, and hemolytic uremic syndrome. In a study by Kuo et al 2008, renal failure (RF) was described as an important manifestation in severe dengue. Twenty-one patients were in the RF group, in which mortality was higher. The authors state that impairment of the renal system is associated with higher percentage of hemorrhagic manifestations, shock, and death.

Antigenic and genetic differences among DENV serotypes and genotypes can influence disease outcome, epidemic magnitude, and viral evolution (Chen and Vasilakis, 2011; Martina et al 2009). Katzelnick et al (2015) characterized antigenic diversity of DENV types using antigenic maps from neutralizing antibody titers. In their data, primary infection antisera could not neutralize viruses of the same DENV and no improved neutralization to homologous type isolates up to two years after infection. Differences in genotypes may play an important role on this particular matter.

Genotype V of DENV-1, which was found in the urine of our patients, includes viruses that circulated in Latin America, Caribbean region, and in the Southern cone (Chen and Vasilakis, 2011). Drumond et

al (2011) sequenced and analyzed Brazilian DENV-1 genomes and found that all isolates belong to genotype V and that were subdivided into three lineages. The authors stated that four different events of introduction increased the genetic diversity and there was recombination of DENV-1 strains. This finding can be involved in disease severity reported lately in Brazil. DENV-1 has been the major serotype circulating in the country in recent years and an increase in the number of severe cases and deaths were reported in 2015 (Brazilian Ministry of Health, 2016 (b)).

The spatial distribution of dengue and other viruses seems to be modulated by lineage adaptation and point of introduction. Modelling of human mobility predicted different geographic patterns of CHIKV lineage distribution from two different sites of introduction in Brazil (Nunes et al 2015). A similar pattern seems to have occurred for dengue in São José do Rio Preto, Brazil (Mondini et al 2009). Two lineages of DENV-3 were circulating in very distinct areas of city. The molecular characterization of the circulating strains identified at least three different viral introductions. Only two lineages spread throughout the city. Due to the small number of patients in our study, it is not possible to infer spatial clustering.

Although our number of samples is limited, we highlight the importance of studying the use of urine as a potential tool in late diagnosis. The mechanisms underlying viruria after viremia must be understood as well as how the renal system is impacted with DENV presence. In terms of dengue epidemiology, the ability to recover the virus after nine days of the onset of the disease from urine is important to confirm clinical diagnosis. It may also help to increase the assertiveness and the figures of dengue reports where the viruses are actively circulating.

This study was evaluated and approved by the Ethics Review Board of Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UNESP).

## Acknowledgements

This work was supported by the SVS/Ministry of Health, PROPE/UNESP and CAPES grants.

## References:

Andries A-C, Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, LornTry P, et al. (2015) Value of Routine Dengue Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0004100.

doi:10.1371/journal.pntd.0004100

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis*. 2013; 208: 1086–1092. doi: 10.1093/infdis/jit290

Bingham AM, Cone M, Mock V, et al. Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease — Florida, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6518e2>

Brazilian Ministry of Health (a). *Boletim Epidemiológico*. Vol. 47. N. 16. Brasília. 2016.

Brazilian Ministry of Health (b). *Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC) – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.*

Brazilian Ministry of Health (c). *Boletim Epidemiológico*. Vol. 47. N. 20. Brasília. 2016.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015 Oct;21(10):1885-6. doi: 10.3201/eid2110.150847.

Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case control study. *Lancet* 2016;29. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6

Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun.* 2016 Apr;68:1-13. doi: 10.1016/j.jaut.2016.02.006.

Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses.* 2011 Sep;3(9):1562-608. doi: 10.3390/v3091562.

Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnararatchakit K, Yoksan S, Flamand M, Sakuntabhai A. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. *DiagnMicrobiolInfectDis.* 2011; 71: 467–469. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.020

Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, Bosch I, Nogueira ML. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *ArchVirol.* 2012 Nov;157(11):2061-73. doi: 10.1007/s00705-012-1393-9.

Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas—Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med.* 2016 Feb 18;374(7):601-4. doi: 10.1056/NEJMp1600297.

