

Tatiana Elias Colombo

**Vigilância do vírus do dengue e circulação dos sorotipos presentes em São
José do Rio Preto entre 2011 e 2014**

São José do Rio Preto
2014

Tatiana Elias Colombo

Vigilância do vírus da dengue e circulação dos sorotipos presentes em São José
do Rio Preto entre 2011 e 2014

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
Co-orientadora: Dr^a. Danila Vedovello de Jesus

São José do Rio Preto
2014

Colombo, Tatiana Elias.

Vigilância do vírus da dengue e circulação dos sorotipos presentes em São José do Rio Preto entre 2011 e 2014 / Tatiana Elias Colombo. – São José do Rio Preto, 2014

123 f. : il., tabs.

Orientador: Maurício Lacerda Nogueira

Coorientador: Danila Vedovello de Jesus

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Vírus da dengue - São José do Rio Preto (SP), 2011-2014. 3. Sorotipagem. 4. Geologia - Métodos estatísticos. 5. Proteínas virais. 6. Vigilância epidemiológica. I. Nogueira, Maurício Lacerda. II. Jesus, Danila Vedovello de. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Tatiana Elias Colombo

Vigilância do vírus da dengue e circulação dos sorotipos presentes em São José
do Rio Preto entre 2011 e 2014

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Sistemas de Computação, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
FAMERP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Erna Geessien Kroon
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Sergio Moraes Aoki
DNAPTA BIOTECNOLOGIA LTDA – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
12 de dezembro de 2014

DEDICATÓRIA

*À minha família, pelo grande amor, dedicação e apoio em mais uma
conquista que é tão minha quanto deles.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir concretizar mais um sonho e por fazer compreender que tudo acontece no seu devido tempo. Que a Vossa constante presença ilumine o meu futuro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, por ter acreditado em mim. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos e confiança refletidos em condições indispensáveis que um jovem pesquisador deve ter no decorrer de sua formação. Agradeço por nos demonstrar com exemplos que qualquer objetivo pode ser alcançado com responsabilidade, trabalho sério e organização.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos e em todas as etapas de minha vida.

Ao Élvio Augusto Silveira Pattaro, pelo amor, compreensão e paciência, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos Professores e à Coordenação do Curso por contribuírem para o enriquecimento de meu conhecimento.

Ao Laboratório de Pesquisa em Virologia da FAMERP, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desse trabalho.

À Silvia e Adriano, pelo carinho, amizade e colaboração que foram essenciais no início do meu doutorado.

Aos meus amigos do laboratório de Pesquisa em Virologia da FAMERP: Ana Carolina, Ana Theresa, Aripuanã, Carol, Daiane, Danila, Eliane, Fernanda, Gislaine, Joice, Kátia, Maisa, Mânlio, Milena, Milene, Nathália, Tauyne e Tiago pelo companheirismo, apoio, amizade e incontáveis momentos de alegria e descontração.

À Secretaria Municipal de Saúde de São José do Rio Preto pelo fornecimento de dados que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior, chefe do Laboratório de Virologia do Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, e à Dra. Leila Sabrina Ullmann pelo apoio técnico oferecido.

À Profa. Fátima Pereira de Souza e à doutoranda Gabriela Campos de Araújo pela atenção, colaboração e amizade prestadas.

À agência de fomento CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP pelo financiamento deste projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização genômica dos Flavivirus.....	24
Figura 2. Estrutura do dímero da proteína E do DENV-3 na partícula viral madura.....	25
Figura 3. Ciclo de replicação viral do gênero <i>Flavivirus</i>	28
Figura 4. Transmissão e viremia do dengue.....	30
Figura 5. Árvore filogenética com linhagens dos quatro sorotipos de DENV.....	37
Figura 6. Filogenia do DENV-1.....	39
Figura 7. Filogenia do DENV-2.....	41
Figura 8. Filogenia do DENV-3.....	43
Figura 9. Filogenia do DENV-4.....	44
Figura 10. Localização do município de São José do Rio Preto – Estado de São Paulo.....	60
Figura 11. Foto representativa do gel de agarose que mostra bandas referentes ao segmento de NS5 dos isolados de DENV-1 (472 pb), DENV-2 (316 pb) e DENV-4 (222 pb) por Multiplex-Nested-PCR.....	64
Figura 12. Foto representativa dos géis de agarose que mostram um caso de co-infecção (DENV-1/DENV-4) através de duas metodologias.....	64
Figura 13. Número de amostras de cada sorotipo do DENV identificados nas amostras clínicas coletadas no período entre agosto de 2011 a junho de 2014.....	65
Figura 14. Distribuição anual da positividade para DENV nas amostras clínicas coletadas no período entre agosto de 2011 a junho de 2014.....	65
Figura 15. (A) Árvore filogenética de DENV-1 construída pelo método de <i>Neighbor-Joining</i> . (B) Árvore filogenética inferida pelo método de <i>Neighbor-Joining</i> de DENV-4. Foto representativa do gel de agarose que mostra padrões do gene do envelope de DENV-4 (1738 pb).....	66
Figura 16. Alinhamento de 33 sequências de aminoácidos da proteína do capsídeo de amostras obtidas no <i>Genbank</i> e a amostra RP/BR/2012/507b de DENV-4.....	67
Figura 17. Distribuição mensal do número de casos de dengue avaliados no período entre agosto de 2011 a junho de 2014.....	68

Figura 18. Distribuição mensal da porcentagem de casos de dengue avaliados no período entre agosto de 2012 a junho de 2014.....	69
Figura 19. Amostras de dengue 4 georreferenciadas, para o município de São José do Rio Preto, nos anos 2011, 2012 e 2013.....	73
Figura 20. Foto representativa do gel de agarose que mostra bandas referentes à amplificação do gene do envelope de DENV-4 (1738 pb).....	74
Figura 21. Reconstrução filogenética pelo método do <i>Maximum Likelihood</i> de 33 sequências de DENV-4, inferidas à partir de 1457 nucleotídeos do gene que codifica a proteína do Envelope (E).....	76
Figura 22. Identidade entre sequências de AeDENV encontradas em amostras isoladas em C6/36 e a sequência AY095351.....	77
Figura 23. Árvore filogenética de linhagens de DENV-4 baseada na sequência completa do genoma de dez amostras provenientes de São José do Rio Preto através do método <i>Maximum Likelihood</i>	78
Figura 24. Estrutura tridimensional dos modelos da proteína do envelope (E) do DENV-4...	82
Figura 25. Estrutura tridimensional dos modelos da proteína NS1 do DENV-4.....	84
Figura 26. Estrutura tridimensional dos modelos da proteína NS3 do DENV-4.....	85
Figura 27. Estrutura tridimensional dos modelos da proteína NS5 do DENV-4.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ocorrência de substituição de aminoácidos entre as sequências de DENV-4 (proteínas estruturais Capsídeo e precursora de membrana).....	79
Quadro 2. Ocorrência de substituição de aminoácidos entre as sequências de DENV-4 (proteína do envelope).....	80
Quadro 3. Ocorrência de substituição de aminoácidos entre as sequências de DENV-4 (proteína do envelope) - continuação.....	80
Quadro 4. Ocorrência de substituição de aminoácidos entre as sequências de DENV-4 (proteínas não-estruturais).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados na detecção dos Flavivirus (NS5).....	50
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados na detecção dos Flavivirus (C).....	51
Tabela 3. Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR do gene de envelope do DENV-4, sua sequência (5' → 3') e tamanho do produto amplificado.....	55
Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de marcação fluorescente para sequenciamento do gene que codifica a proteína E do DENV-4.....	56
Tabela 5. Dados de modelagem (molde, identidade, cobertura e referência) utilizados na escolha da proteína estrutura molde.....	60
Tabela 6. Resultados do kit <i>Panbio® Dengue Early ELISA</i> de acordo com o número de dias após o início da febre em pacientes com infecção pelo DENV em função do sorotipo do DENV detectado por Multiplex-Nested-PCR.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

Aa – aminoácidos

AM – Amapá

AP61 – *Aedes pseudoscutellaris*

BR – Brasil

C – Citosina

C – proteína do capsídeo

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

cDNA – DNA complementar

cm² – centímetros ao quadrado

C6/36 – Clone do mosquito *Aedes albopictus*

dNTP – *Deoxynucleoside triphosphate*

DENV – Dengue virus

DMSO – *Dimethyl sulfoxide*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DTT – *Dithiothreitol*

E – Proteína do envelope

EDTA – Ácido etileno-diamino tetracético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

et al – *and others*

F – Fenilalanina

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

µg – Micrograma

g – giros

G – Guanina

Glu – Glutamato

Gly – Glicina

H⁺ – íons hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

IgM – Imunoglobulina M

JEV – Vírus Encefalite Equina

KCl – Cloreto de Potássio

M – Molar
M – Proteína de membrana
MA – Manaus
MT – Mato Grosso
mM – Milimolar
kb – kilo bases
kDa – kilo Dalton
 km^2 – quilômetro ao quadrado
L – Leucina
L15 – Leibovitz
MA – Massachusetts
MAYV – vírus Mayaro
 MgCl_2 – Cloreto de Magnésio
mL – Mililitro
NCR – *Noncoding Region*
ng – nanograma
 NH_4OH – hidróxido de amônio
nm – nanômetros
NS – Proteína não-estrutural
ORF – *Open Reading Frame*
OROV – vírus Oropouche
pb – Pares de bases
PIB – Produto Interno Bruto
prM – Proteína precursora da membrana M
% – Porcentagem
pH – Potencial hidrogeniônico
pmol – Picomol
PA – Pará
PCR – *Polymerase chain reaction*
PDB – *Protein Data Bank*
pI – ponto isoelétrico
Phe – Fenilalanina
RNA – ácido ribonucleico
RR – Roraima

RS – Rio Grande do Sul

ROCV – vírus Rocio

SJRP – São José do Rio Preto

SLEV – vírus da encefalite de Saint Louis

SP – São Paulo

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RNaseout – inibidor de ribonuclease

T – Timina

TCID – *Tissue Culture Infective Doses*

TBE – Tris, EDTA, Ácido bórico

TNG – rede Trans-Golgi

Tris – Hidroximetilaminometano

USA – *United States of America*

UTR – *Untranslated Region*

Val – Valina

YFV– Vírus da Febre Amarela

μM – Micromolar

μL – Microlitro

° – graus

′ – minutos

″ – segundos

°C – Graus Celsius

RESUMO

Dengue é a infecção por arbovírus mais comum em todo o mundo e é causada por quatro sorotipos distintos (DENV 1-4). No presente trabalho analisamos a transmissão do Dengue virus (DENV) em São José do Rio Preto (SP) no período entre 2011 e 2014. Foram utilizadas amostras de sangue de pacientes febris que procuraram o serviço de saúde do município. A pesquisa do DENV foi realizada através da técnica Multiplex RT-PCR utilizando *primers* que se ligam a regiões do gene da proteína não estrutural NS5 e da proteína estrutural C, seguido por Nested-PCR com iniciadores espécie-específicos. Foram analisadas 1.098 amostras no período entre agosto de 2011 a junho de 2014. Setecentos e noventa e oito amostras (798/1098, 72%) foram confirmadas como positivas por Multiplex-Nested-PCR. Os sorotipos de DENV encontrados foram: 65,41% (522/798) DENV-4, 22,56% (180/798) DENV-1, 11,28% (90/798) DENV-2 e 0,75% (6/798) co-infecção (DENV-1/DENV-4, DENV-1/DENV-2), mostrando um padrão complexo de circulação dos sorotipos. Com a utilização de técnicas de geoestatística dos casos de dengue foi possível a detecção de áreas (zona Norte de São José do Rio Preto) com risco relativo elevado de ocorrência de DENV-4, áreas estas que foram priorizadas com relação ao emprego de medidas de vigilância e controle. Trinta e três amostras de DENV-4 foram submetidas ao sequenciamento do gene do envelope, assim como, à reconstrução filogenética. Dentre as 33 amostras, dez tiveram o genoma completo sequenciado, sendo filogeneticamente classificadas. As análises filogenéticas mostram que as amostras identificadas neste estudo foram agrupadas no genótipo Americano, que circula no Brasil. O genótipo Americano demonstrou apenas um clado agrupando todas as amostras de SJRP, indicando a circulação de uma única linhagem. A análise filogenética do genoma completo de DENV-4 mostra relação entre os isolados de São José do Rio Preto com os isolados encontrados na região norte da América do Sul. Foram observadas substituições de aminoácidos nas proteínas estruturais (21%) e proteínas não-estruturais (79%) do genoma de DENV-4. Nenhuma substituição resultou em alteração da classe dos aminoácidos. Todas as mutações encontradas nas proteínas E, NS1, NS3 e NS5 do DENV-4, mutações consideradas comuns entre as amostras de São José do Rio Preto, não ocorreram em regiões de interação ou sítio ativo das proteínas virais já estabelecidas na literatura, sugerindo que estas modificações na sequência primária das proteínas possam não interferir em suas funções.

Palavras-chave: Dengue. Sorotipos. Geoestatística. Genótipo. Proteínas virais.

ABSTRACT

Dengue is the most common arboviral infection worldwide and is caused by four distinct serotypes. In the present study we assessed the Dengue virus (DENV) transmission in São José do Rio Preto (SP) from 2011 to 2014. We analyzed blood samples from febrile patients who were attended at health care services in São José do Rio Preto. The DENV detection was performed with Multiplex RT-PCR using Flavivirus generic primers based on non-structural protein (NS5) and structural protein (C), followed by Nested-PCR assay with species-specific primers. We analyzed 1098 samples from August 2011 to June 2014. Seventy two samples (798/1098, 72%) were confirmed as positive by multiplex RT-PCR. The DENV serotypes distribution were: 65.41% (522/798) DENV-4, 22.56% (180/798) DENV-1, 11.28% (90/798) DENV-2 and 0.75% (6/798) coinfection (DENV-1/DENV-4, DENV-1/DENV-2), showing a complex serotypes circulation pattern a of serotypes circulation. With the use of geostatistical techniques of dengue cases it was possible to detect areas (northern zone of São José do Rio Preto) with high relative risk of DENV-4 occurrence, these areas should be prioritized regarding the employment of surveillance and control measures. Thirty-three DENV-4 have been subjected to sequencing of the entire envelope gene and were used for phylogenetic reconstruction. Among the 33 samples ten had the full genome sequenced and were classified phylogenetically. The phylogenetic analyses showed that the samples identified in this study were grouped with American genotype that circulating in Brazil. The American genotype showed only one clade grouped with all SJRP samples, indicating the circulation of a single lineage. Phylogenetic analysis of DENV-4 complete genome shows a relationship between isolates from São José do Rio Preto with isolates found in northern region of south America. Amino acid substitutions were observed in the structural proteins (21%) and non-structural proteins (79%) of DENV-4 genome. No substitution resulted in amino acid class change. All mutations found in proteins E, NS1, NS3 and NS5 of DENV-4, were considered common mutations among samples from São José do Rio Preto, and these changes did not occur in regions of interaction or active site of viral proteins described in the literature, suggesting that these changes in the primary sequence of the protein can not interfere with their functions.

Key words: Dengue. Serotypes. Geostatistical. Genotype. Viral proteins.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Arboviroses.....	21
2.2 Família <i>Flaviviridae</i> – Gênero <i>Flavivirus</i>	22
2.2.1 <i>Dengue virus</i> (DENV)	28
2.3 Transmissão do DENV	29
2.4 Epidemiologia do DENV.....	31
2.5 Diagnóstico laboratorial	33
2.6 Monitoramento epidemiológico	35
2.7 Origem, diversidade genética e evolução do DENV	36
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Amostras clínicas	49
4.1.1 Análise estatística	49
4.2 Avaliação do ensaio Panbio® Dengue Early ELISA	49
4.3 Extração de RNA.....	50
4.4 Oligonucleotídeos iniciadores	50
4.4.1 RT-PCR empregando iniciadores para região do gene NS5 e C de DENV	51
4.4.2 Multiplex-Nested-PCR	52
4.4.3 Eletroforese em gel de agarose.....	52
4.5 Sequenciamento.....	53
4.5.1 Gene da proteína C	53
4.5.2 Gene do envelope do DENV-4.....	54
4.5.3 Genoma completo dos isolados de DENV-4.....	56
4.5.3.1 Quantificação e tratamento do RNA	57
4.5.3.2 Obtenção do DNA complementar (cDNA)	57
4.5.3.3 Obtenção da dupla fita de DNA	57
4.5.3.4 Purificação e quantificação da dupla fita de DNA	57
4.6 Análise filogenética	58

4.6.1 Gene da proteína C	58
4.6.2 Gene do envelope do DENV-4	58
4.6.3 Genoma completo dos isolados de DENV-4	58
4.7 Isolamento das amostras de DENV-4 em Linhagem C6/36	59
4.8 Modelagem molecular por homologia	59
4.9 Confeção dos mapas georreferenciados	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Características epidemiológicas do DENV em São José do Rio Preto	62
5.2 Características moleculares do DENV em São José do Rio Preto	63
5.3 Isolamento de Dengue virus em linhagem celular C6/36	71
5.4 Avaliação do ensaio <i>Panbio® Dengue Early ELISA</i>	71
5.5 Análise da distribuição espacial das amostras de DENV-4	73
5.6 Caracterização genotípica e análise filogenética dos isolados de DENV-4.	74
5.6.1 Filogenia e genotipagem baseados na análise do gene do envelope (E)	74
5.6.2 Caracterização molecular baseada nas sequências completas do genoma viral	77
5.6.2.1 Análise do genoma completo dos DENV-4 obtidos no presente estudo	77
5.6.2.2 Filogenia e genotipagem baseados na análise do genoma completo dos DENV-4 obtidos no presente estudo	78
5.6.2.3 Análise das sequências de DENV-4 baseada no alinhamento do gene do envelope, assim como do genoma completo	79
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
8. APÊNDICES	113
8.1 APÊNDICE I	113
8.2 APÊNDICE II	114
9. ANEXOS	116
9.1 ANEXO I	116
9.2 ANEXO II	117
9.3 ANEXO III	118
9.4 ANEXO IV	121
9.5 ANEXO V	123

Introdução e Justificativa

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A dengue tornou-se um problema de saúde pública mundial, sendo causa de mais de 1.158 hospitalizações e 1.348 mortes durante o ano 2013, no Brasil (SINAN, 2014). Apesar da alta morbidade e mortalidade, até o presente momento não há uma vacina licenciada eficaz ou terapias antivirais específicas contra dengue (MOURA, ROCHA, 2012).

A falta de uma vacina eficaz e segura, a força de morbidade do agente infeccioso e a alta competência vetorial do *Aedes aegypti*, vetor bem adaptado ao ambiente urbano densamente povoado, com deficiências e estilos de vida da população que geram habitats ideais para este mosquito, tornam a prevenção da dengue uma formidável tarefa quase impossível de ser atingida com os atuais meios disponíveis para sua prevenção (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

A existência de quatro sorotipos com alta variabilidade genética e a evolução da doença para formas letais da dengue representa uma série ameaça a toda a população, dessa maneira a identificação precisa da variabilidade genética do vírus é importante para compreender os processos de dispersão e virulência, assim como a identificação dos vírus responsáveis pelas epidemias (WOROBNEY et al., 1999; WANG et al., 2003; WEAVER, VASILAKIS, 2009).

Diversos mecanismos são importantes para o surgimento de uma epidemia, tais como, a mudança na prevalência de sorotipos circulantes (ZHANG et al., 2005; CARRILLO-VALENZO et al., 2010; LEE et al., 2012) e maior infestação do vetor (LAMBRECHTS et al., 2012). Esses processos ocorrem principalmente quando uma linhagem genética apresenta melhor processo evolutivo do que a que circulava anteriormente (ZHANG et al., 2005). A constante vigilância dessas variabilidades genéticas é importante para compreensão dos mecanismos de introdução e extinção de linhagens, para melhor compreender os fatores externos/ambientais relacionados a estes mecanismos, assim como prever as potenciais consequências epidemiológicas de tais eventos (ZHANG et al., 2005).

Desta maneira, este trabalho visa contribuir com a detecção do Dengue vírus (DENV) circulantes em São José do Rio Preto, município localizado na região noroeste do estado de São Paulo, conhecendo também aquelas que foram responsáveis pelas epidemias de 2011 a 2014. Além disso, reconhecer o genótipo de DENV-4 e sua origem, fornecendo dessa forma subsídios para que se possam construir vias de introdução/deslocamento do vírus dentro de uma região, assim como conhecer a origem geográfica dos mesmos. Esta informação pode se

constituir em marcadores epidemiológicos precoces para a tomada de medidas de controle por parte das autoridades competentes, bem como conhecer se os genótipos circulantes se associam ou não ao maior risco de desenvolvimento de casos graves da doença em nossa população.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arboviroses

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos a hospedeiros vertebrados. São mantidos em ambientes silvestres em que, geralmente, o homem configura-se apenas como um hospedeiro acidental por não contribuir para seu ciclo de transmissão e geralmente se infecta ao penetrar em áreas enzoóticas, com a notável exceção do DENV, no qual se configura como o hospedeiro principal (NATHASON, 2007). Os arbovírus transmitidos por mosquitos, produzem viremia em humanos e em algumas espécies de animais (GUBLER, 2002). Apresentam ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes, mas estão presentes predominantemente nos trópicos, devido às condições climáticas favoráveis à manutenção do ciclo viral (GUZMÁN, KOURI, 2004). O Brasil é um país tropical que apresenta condições ecológicas favoráveis para a transmissão de arbovírus por apresentar mais de 1/3 do território recoberto por florestas tropicais (VASCONCELOS et al., 2005; FIGUEIREDO, 2007).

Os vírus pertencentes às famílias *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) e *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*), dentre os quais podemos destacar *Dengue virus* (DENV), *Yellow fever virus* (YFV), *Saint Louis encephalites virus* (SLEV), *Rocio virus* (ROCV), *Mayaro virus* (MAYV) e *Oropouche virus* (OROV), são responsáveis por aproximadamente 95% das doenças causadas por arbovírus no Brasil (VASCONCELOS et al., 1998). Estes vírus podem produzir surtos epidêmicos esporádicos ou epidemias de grandes proporções (VASCONCELOS et al., 2005; FIGUEIREDO, 2007; BERNARDES-TERZIAN, 2009; MONDINI et al., 2009).

A manutenção dos arbovírus na natureza ocorre através de ciclos silvestres complexos com participação de espécies de vertebrados silvestres (aves, roedores, marsupiais, primatas, morcegos, répteis e outros) e artrópodes hematófagos (mosquitos, carrapatos, ácaros, simulídeos e tabanídeos) (NATHASON, 2007). No entanto, mudanças ecológicas no habitat natural destes vírus podem acarretar alterações em seus ciclos, e uma consequente adaptação a novos reservatórios, contribuindo para sua dispersão e o risco de emergência (FIGUEIREDO, 2007; PETERS, 2007).

Após a picada por um vetor infectado, a multiplicação ocorre geralmente no sítio de inoculação e as células dendríticas humanas são um dos alvos primários destes vírus,

como é o caso do DENV. Posteriormente, o vírus é transmitido para a corrente sanguínea e circula livremente até atingir células alvo (cérebro, fígado, pele e vasos). Após a infecção, há um período de incubação durante o qual ocorre multiplicação viral, sendo que sua intensidade e localização determinarão o aparecimento de manifestações clínicas, como febre acompanhada de mal-estar, cefaléia, náuseas, vômitos e mialgia. Neste estágio, a doença pode terminar ou exibir manifestações hemorrágicas secundárias (LUPÍ et al., 2007).

Infecções por arbovírus podem levar a quatro formas clínicas distintas, dentre as quais se destaca a doença febril (causada por praticamente todos os arbovírus patogênicos ao homem), doença febril com exantema, febre hemorrágica e encefalite (causada por diversos membros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae*). No entanto, sintomatologia inespecífica pode ser observada nas infecções por diferentes arbovírus, especialmente na fase aguda, dificultando o estabelecimento de um provável agente etiológico pelo médico assistente (FONSECA, 2002; VASCONCELOS et al., 2005).

2.2 Família *Flaviviridae* – Gênero *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* é constituída por quatro gêneros, *Flavivirus* (53 espécies), *Hepacivirus* (1 espécie), *Pestivirus* (4 espécies) e *Pegivirus* (2 espécies), entretanto apenas os *Flavivirus* contêm representantes no grupo dos arbovírus (ICTV, 2012).