Fonseca K, Meatherall B, Zarra D, Drebot M, MacDonald J, Pabbaraju K, et al. First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *Am J TropMedHyg.* 2014; 91: 1035–1038. doi: 10.4269/ajtmh.14-0151

Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21: 84–86. doi: 10.3201/eid2101.140894

Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, Bustos Arriaga J, Green A, James SL, Lau L, Montoya M, Wang C, VanBlargan LA, Russell CA, et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*. 2015 18;349(6254):1338-43. doi: 10.1126/science.aac5017.

Kuo MC, Lu PL, Chang JM, Lin MY, Tsai JJ, Chen YH, Chang K, Chen HC, Hwang SJ. Impact of renal failure on the outcome of dengue viral infection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(5):1350-6. doi: 10.2215/CJN.00020108.

Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Oct;22(4):564-81. doi: 10.1128/CMR.00035-09.

Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, VesnaverVipotnik T, FabjanVodušek V, Vizjak A, Pižem J, Petrovec M, AvšičŽupanc T. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016 Mar 10;374(10):951-8. doi: 10.1056/NEJMoa1600651.

Mondini A, de Moraes Bronzoni RV, Nunes SH, Chiaravalloti Neto F, Massad E, Alonso WJ, Lázaro ES, Ferraz AA, de Andrade Zanotto PM, Nogueira ML. Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban dengue 3 outbreak in São Paulo, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 May 26;3(5):e448. doi: 10.1371/journal.pntd.0000448.

Morais Bronzoni RV, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Moraes Figueiredo LT. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol*. 2005 Feb;43(2):696-702.

Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, Azevedo Rdo S, da Silva DE, da Silva EV, da Silva SP, et al .Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 2015 Apr 30;13:102. doi: 10.1186/s12916-015-0348-x.

Papa A, Testa T, Papadopoulou E. Detection of West Nile virus lineage 2 in the urine of acute human infections. *J MedVirol.* 2014; doi: 10.1002/jmv.23949

Oliveira JF, Burdmann EA. Dengue-associated acute kidney injury.*Clin Kidney J.* 2015 Dec;8(6):681-5. doi: 10.1093/ckj/sfv106.

Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Viol J.* 2010; 7: 22. doi: 10.1186/1743-422X-7-22

Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65place\_holder\_for\_early\_release:59–62. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>

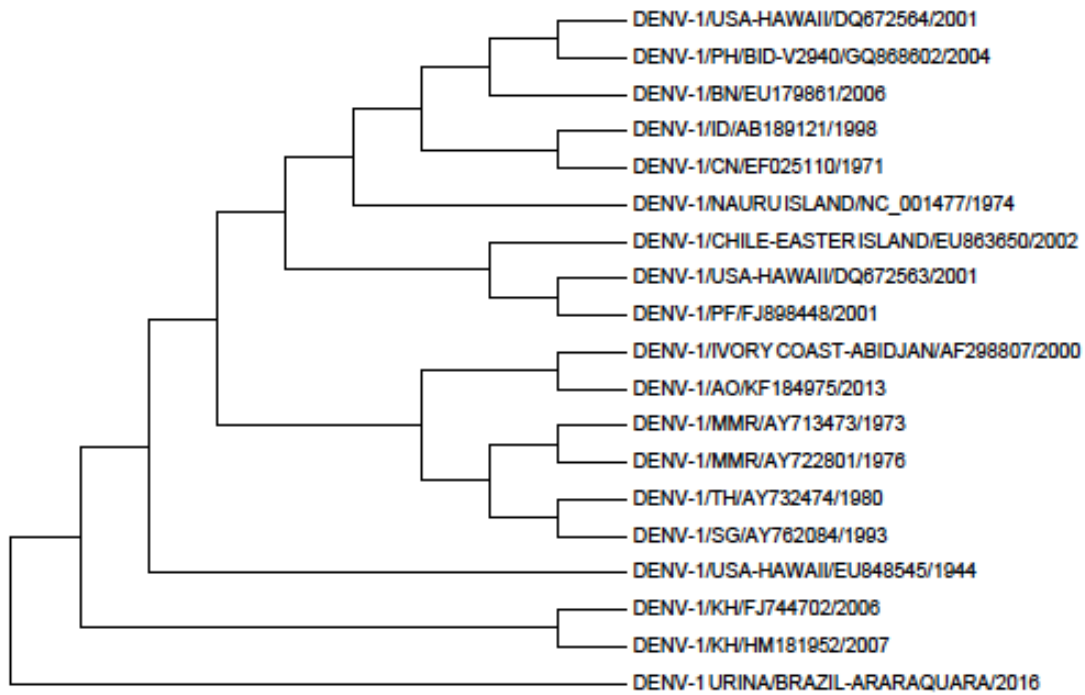
Tonry JH, Xiao SY, Siirin M, Chen H, da Rosa AP, Tesh RB. Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Mar;72(3):320-4.