Os flavivirus são vírus de morfologia esférica, envelopados, com 40 a 60nm de diâmetro e possuem projeções na superfície do envoltório. Apresentam RNA de fita simples não segmentado, linear, de polaridade positiva, com aproximadamente 11000 nucleotídeos. Possui uma única fase aberta de leitura (ORF- *open reading frame*), a qual leva à formação de um único polipeptídeo, que é processado por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais (capsídeo (C), proteínas precursoras de membrana (prM) ou de membrana (M) e do envelope (E)) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade (ACOSTA-BAS, GÓMEZ-CORDERO, 2005; FONSECA, FIGUEIREDO, 2005; ROMANOS, 2008; WHO, 2009). A ORF é flanqueada por duas regiões não codificantes (NCR- *noncoding region*) a 3'NCR e a 5'NCR, a qual apresenta CAP (Figura 1). As regiões não codificantes são importantes para a regulação e expressão das proteínas virais

(CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH, RICE, 1999; VASCONCELOS, 2003; FONSECA, FIGUEIREDO, 2005).

As funções de todas as proteínas virais ainda não foram totalmente estabelecidas; sabe-se que as proteínas estruturais são incorporadas ao vírus durante a maturação e liberação viral e as proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação nas células infectadas e por interações com o hospedeiro (MONATH, 2001).

A proteína do capsídeo (C), menor proteína estrutural (13-14 kDa), forma o nucleocapsídeo viral e está envolvida no transporte da proteína prM (precursora da proteína M) ao retículo endoplasmático para ser glicosilada (CHAMBERS, 1990; KNIPE, PETER, 2007).

A proteína do envelope (E), maior proteína estrutural do vírus (51-60 kDa), é responsável por atividades biológicas no ciclo viral (CHAMBERS, 1990). Alterações na proteína E são consideradas de suma importância, pois a mesma é exposta na superfície do vírus e representa o antígeno viral dominante que confere resposta imune protetora por estimular a produção de anticorpos neutralizantes, inibidores de neutralização e anti-fusão, além de ser responsável pela montagem da partícula viral, interação com receptores celulares e fusão com a membrana celular do hospedeiro (CHEN et al., 1996; HEINZ, ALLISON, 2003; KNIP, PETER, 2007).

Com relação a sua estrutura, a proteína E apresenta três domínios distintos: domínio I ou domínio central, o domínio II e o domínio III envolvidos na produção *in vivo* e *in vitro* de anticorpos neutralizantes contra DENV (WAHALA et al., 2009; DEJNIRATTISAI et al., 2010; AZEVEDO et al., 2011) (Figura 2). Esta estrutura foi confirmada em vários Flavivirus por estudos de cristalografia de raios-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, incluindo DENV-1 (NAYAK et al., 2009), DENV-2 (MODIS et al., 2003), DENV-3 (MODIS et al., 2005) e DENV-4 (VOLK et al., 2007).

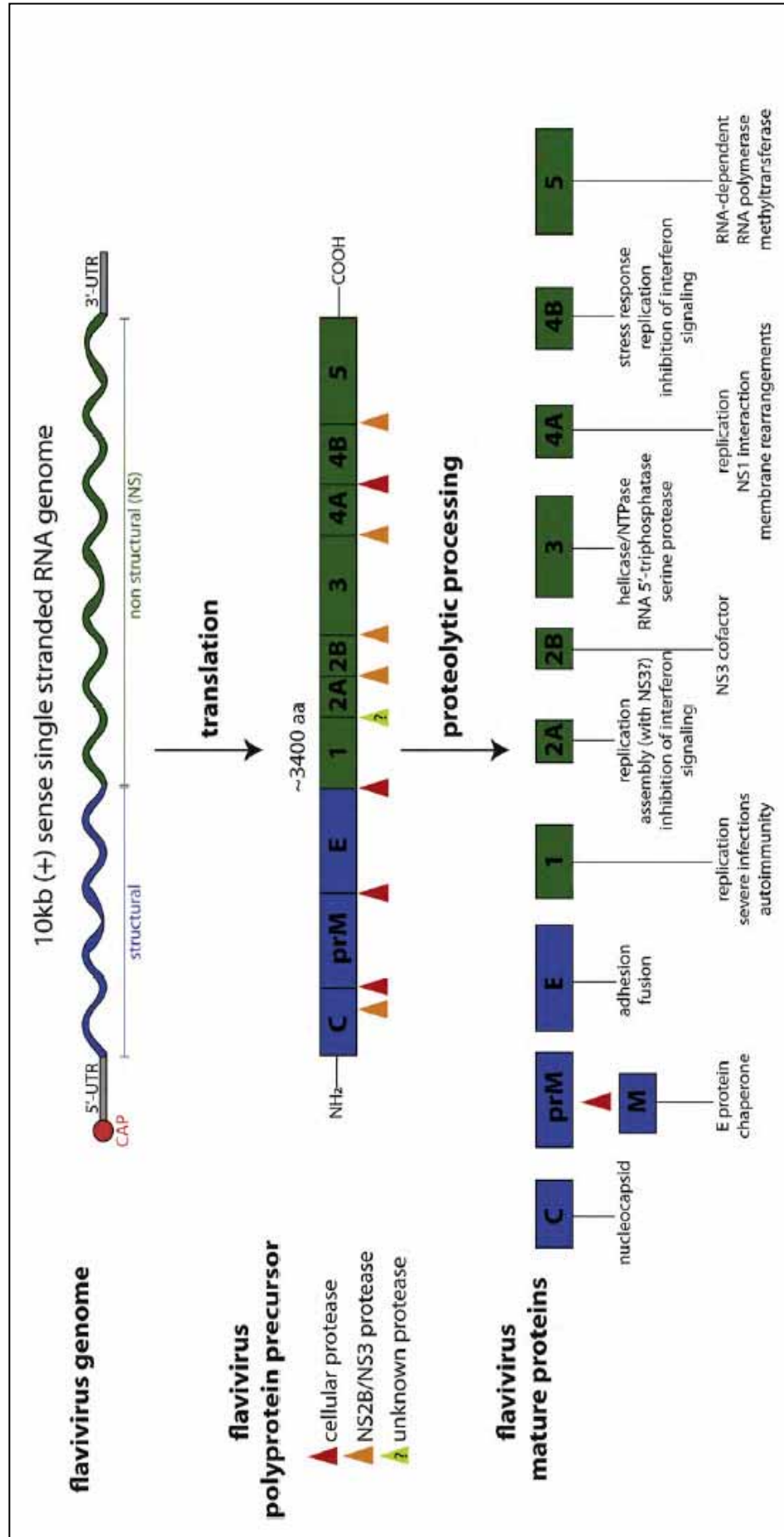


Figura 1. Organização genômica dos Flavivirus. Uma única fase de leitura (ORF) codifica uma poliproteína precursora que é processada em 3 proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e NS5). Fonte: Pastorino et al, 2010.

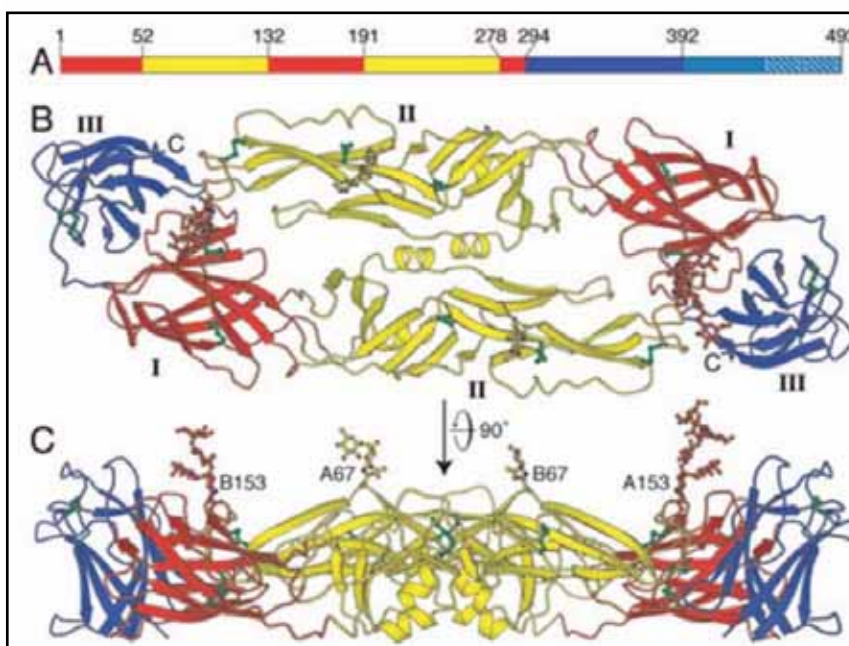


Figura 2. Estrutura do dímero da proteína E do DENV-3 na partícula viral madura. (A) Representação linear da sequência da proteína E com seu ectodomínio (aminoácidos 1 a 392) e sua região haste-âncora (aminoácidos 392-493). O ectodomínio é composto por três domínios: domínio I em vermelho, domínio II em amarelo e domínio III em azul. Dímero de E com visão da superfície do vírion, ao longo do eixo de simetria (B) ou lateral, perpendicular ao eixo de simetria (C). Os dois glicanos nos aminoácidos 67 e 153 estão representados e as pontes dissulfeto estão em verde. Fonte: Modis et al., 2005.

A proteína de membrana (M) (22 kDa) é sintetizada à partir do processamento de sua precursora denominada prM, sendo uma proteína de membrana de partículas virais maduras (MODIS, 2004; CLYDE et al., 2006). A função da prM é estabilizar a proteína E, impedindo a exposição prematura do peptídeo de fusão ao pH reduzido encontrado na via exocítica. A retenção da proteína prM pode afetar a conformação e antigenicidade da proteína E, e reduzir a infectividade viral inibindo a fusão dependente de ácido (HEINZ, ALLISON, 2000).

A proteína NS1 (~46 kDa), participa de forma essencial na replicação do RNA viral, pois estudos de mutagêneses em NS1 demonstram participação na replicação do RNA e produção viral (LINDENBACH, RICE, 1999; KNIPE, PETER, 2007). Essa proteína apresenta regiões altamente conservadas entre os quatro sorotipos do Dengue virus; nesse sentido, é utilizada como antígeno na detecção de anticorpos no soro de pacientes infectados com o DENV (MASRINOUL et al., 2011). Além disso, a proteína NS1 é utilizada na preparação de anticorpos monoclonais utilizados em métodos de diagnóstico baseados na detecção da proteína NS1 durante a fase aguda da doença (ALCON et al., 2002). Por outro lado, sabe-se que a proteína NS1 induz proteção imune em modelo animal, o que poderia ser explorado para a produção de uma vacina eficiente contra a dengue (OLIVEIRA, QUINTANA, 2013).

A NS2a, relativamente pequena (~22 kDa), participa da multiplicação viral e pode estar associada à inibição de Interferon (LINDENBACH et al., 2007). NS2b (~14 kDa) forma um complexo estável com a proteína NS3, agindo como um co-fator necessário para a função serino-protease (KUMMERER, RICE, 2002; ERBEL et al., 2006; KNIPE, PETER, 2007).

A NS3 é uma proteína de aproximadamente 618 a 623 aminoácidos (~68 kDa), altamente conservada entre os flavivirus. É caracterizada como multifuncional pois apresenta atividade serino-protease na sua porção aminoterminal, é uma RNA-helicase RNA-dependente, além de codificar uma atividade de RNA trifosfatase com o propósito de desfosforilar a região 5' terminal do genoma do RNA antes da adição do CAP (MORELAND et al., 2010). Estas características sugerem que a enzima NS3 desempenhe um papel importante durante os eventos da síntese de RNA viral juntamente com a RNA polimerase do vírus conhecida como NS5 (CUI et al., 1998; CHEN et al., 2007).

As proteínas NS4a (~17 kDa) e NS4b (~24 kDa) são hidrofóbicas, associadas à membrana e pouco conservadas entre os flavivirus. Acredita-se que sejam componentes da replicase por formarem complexos com NS2b e NS3 (CHAMBERS et al., 1990; VASCONCELOS, 2003; KNIPE, PETER, 2007).

A proteína NS5 (~103 kDa) é a maior das proteínas virais e altamente conservada entre os flavivirus. Apresenta atividade de RNA polimerase RNA-dependente na região carboxi-terminal e metiltransferase em sua porção aminoterminal (CHAMBERS et al., 1990; KUMMERER, RICE, 2002; VASCONCELOS, 2003; KNIPE, PETER, 2007). Está também envolvida em interação com diversas proteínas celulares (KHROMYKH et al., 1998; HANLEY et al., 2002; MORAIS et al., 2013).

A multiplicação dos flavivirus ocorre dentro do citoplasma de células susceptíveis ao vírus (Figura 3). O ciclo inicia-se com a adsorção do envelope viral a uma gama de receptores celulares específicos. Apesar de existirem questões em aberto sobre as localizações exatas dos epítomos virais, pode ser estabelecido que todos pertencem à proteína do envelope (WU, HUANG, 1999; ROEHRIG et al., 2004; CHEN et al., 2007; SOARES, CALIRI, 2013).

Após a adsorção viral, é dado início o processo de penetração celular por endocitose mediada por receptores, por exemplo, pela proteína citoplasmática clatrina. Esse processo não é muito eficiente, estima-se que apenas uma pequena porcentagem de vírus adsorvidos é efetivamente interiorizada e fundida com a membrana endossomal (VAN DER SCHAAR et al., 2007). Com a adsorção do vírus à membrana plasmática, a célula hospedeira é sinalizada a envolver o vírus até englobá-lo em uma vesícula, a qual recebe denominação de endossomo. O endossomo tem a função primária de ataque químico ao material englobado por

acidificação de seu interior, o que é alcançado pelo transporte ativo de íons H^+ para o interior do endossomo. Ao mesmo tempo em que esta pré-digestão ocorre, o endossomo transporta seu conteúdo para ser depositado no lisossomo, organela responsável pela grande parte da hidrólise celular (SOARES, CALIRI, 2013).

No momento da fusão, o vírus sofre o processo de desnudamento, liberando seu material genético no citoplasma, onde ocorre a tradução. Enquanto isso, a replicação do RNA viral ocorre em complexos membranosos induzidos pelas proteínas virais não estruturais (WESTAWAY et al., 1997). A montagem da partícula viral ocorre nas membranas derivadas do retículo endoplasmático rugoso (RER), de onde os vírus “brotam” na forma imatura (não-infecciosa). Em seguida, o vírus entra na via de exocitose e, enquanto percorre a rede trans-Golgi (TNG) (ZYBERT et al., 2008), sofre mudanças conformacionais devido à diminuição do pH no microambiente das vesículas, e pouco antes da sua liberação ao meio extracelular, as proteínas prM são clivadas pela endoprotease furina (presente na TNG), dando origem à proteína transmembrana M (WENGLER, WENGLER, 1989; MACKENZIE, WESTAWAY, 2011). Este processo modifica a estrutura da superfície viral, exportando o vírus maduro (infeccioso). Após certo patamar de infecção viral, o estresse sofrido pela produção excessiva de proteínas virais pela célula hospedeira a leva ao desencadeamento do ciclo apoptótico, causando sua morte (COURAGEOT et al., 2003).

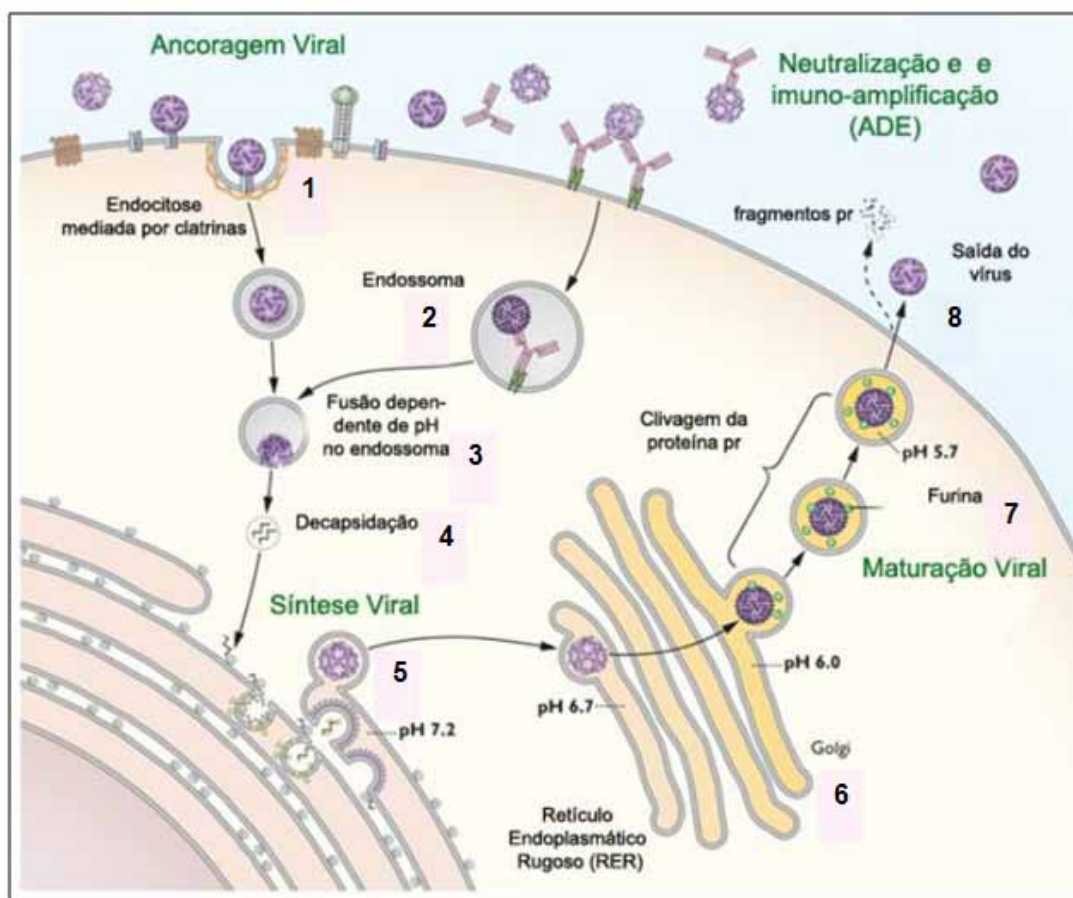


Figura 3. Ciclo de replicação viral do gênero *Flavivirus*. Fonte: modificado Pierson (2012). (1) adsorção, (2) endocitose, (3) fusão à membrana em pH baixo, (4) desnudamento e liberação do RNA, (5) montagem da partícula viral, (6) vírus entra na via de exocitose, (7) proteínas prM são clivadas pela endoprotease furina dando origem à proteína transmembrana M, (8) liberação do vírus maduro.

2.2.1 Dengue virus (DENV)

Mais de 50% dos flavivirus estão associados com doença em humanos, incluindo alguns dos mais importantes patógenos humanos, como DENV, YFV e *West Nile virus* (WNV) (WEAVER, VASILASKIS, 2009).

O DENV pertence ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) com quatro sorotipos antigenicamente distintos (1 a 4). A dinâmica de circulação desses vírus na população humana é complexa e durante a circulação de um sorotipo, por longos períodos, a tendência é que ele desapareça devido ao desenvolvimento de imunidade na população (BURKE, MONATH, 2001; HOLMES, TWIDDY, 2003; FIGUEIREDO, 2007; KYLE, HARRIS, 2008).

Através do sequenciamento de determinadas regiões do genoma viral tem-se procurado identificar os genótipos dos sorotipos do DENV. O gene E tem sido comumente utilizado devido à importância do seu produto na adsorção e penetração do vírus na célula e, principalmente, na resposta humoral do hospedeiro humano, além de ser demonstrado que

mutações nesse gene podem resultar no aumento da virulência dos vírus (FOSTER et al., 2003; GARDELLA-GARCIA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009; ITO et al., 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997), a classificação de risco de dengue foi baseada no nível patofisiológico de progressão da doença: Febre do Dengue (*Dengue Fever* - DF), Febre Hemorrágica do Dengue (*Dengue Hemorrhagic Fever*) e Síndrome do Choque do Dengue (*Dengue Shock Syndrome* – DSS), tal classificação foi revisada em 2009 com o objetivo de tornar mais eficaz a identificação de pacientes com risco maior de desenvolver complicações pela dengue. Neste novo sistema, considerado mais efetivo na identificação de casos graves, a dengue seria classificada em: dengue sem sinais, dengue com sinais de alerta (dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de líquido, sangramento de mucosas, letargia, hepatomegalia e aumento de hematócrito com diminuição de plaquetas) e dengue grave (dengue com grave extravasamento de plasma, sangramento ou falência de órgãos), utilizando sinais e sintomatologia clínica de acordo com a gravidade da doença. Embora a classificação de 2009 seja mais efetiva para ser utilizada na prática clínica, a sua utilização na avaliação da epidemiologia e pato-fisiologia da doença ainda precisa ser avaliada (LIMA et al., 2013).

2.3 Transmissão do DENV

O DENV possui dois ciclos de transmissão: ciclo silvestre e o ciclo urbano. Ambos envolvem hospedeiros vertebrados e não-vertebrados (vetor). O ciclo silvestre pode servir como fonte de variabilidade genética e de novos genótipos para o ciclo urbano. O ciclo de transmissão silvestre foi detectado e estudado na Ásia e África. Na Ásia, envolve mosquitos do gênero *Ochlerotatus* como principais vetores e macacos dos gêneros *Macaca* e *Presbytis*. Na África, diversas espécies de mosquitos do gênero *Aedes* (*A. luteocephalus*, *A. furcifer* e *A. taylori*) agem como vetores e macacos da espécie *Erythrocebus patas* são os hospedeiros finais (DIALLO et al., 2003). Recentemente foram isolados genótipos silvestres dos quatro sorotipos em vários mamíferos de floresta como morcegos, roedores e marsupiais (DE THOISY et al, 2004; 2009).

O ciclo de transmissão urbana “homem – mosquito – homem” tem como principais vetores os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e os humanos como hospedeiros definitivos (GUBLER, 1998; COSTA, 2001; WU et al., 2010). A transmissão ocorre principalmente em áreas temperadas e tropicais, que favorecem a infestação pelo mosquito, e tem sua maior disseminação no verão.

O *A. aegypti* é o mais importante vetor devido a sua antropofilia e seus hábitos urbano-domésticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1997). A fase de transmissão da doença compreende dois ciclos: um intrínseco que ocorre no ser humano e outro extrínseco, que ocorre no mosquito (Figura 4). A transmissão do ser humano para o mosquito ocorre enquanto houver presença de vírus no sangue do ser humano (período de viremia). Este período começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o sexto dia da doença. No mosquito, após um repasto de sangue infectado, o vírus vai se localizar nas glândulas salivares da fêmea do mosquito, onde se multiplica depois de 8 a 12 dias de incubação; a partir desse momento, o mosquito está apto a transmitir o vírus (BRASIL, 2002).

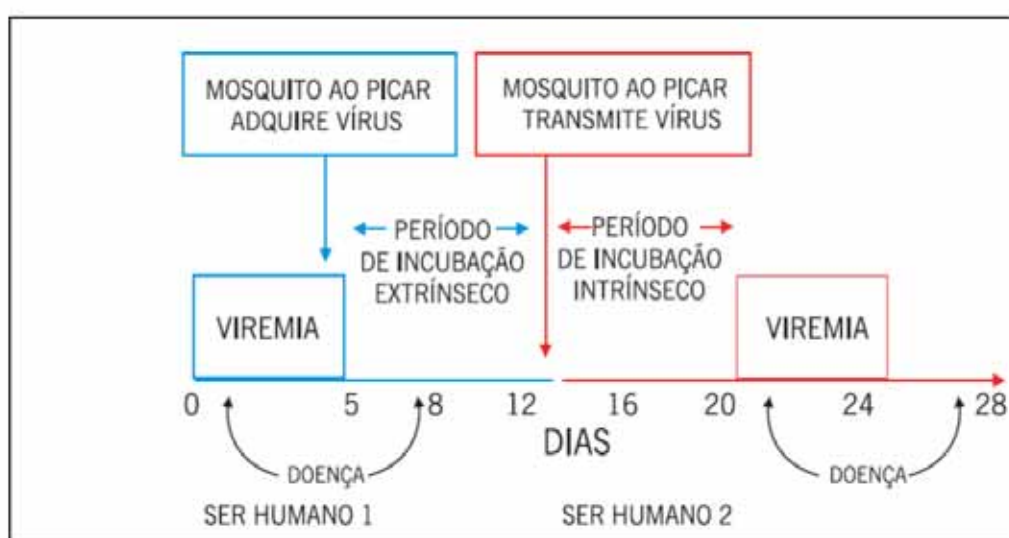


Figura 4. Transmissão e viremia do dengue. Fonte: BRASIL, 2008.