Van denBossche D, Cnops L, Van Esbroeck M. Recovery of dengue virus from urine samples by real-time RT-PCR.*Eur J ClinMicrobiolInfectDis.* 2015 Jul;34(7):1361-7. doi: 10.1007/s10096-015-2359-0.

Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010; 85(2):328-45. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008

Wise J. Study links Zika virus to Guillain-Barré syndrome. *BMJ.* 2016 Mar 1;352:i1242. doi: 10.1136/bmj.i1242.

Figure 1.



**Figure 1.** Phylogenetic analysis of DENV-1 recovered from a febrile patient from Araraquara, SP/Brazil in 2016. We can see the boot strap values in each node of the phylogenetic tree.

Figure 2.



**Figure 2.** Spatial distribution of DENV-1 detected in the urine of three patients from Araraquara, SP/Brazil in 2016. The green dots are the patients who had their urine tested for the presence of dengue.

**Table 1.** Clinical data of three patients with the presence of DENV-1 in urine, Brazil, 2016.

<i>Name</i>	<i>Gender</i>	<i>Age</i>	<i>Test samples</i>	<i>DAOD</i>	<i>Plateletcount</i>	<i>Result in urine</i>	<i>Result in serum</i>
<b>A.C. B.</b>	<i>F</i>	<i>29</i>	<i>Urine andserum</i>	<i>9</i>	<i>Normal</i>	<i>DENV-1</i>	<i>Negative</i>
<b>C.L.V.</b>	<i>M</i>	<i>6</i>	<i>Urine</i>	<i>8</i>	<i>Low</i>	<i>DENV-1</i>	<i>NT</i>
<b>E.P.R.</b>	<i>M</i>	<i>59</i>	<i>Urine andserum</i>	<i>9</i>	<i>Normal</i>	<i>DENV-1</i>	<i>Negative</i>

(F) stands for female; (M) stands for male; DAOD = days after the onset of the disease; Reference value for low is under 150,000. NT stands for Not Tested.

### Supplementary Material

**Table 2.** Accession numbers of the sequences used in the phylogenetic analysis.

Strain	Accession number	Year	Local
DENV-1/SG	AY762084	1993	SINGAPORE
DENV-1/AO	KF184975	2013	ANGOLA
DENV-1/MMR	AY713473	1973	MYANMAR
DENV-1/MMR	AY722801	1976	MYANMAR
DENV-1/ IVORY COAST - ABIDJAN	AF298807	2000	IVORY COAST - ABIDJAN
DENV-1/NAURU ISLAND	NC_001477	1974	NAURU
DENV-1/ID	AB189121	1998	INDONESIA
DENV-1/PF	FJ898448	2001	FRENCH POLINESIA
DENV-1/PH	GQ868602	2004	PHILIPPINES
DENV-1/CHILE-EASTER ISLAND	EU863650	2002	CHILE/EASTER ISLAND
DENV-1/TH	AY732474	1980	TAILAND
DENV-1/USA-HAWAII	EU848545	1944	USA - HAWAII
DENV-1/KH/HM181952	HM181952	2007	CAMBODIA
DENV-1/KH	FJ744702	2006	CAMBODIA
DENV-1/USA-HAWAII	DQ672563	2001	USA - HAWAII
ENV-1/USA-HAWAII	DQ672564	2001	USA - HAWAII
DENV-1/CN	EF025110	1971	CHINA
DENV-1/BN	EU179861	2006	BRUNEI
DENV-1 URINA			BR-AQA