Apesar do ciclo “homem – mosquito – homem” ser considerado o padrão de transmissão da dengue em suas formas endêmica ou epidêmica, existe outro mecanismo pelo qual o DENV é mantido em natureza, denominado de transmissão transovariana ou vertical, mecanismo pelo qual o mosquito transmite o vírus para a sua prole (GUBLER et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010).

O mosquito *A. aegypti* é altamente domesticado, faz sua oviposição em reservatórios artificiais no peridomicílio, ou seja, na água acumulada em vasos de flores, pneus de automóveis, baldes, objetos descartados, lixo em geral, beirais de telhado, caixas d’água abertas etc. Os ovos são depositados alguns milímetros acima da linha da água, fixando-se à parede do recipiente e resistindo a dessecação permanecendo viáveis nestas condições por mais de um ano, de modo que não adianta esvaziá-los, pois a eclosão ocorrerá assim que forem novamente enchidos, em geral pela chuva (GUBLER, 1998). A postura dos ovos é feita principalmente à tarde, e como os embriões dentro dos ovos não estão prontos para a

incubação, necessitam de dois a três dias em um ambiente bastante úmido para que haja o desenvolvimento completo e passem à fase larvária e daí, mediante metamorfose completa, os ovos seguem seu ciclo de desenvolvimento de larva para pupa, e desta até o mosquito adulto (TORRES, 2005). Os mosquitos adultos possuem pequenos raios de ação, mantendo-se, em geral, toda a vida, a uma distância não superior a 200 metros dos locais de oviposição, embora já tenha sido relatada uma dispersão de até 800 metros (HONÓRIO et al, 2003).

Assim, diante da enorme complexidade do atual ambiente antrópico, torna-se essencial repensar a estratégia de controle da doença, uma vez que até o momento, o único elemento controlável da cadeia epidemiológica da dengue é o seu vetor *A. aegypti*. Dessa forma, é fundamental o conhecimento da produtividade dos diversos tipos de criadouros em meio urbano, dos condicionantes ambientais, da presença e dinâmica do DENV nos mosquitos, sendo de grande relevância para se compreender a dinâmica de transmissão da doença (MEDRONHO, 2006).

2.4 Epidemiologia do DENV

O primeiro caso documentado de uma doença com sintomas similares a dengue era chamada pelos chineses de “veneno da água” (NOBUCHI, 1979). Em referência a períodos posteriores, em 1635, nas Índias Ocidentais Francesas, e em 1699, no Panamá, há indícios de que surtos de uma doença também poderia ter sido dengue (HOWE, 1977). De acordo com este padrão, é bem provável que a dengue, ou alguma doença similar já era bem distribuída geograficamente antes do século XVIII, que foi quando a primeira pandemia conhecida de dengue começou, com relatos de surtos em Jacarta (Indonésia) e Cairo (Egito), em 1779, e no estado americano da Filadélfia, em 1780 (CAREY et al, 1969). À partir desse ponto até por volta da década de 1940, a dengue tem surgido em epidemias relativamente infrequentes, já que os pacientes suscetíveis contraíam a doença algum tempo após sua chegada em grandes centros urbanos tropicais, o que sugere o estabelecimento de endemicidade do vírus (SOARES, CALIRI, 2013).

A Segunda Guerra Mundial (1939-1945) foi responsável por um grande fluxo humano no globo e consequente ruptura ecológica de ambientes naturais do sudeste asiático e do pacífico, criando condições ideais para a amplificação da disseminação de doenças transmitidas por mosquitos. Foi nesse cenário que uma pandemia se estabeleceu com disseminação aumentada e emergência de hiperendemicidade (co-circulação de mais de um sorotipo de vírus), principalmente no sudeste asiático (HALSTEAD, 1980; HALSTEAD, 1992).

Durante as duas últimas décadas, a incidência da infecção por DENV tem aumentado consideravelmente em áreas endêmicas, particularmente na região das Américas, em que os vírus têm mostrado uma característica hiperendêmica (GUBLER, 1998). No Brasil, as regiões Centro-Oeste e Sudeste lideraram em número notificações em 2013, com 80.976 e 80.876 casos, respectivamente, o que equivale a 79% dos casos notificados no país. Nas demais regiões foram notificados os seguintes números: Norte (18.435), Nordeste (11.943) e Sul (12.420) (PAHO, 2013).

Segundo Ministério da Saúde, todas as regiões do país reduziram o número de casos no primeiro bimestre de 2014. A região Sudeste obteve a maior redução, passou de 232,5 mil notificações em 2013 para 36,9 mil este ano. Em segundo lugar está o Centro-Oeste, que passou de 122,8 mil (2013) registros para 28,2 mil (2014); seguido do Nordeste, que teve queda de 29,6 mil (2013) para 7,9 mil (2014); Norte, de 22,3 mil (2013) para 6,9 mil (2014) e Sul, de 20,3 mil (2013) para 6,9 mil (2014) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente no Brasil ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista (região Norte), com detecção de DENV-1 e DENV-4 (OSANAI et al., 1983). Na epidemia de 1986, foi identificada a ocorrência da circulação de DENV-1, inicialmente no estado do Rio de Janeiro, disseminando-se, a seguir, para outros seis estados até 1990. Nesse ano, foi identificada a circulação de um novo sorotipo, o DENV-2, também no estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 1990). O DENV-3 foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1998, em São Paulo, de um paciente com história de viagem recente à Nicarágua, país que tinha sido a porta de entrada deste sorotipo nas Américas, em 1994 (ROCCO et al., 2001). Entretanto, o primeiro caso autóctone causado por DENV-3 só foi notificado em janeiro de 2001, no município de Nova Iguaçu (Rio de Janeiro), confirmando assim a introdução deste sorotipo no Brasil (NOGUEIRA et al., 2001). Em 2002, foi observada a maior incidência da doença, refletindo a introdução do DENV-3. Essa epidemia levou a uma rápida dispersão do DENV-3 para outros estados, sendo que, em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Como mencionado anteriormente, DENV-4 apresentou uma breve circulação no Brasil em 1982, em uma epidemia em Boa Vista (região Norte), com detecção de DENV-1 e DENV-4 (OSANAI et al., 1983). Nenhum outro caso de infecção tinha sido registrado no país até 2008, quando o vírus foi detectado em três pacientes, sem história de viagem internacional, em Manaus (FIGUEIREDO et al., 2008). O DENV-4 reemergiu no país em 2010 nos municípios de Boa Vista e Cantá, localizados no estado de Roraima (NAVECA et al., 2012),

se disseminando por diversas regiões do Brasil, com casos registrados na região Norte (Roraima, Amazonas e Pará), Nordeste (Bahia, Pernambuco, Piauí) e Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; SOUZA et al., 2011; TEMPORÃO et al., 2011; BASTOS et al., 2012).

São José do Rio Preto (SJRP), localizada na região noroeste do estado de São Paulo, a 452 km da capital e a 489 m acima do nível do mar (20°49'1" latitude sul e 49°22'46" longitude oeste), está entre as cidades brasileiras com qualidade de vida comparável a países desenvolvidos (Índice de Desenvolvimento Humano 0,834) que vem apresentando circulação endêmica de dengue durante vários anos. A área total do município é de 431.963 km² com densidade demográfica de aproximadamente 945,12 habitantes/km². A temperatura média anual é de 25,3°C. O município se encontra em uma área de transição entre cerrado e mata atlântica. De acordo com o último levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2013, a população estimada foi de 434.039 habitantes. O município conta com 2.852 indústrias e sua economia está baseada no comércio, indústria, agronegócios e prestação de serviços. O Produto Interno Bruto (PIB) total é de R\$ 6.528.792,00 PIB e o PIB per capita é de R\$ 16.210,00 (CONJUNTURA SOCIOECONÔMICA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, 2010).

O primeiro caso autóctone de dengue foi relatado em 1990 (CHIARAVALLOTTI-NETO, 1996) quando DENV-1 foi introduzido no município. DENV-2, DENV-3 e DENV-4 foram introduzidos, respectivamente, em 1998 (ADOLFO LUTZ INSTITUTE – dados não publicados), 2005 (MONDINI et al., 2009) e 2011 (SOUZA et al. 2011). A chegada do DENV-4 na região já era alvo de preocupações (introdução de um sorotipo invasor que não encontra indivíduos pré-imunizados sendo eles possivelmente suscetíveis, causando rápida propagação da epidemia em um número maior de pessoas), o que foi confirmado com o surto de 2013, visto que esse foi o sorotipo predominante, detectado em mais de 50% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.5 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico virológico moderno tem como característica importante o uso de vários métodos para detecção da infecção viral, sendo de grande importância para a saúde pública, pois auxiliam no diagnóstico de pacientes e no monitoramento da dispersão do vírus nas diferentes regiões do país. O diagnóstico específico pode ser feito por isolamento viral, reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa (RT-PCR), *Real-Time* PCR, detecção do antígeno, sequenciamento do genoma viral e métodos sorológicos (DE PAULA,

FONSECA, 2004; GUZMAN et al., 2010; SIMMONS et al., 2012). Entretanto, a realização de testes específicos depende basicamente da relação entre a data da coleta da amostra e do início dos sintomas, da qualidade e do tipo de amostra, da quantidade do material obtido, assim como das condições de transporte as quais a amostra foi submetida (STORCH, 2007).

O método comumente utilizado no diagnóstico laboratorial do DENV é o isolamento viral em camundongos recém-nascidos, culturas celulares ou em mosquitos (VORDNAM, KUNO, 1997; GUBLER, 1998; GUZMÁN, KOURI, 2004), seguido de imunofluorescência Indireta (IFI). O método de isolamento em mosquitos é o melhor em termos de sensibilidade, entretanto, as linhagens de células de *Aedes albopictus* (clone C6/36) e de *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) constituem o sistema de eleição utilizado para o diagnóstico de rotina, por ser mais econômico e também por possuir uma boa sensibilidade (GUZMÁN, KOURI, 2004).

Os testes sorológicos baseiam-se na pesquisa de anticorpos específicos contra o vírus; servem como meio alternativo para a presunção do diagnóstico do DENV. Dentre as várias técnicas sorológicas, os métodos de inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, teste de neutralização e ensaio imunoenzimático (ELISA) para captura de anticorpos IgM são os mais utilizados. Contudo, as três primeiras técnicas exigem coleta de amostras pareadas e, além disso, exibem alta reatividade cruzada, o que dificulta a especificidade do diagnóstico, enquanto que o ELISA para captura de anticorpos IgM requer somente uma amostra de soro, coletada à partir do sexto dia após início dos sintomas, sendo por isso o teste sorológico de escolha para a detecção de anticorpos específicos na fase aguda da doença (DE PAULA, FONSECA, 2004; PEELING et al., 2010).

Recentemente, a detecção do antígeno NS1 (presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia da doença) em amostras de soros de pacientes em fase virêmica, tem demonstrado ser um método alternativo eficiente para o diagnóstico rápido, sensível e específico da infecção por DENV (BESSOFF et al., 2008; DUSSART et al., 2008; SHU et al., 2009; HUHTAMO et al., 2010). No entanto, outros estudos vêm apresentando resultado falso negativo com a utilização de kits comerciais para detecção do antígeno NS1 (KOSASIH et al., 2013; SEA et al., 2013).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, a detecção de sequências específicas do genoma viral permite eliminar alguns dos problemas encontrados na utilização de métodos sorológicos como, sensibilidade, especificidade e tempo, sendo este de grande importância em situações de epidemia (SAMUEL, TYAGI, 2006).

Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) configura-se como um avanço no diagnóstico do DENV, fornecendo resultados rápidos e precisos, além de permitir a detecção de quantidades reduzidas de ácido nucléico viral presente nos espécimes (STORCH, 2007; BERNARDES-TERZIAN, 2009; MONDINI et al., 2009).

Os métodos de *Multiplex*-PCR associados ao *Nested*-PCR permitem a detecção de mais de um vírus em uma única amostra, bem como de co-infecções, gerando economia de tempo e dinheiro, sem comprometer a qualidade do teste (KAO, 2005; FIGUEIREDO et al., 2011). O uso da técnica de *Nested*-PCR é complementar a RT-PCR, sendo indicado para amostras clínicas que apresentam baixo título viral. Esta técnica tem como objetivo aumentar a sensibilidade e especificidade, tornando o resultado mais preciso (LAM, 2007). A metodologia desenvolvida por Bronzoni e colaboradores (2005) para a detecção e identificação de arbovírus brasileiros, pertencentes aos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*, apresenta grande aplicabilidade no diagnóstico diferencial de febres agudas e com características clínicas inespecíficas, principalmente em regiões onde co-circulam estes diferentes vírus.

À partir da identificação viral e sequenciamento nucleotídico é possível a realização de estudos filogenéticos que permitem a diferenciação entre os arbovírus e entre os genótipos existentes. A análise pode ser realizada quando se compara a sequência nucleotídica com as variáveis biológicas do vírus, tais como localização geográfica, organismos hospedeiros, virulência, tropismo e o modo de transmissão. Desta forma, as informações obtidas permitem determinar, principalmente, a origem e a relação entre os arbovírus circulantes tanto no país como em outros países, e como a doença se disseminou na população, e à partir disso, propor medidas de controle para arbovírus emergentes e re-emergentes (HOLMES, BURCH, 2000).

2.6 Monitoramento epidemiológico

O monitoramento da circulação viral configura-se como uma importante ferramenta epidemiológica da doença, uma vez que quando se identificam as características de diferentes sorotipos, é possível determinar a magnitude e a gravidade de uma epidemia (DIBO et al., 2005; REGIS et al 2014). Com a análise molecular pode-se também detectar a circulação de outros vírus em meio a epidemias, como por exemplo, a do DENV, e desencadear medidas de prevenção e controle diferenciadas para cada vírus (MONDINI, CHIARAVALLLOTI-NETO, 2007; BERNARDES-TERZIAN et al., 2009).

A densidade da população humana é um fator fundamental para definir o padrão de transmissão, pois, em cidades médias e grandes, a probabilidade de ocorrer a transmissão de

dengue e de outros arbovírus é maior, devido a infestação por diversos vetores. Com o aumento da disseminação do vetor ao redor do mundo e com a falta de uma vacina específica para dengue, ferramentas para captura e monitoramento do vetor tem ajudado os programas de controle em áreas urbanas (REGIS et al., 2014).

Dentro desta expectativa, o uso de ferramentas de análise espacial é considerado um importante instrumento na gestão em saúde, permitindo que a distribuição das doenças seja analisada tanto no espaço como no tempo. O primeiro relato dessa associação foi utilizada em 1.854 por John Snow durante a epidemia de cólera (CÂMARA et al., 2004). Dados espaciais, sociais, ecológicos, virológicos, sorológicos e epidemiológicos são combinados para possibilitar a análise de variáveis que pode apresentar papel fundamental na transmissão de doenças (GOMEZ-DANTES et al., 1995; CLARKE et al., 1996; PEYREFITTE et al., 2005; MONDINI et al., 2009; REGIS et al., 2014).

2.7 Origem, diversidade genética e evolução do DENV

Existe forte evidência de que os quatro sorotipos do DENV são resultantes de introduções independentes na espécie humana à partir de macacos (HOLMES, TWIDDY, 2003).

Wang e colaboradores (2000) propuseram que esses eventos ocorreram na região Asiático-Oceânica, no entanto, a localização exata (Ásia ou Oceania) não foi possível pela limitação na quantidade de amostras silvestres, principalmente da região Asiática. A baixa diversidade genética das linhagens silvestres e consequente imunidade cruzada total podem ter forçado uma origem alopátrica (populações que não se sobrepõem geograficamente) dos diferentes sorotipos, ou seja, quatro introduções em regiões distintas. A imunidade cruzada total levaria a exclusão de linhagens diferentes (no caso, os sorotipos) que ocupassem o mesmo nicho. Após a grande diversificação genética do DENV, que levou a uma imunidade cruzada apenas parcial, é que os sorotipos puderam coexistir.

A maioria das análises filogenéticas mostra a mesma ordem de ramificação entre os quatro sorotipos de DENV (Figura 5), com o DENV-4 como o primeiro a divergir, seguido pelo DENV-2 e pela separação final entre os dois sorotipos DENV-1 e DENV-3 (HOLMES, TWIDDY, 2003). Zanotto e colaboradores (1996) observaram que o início de cladogênese dos quatro sorotipos de DENV ocorreu simultaneamente e coincidiu com o período em que o vírus estabeleceu-se endemicamente em seres humanos, por volta do início do século XX (HALSTEAD, 1997).

Como mencionado anteriormente, evidências sugerem que o DENV é originário de vírus de primatas da Malásia e, assim como outros vírus de RNA, o DENV apresenta uma variabilidade genética associada à sua polimerase RNA-dependente, às suas rápidas taxas de replicação e ao seu tamanho populacional (DRAKE, HOLLAND, 1999; HOLMES, TWIDDY, 2003; WANG et al., 2000). Por essas razões, existe uma considerável variabilidade genética entre eles, que filogeneticamente os define como “genótipos” (HOLMES, BURCH, 2000).

Observando a história evolutiva do DENV, a variabilidade genética entre as espécies é grande e incomum para ser utilizada, no entanto, a variabilidade genética intrasorotípica é menor e dá origem aos subtipos ou genótipos (DEUBEL, 1997).

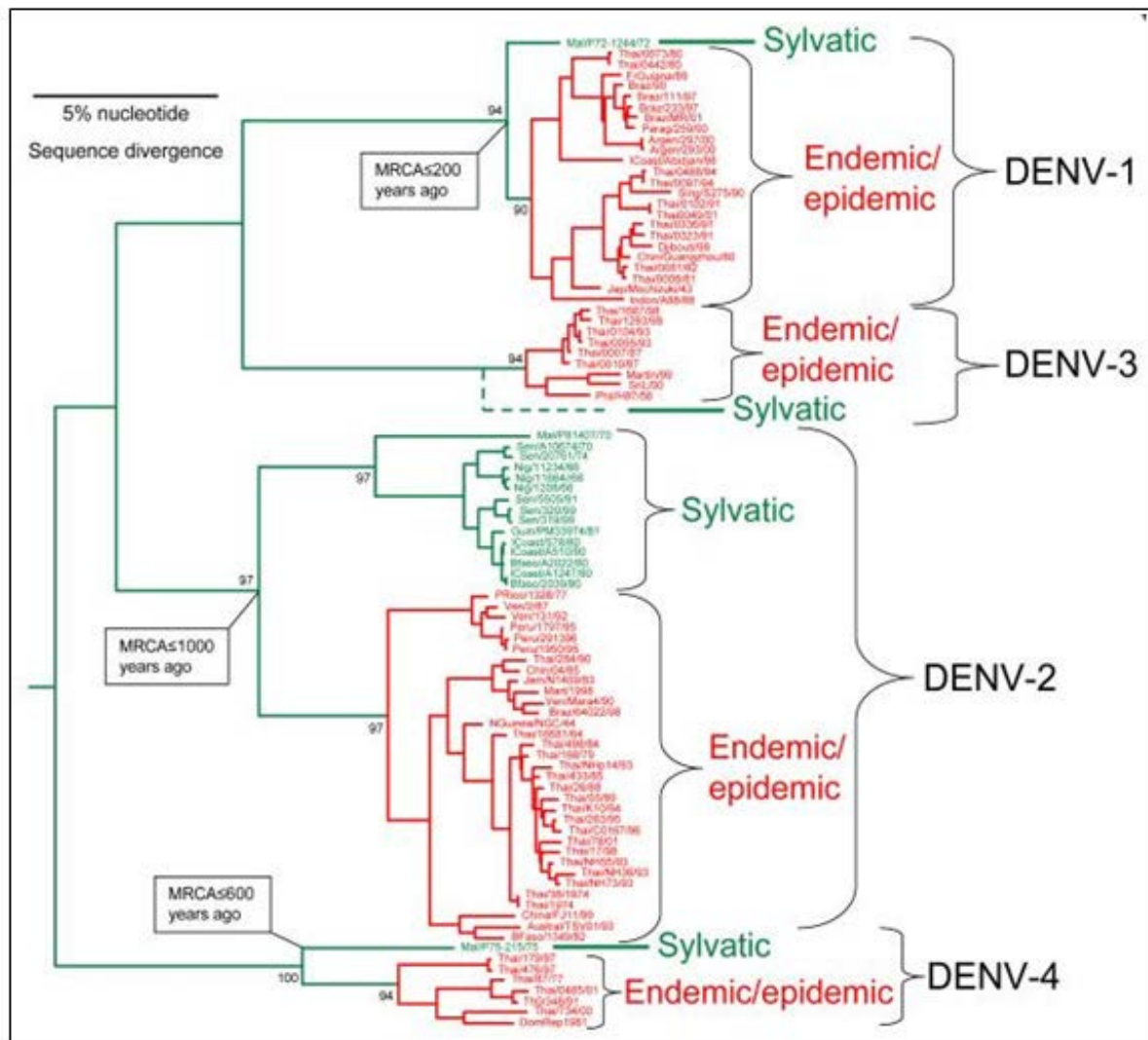


Figura 5. Árvore filogenética com linhagens dos quatro sorotipos de DENV. Fonte: WEAVER, VASILAKIS, 2009.

Não existe uniformidade na classificação do DENV em genótipos, como ocorre com a classificação do vírus em sorotipos, apesar de existir uma tentativa de uniformizá-la. A classificação em genótipos pode variar à medida que os métodos de sequenciamento e os tipos de análises sobre a evolução molecular desses vírus se aperfeiçoam, mas a maioria delas leva em conta a origem geográfica dos isolados primários das amostras virais analisadas, ainda que se observe uma tendência em baseá-la em análises filogenéticas mais robustas (WEAVER, VASILAKIS, 2009).

Em 2011, Chen e Vasilakis, utilizando sequências da proteína E completa, disponíveis no *GenBank*, apresentaram a classificação mais utilizada atualmente. Esta classificação considera a área geográfica dos isolados virais e, em alguns casos, também sua implicação com a gravidade da doença.

a) Genótipos do DENV-1 (Figura 6)

- Genótipo I: representando linhagens do Sudeste Asiático, China e Oriente Médio (Arábia Saudita);
- Genótipo II: representando duas linhagens coletadas na Tailândia durante os anos de 1950 a 1960. Estas linhagens não têm sido isoladas desde então, sugerindo sua extinção ou circulação com baixa frequência em nichos ambientais, levando a não detecção pelos sistemas de vigilância;
- Genótipo III: representando linhagens isoladas na Malásia em 1972 e 2005;
- Genótipo IV: representando as linhagens do Japão, Coreia, China, Mianmar, Malásia e Indonésia; ilhas do oeste do Pacífico (Polinésia Francesa, Nauru, Filipinas e Havaí) e Austrália. As linhagens oriundas do Caribe (1975 a 1985) também são incluídas neste genótipo;
- Genótipo V: representando as linhagens das Américas, oeste da África e Ásia. Inclui também as linhagens isoladas das Ilhas dos arquipélagos do oceano Índico (Comorros, La Reunion e Seicheles).

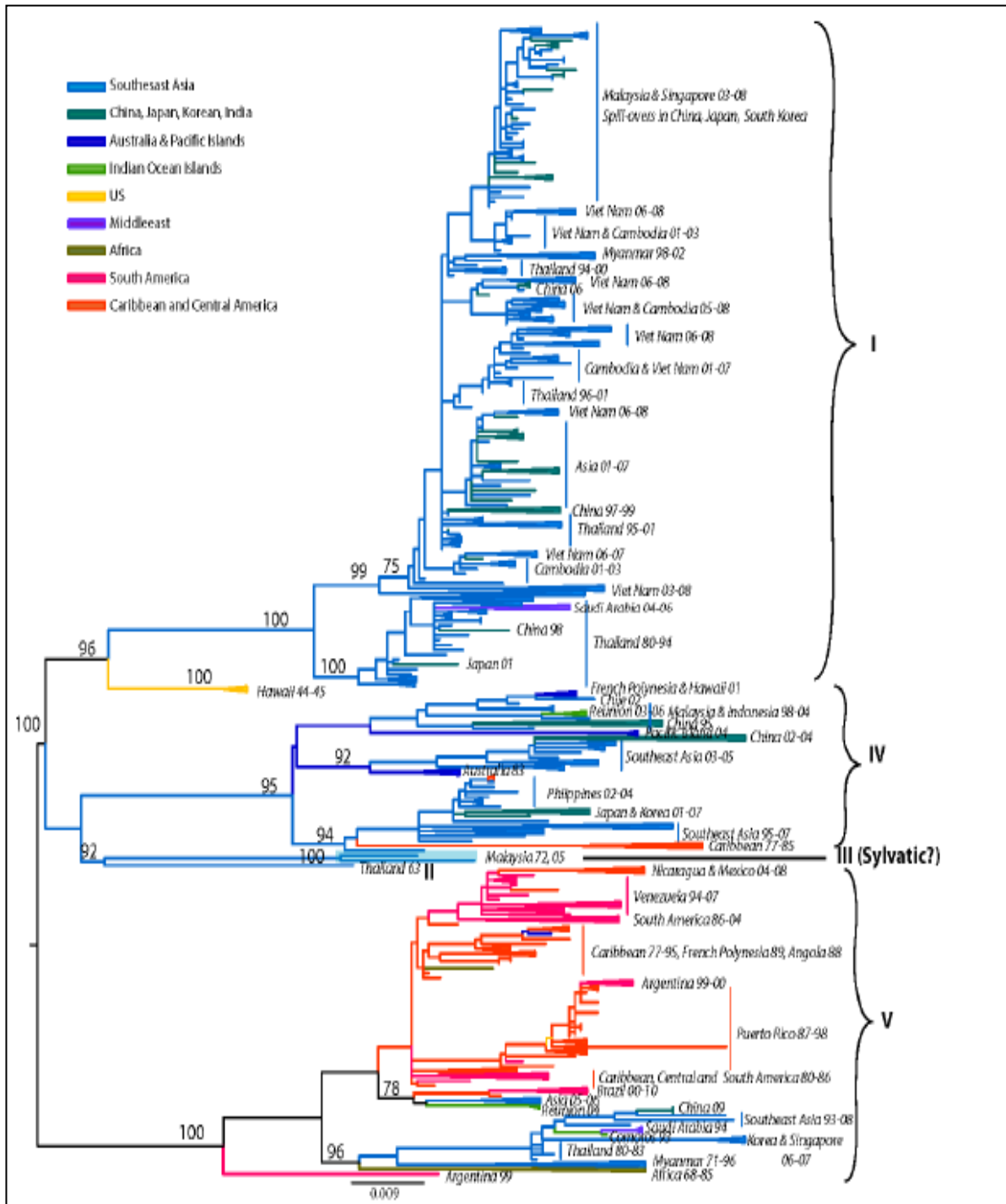


Figura 6. Filogenia do DENV-1. Árvore construída através do método de máxima verossimilhança do DENV-1 com base em sequências completas de nucleotídeos do gene E de todas as linhagens disponíveis no *GenBank*. As linhas coloridas representam regiões geográficas específicas, conforme especificado na figura. Fonte: CHEN, VASILAKIS, 2011.

b) Genótipos do DENV-2 (Figura 7)

- Genótipo asiático I: representando linhagens da Tailândia, incluindo uma linhagem de referência isolada na Tailândia em 1964 de um paciente com dengue grave; Malásia; Camboja; Mianmar; Vietnã e Austrália;

- Genótipo asiático II: representando linhagens da China, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Sri Lanka, Índia, Honduras e México. Este genótipo inclui a cepa protótipo de Nova Guiné, isolada em 1944;
- Genótipo sudeste asiático/americano: representando dois clados. Um em que todas as linhagens foram coletadas no Sudeste da Ásia; e o outro, das amostras coletadas na América Central, América do Sul e Caribe durante os últimos trinta anos;
- Genótipo cosmopolita, previamente denominado genótipo IV: representando linhagens distribuídas em uma larga área geográfica, incluindo leste e oeste da África, Oriente Médio, subcontinente indiano, Ilhas do Pacífico e Austrália;
- Genótipo americano, previamente denominado genótipo V: representando as linhagens oriundas das Américas Central e do Sul, Caribe e linhagens mais antigas coletadas no subcontinente indiano e ilhas do Pacífico;
- Genótipo silvestre: representando linhagens de humanos, mosquitos arbóreos e primatas não humanos coletadas no Oeste da África e Sudeste Asiático. Este genótipo é considerado o mais geneticamente distinto, existindo como uma linha basal para todas as outras linhagens de DENV-2, o que reforça a hipótese de que ele representa o genótipo ancestral.

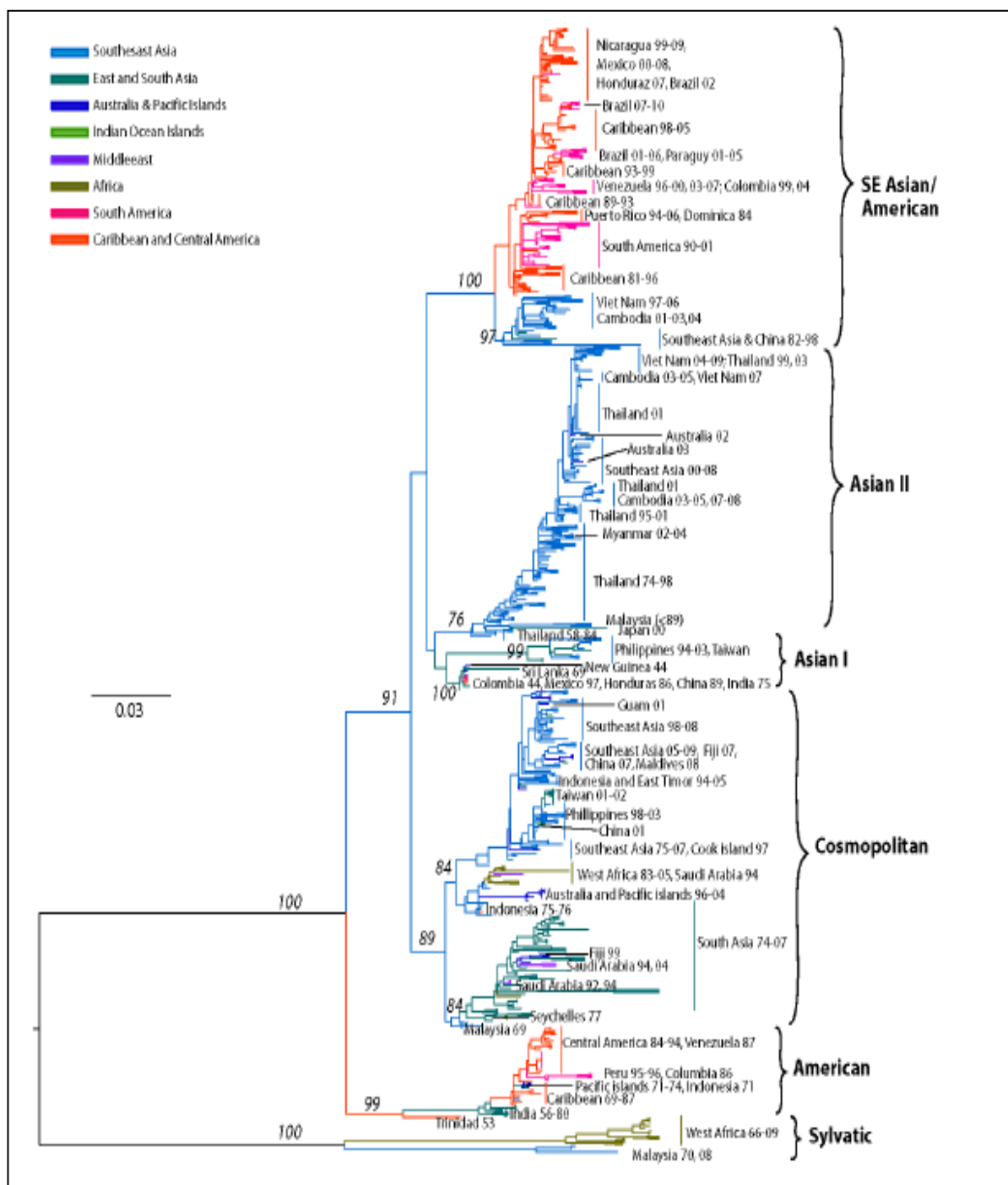
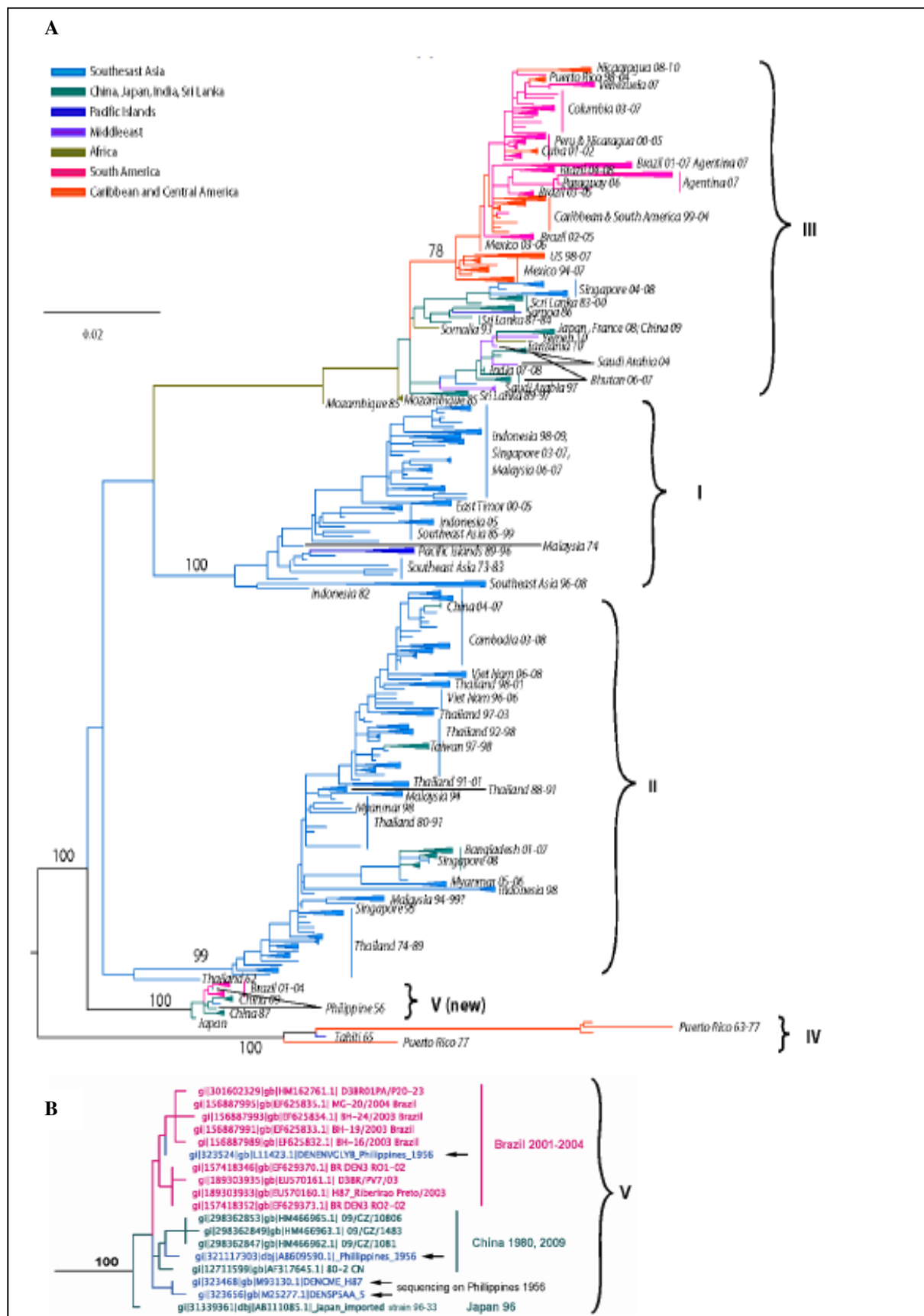


Figura 7. Filogenia do DENV-2. Árvore construída através do método de máxima verossimilhança do DENV-2 com base em sequências completas de nucleotídeos do gene E de todas as linhagens disponíveis no *GenBank*. As linhas coloridas representam regiões geográficas específicas, conforme especificado na figura. Fonte: CHEN, VASILAKIS, 2011.

c) Genótipos de DENV-3 (Figura 8)

- Genótipo I: representando isolados das áreas marítimas do Sudeste da Ásia, principalmente Indonésia, Cingapura, Malásia, Filipinas, Taiwan e Ilhas do Pacífico Sul;
- Genótipo II: representando quase todas as linhagens coletadas na Tailândia de 1962 até recentemente, em várias epidemias; uma única linhagem de Cingapura coletada em 1995; um isolado da Indonésia coletado em 1998; Taiwan; Vietnã; Bangladesh; Camboja; China; Japão e Mianmar;
- Genótipo III: representando isolados da Sri Lanka, Índia, Japão, Taiwan, Cingapura, Samoa, leste da África, América Central, América do Sul e Caribe;
- Genótipo IV: representando linhagens coletadas em Porto Rico (décadas de 60 e 70) e Tahiti;
- Genótipo V: representando a linhagem protótipo das Filipinas, um isolado do Japão (1973), linhagens da China (coletadas em 1987 e 2009) e do Brasil (2002 a 2004).



d) Genótipos do DENV-4 (Figura 9)

- Genótipo I: representando linhagens das Filipinas, Tailândia, Vietnã, Mianmar, Malásia, Sri Lanka, Índia e várias amostras de casos importados do Japão, China e Brasil;
- Genótipo II: representando linhagens de todas as partes do Sudeste Asiático (Indonésia, Malásia, Cingapura), China, Ilhas do oeste do oceano Pacífico, Austrália, Caribe e Américas;
- Genótipo III: representado por cinco linhagens da Tailândia entre 1997 e 2001;
- Genótipo IV: representando as únicas três linhagens silvestres conhecidas de DENV-4, isoladas de macacos sentinelas na Malásia durante os anos 70.

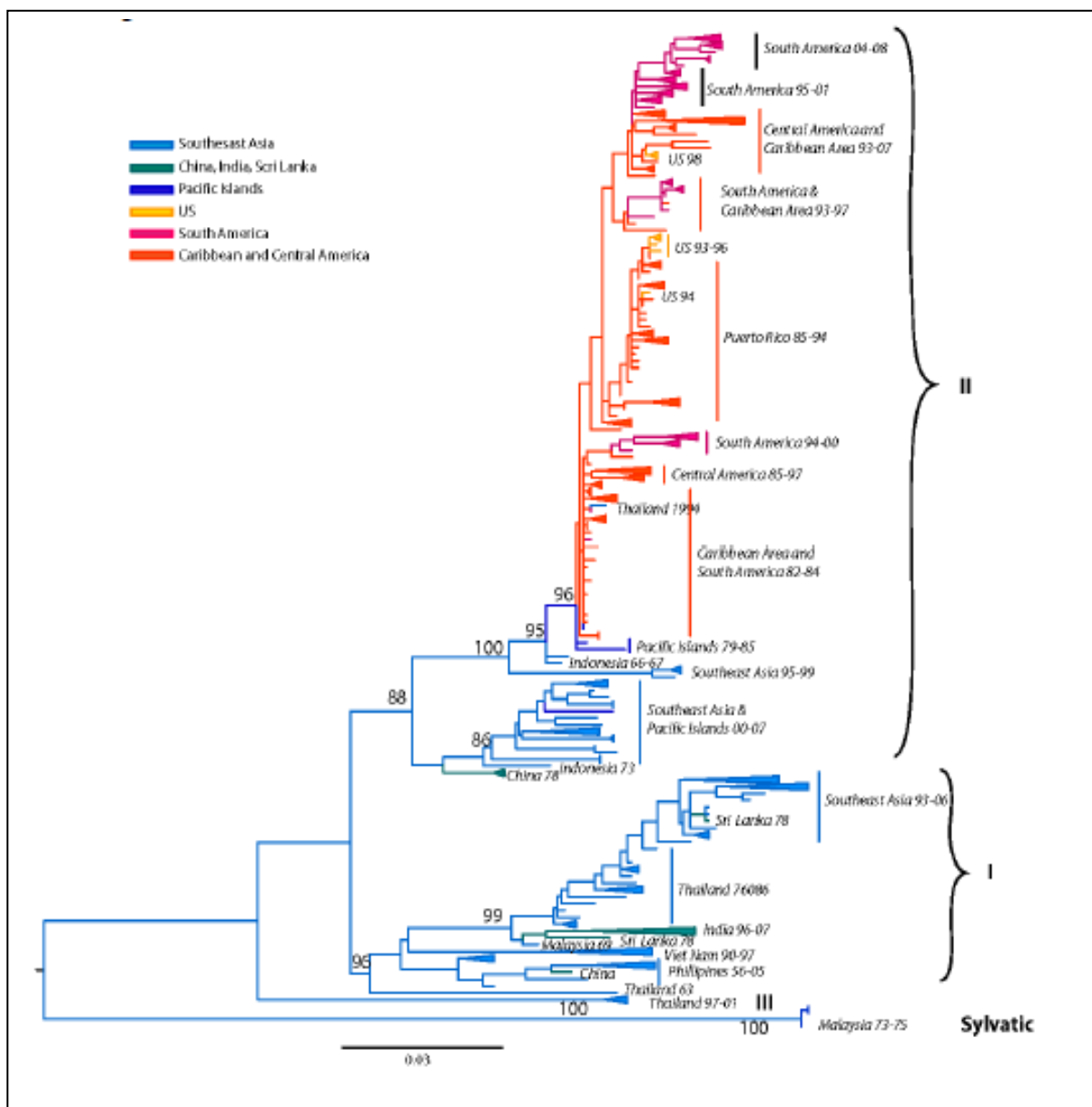


Figura 9. Filogenia do DENV-4. Árvore construída através do método de máxima verossimilhança do DENV-4 com base em sequências completas de nucleotídeos do gene E de todas as linhagens disponíveis no *GenBank*. As linhas coloridas representam regiões geográficas específicas, conforme especificado na figura. Fonte: CHEN, VASILAKIS, 2011.

Alguns genótipos têm se tornado mais cosmopolitas que outros por infectar humanos em vários continentes (África, Ásia, Oceania e América Latina), enquanto outros genótipos são mais restritos geograficamente. À medida que mais sequências são incluídos é possível que sejam identificados mais genótipos, ou mesmo que desapareçam (HOLMES, 2006; HOLMES, 2009).

Além da existência de diferentes genótipos para cada sorotipo de DENV, estudos revelam a ocorrência de múltiplas linhagens dentro desses genótipos (ZHANG et al., 2005; MONDINI et al., 2009; dos SANTOS et al., 2011; DUONG et al., 2013). Curiosamente, estas linhagens virais experimentam um processo de emergência e extinção, possivelmente devido a diferenças de *fitness* no hospedeiro humano ou mosquito que permitem que algumas linhagens sobrevivam melhor do que outras (ARMSTRONG, RICO-HESSE, 2003; ANDERSON, RICO-HESSE, 2006; HANG et al., 2010; HANLEY et al., 2008; WU et al., 2010). Os eventos de substituição de linhagens nas Américas (BENNETT et al., 2006; CARNEIRO et al., 2012; MIR et al., 2014), Sri Lanka (MESSER et al., 2003) e no Vietnã (HANG et al., 2010) foram associados com o aumento da incidência e gravidade sugerindo que existem diferenças intrínsecas com relação a virulência entre vírus do mesmo sorotipo, fenômeno consistente com observações anteriores (GUBLER et al., 1978; GUBLER et al., 1981).

Sabe-se que alterações genéticas podem ter implicações significantes para a emergência de novos genótipos e/ou vírus com antigenicidade, infectividade ou tropismo tecidual alterados, e também podem influenciar o padrão e a transmissão da doença (ADAMS et al., 2006; KINOSHITA et al., 2009; KROSCHEWSKI et al., 2009; LAI et al., 1998). Enquanto certos genótipos e certas linhagens são associados com epidemias suaves, outros são mais propensos a causar epidemias graves, e como consequência, no futuro poderemos estar expostos a vírus com uma gama maior de propriedades patogênicas (RICO-HESSE et al., 1997; WATTS et al., 1999; MESSER et al., 2003; KANAKARATNE et al., 2009). Por esse motivo, torna-se importante compreender o processo que gera a variabilidade genética em populações naturais de DENV. Em particular, determinar se existe evidência de evolução adaptativa, tanto aquelas dirigidas pela pressão seletiva imune quanto às regiões genômicas envolvidas (TWIDDY et al., 2002).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar molecular, temporal e espacialmente a presença de DENV-4 em amostras clínicas de pacientes que procuraram os Serviços de Saúde do Município de São José do Rio Preto entre agosto de 2011 a junho de 2014.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a circulação de DENV em amostras de São José do Rio Preto nos anos de 2011 a 2014;
- Analisar fatores epidemiológicos associados aos casos de dengue no período de 2011 a 2014;
- Comparar os resultados obtidos com o ensaio *Panbio® Dengue Early ELISA* e Multiplex-Nested-PCR;
- Isolar amostras de Dengue vírus em linhagem celular C6/36 (clone do mosquito *Aedes albopictus*);
- Analisar a distribuição espacial do DENV-4 num espaço urbano com características heterogêneas, identificando dessa forma as áreas de risco de epidemias de DENV-4 através de geoprocessamento em bairros de São José do Rio Preto;
- Estudar a variabilidade genética dos vírus isolados em São José do Rio Preto no período de 2011 a 2014.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras clínicas

As amostras de sangue de pacientes febris que procuraram o serviço de saúde de São José do Rio Preto foram coletadas para diagnóstico de dengue. A detecção do antígeno NS1 (presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia da doença) foi primeiramente feita pela Vigilância Epidemiológica empregando o kit comercial *Panbio® Dengue Early ELISA*. Posteriormente as amostras positivas e negativas para o antígeno NS1 foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto SP, para posterior identificação molecular.

Os casos foram agrupados anualmente entre agosto de 2011 a julho de 2012, agosto de 2012 a julho de 2013 e agosto 2013 a junho de 2014. Os meses de agosto e julho foram escolhidos por apresentarem, em geral, os menores números de casos em relação aos demais meses do ano e possibilitarem boa representação da sazonalidade da doença no município de São José do Rio Preto (MONDINI et al., 2005).

Esse estudo foi vinculado ao projeto de pesquisa “Detecção de *Flavivirus* e *Hantavirus* em amostras de pacientes de São José do Rio Preto” que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CAAE – 02078812.8.0000.5415, ANEXO I).

4.1.1 Análise estatística

Os resultados das variáveis analisadas neste estudo (sorotipo viral, idade e gênero do paciente) receberam o tratamento estatístico pertinente (análise de variância – teste ANOVA). (BERQUÓ et al., 1999).

4.2 Avaliação do ensaio *Panbio® Dengue Early ELISA*

Para avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do ensaio *Panbio® Dengue Early ELISA*, utilizado pela Vigilância em dengue de São José do Rio Preto como método de triagem na detecção do antígeno NS1, foram utilizadas duas situações epidemiológicas diferentes: (i) 80 amostras de soro (40 amostras NS1 negativas e 40 NS1 positivas), provenientes de pacientes sintomáticos, coletadas durante período não-epidêmico (abril a julho de 2012) e (ii) 140 amostras (100 amostras NS1 negativas e 40 NS1 positivas) coletadas durante o período epidêmico (abril a julho 2013). A fim de comparar a proporção entre os dois períodos foi aplicado o teste Z (BERQUÓ et al., 1999).

4.3 Extração de RNA

O RNA viral foi extraído à partir de 140 µl de soro, utilizando o QIAmp Viral RNA Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para este procedimento, 140 µl de soro foram adicionados em 560 µl de *buffer AVL viral lysis buffer* e 5,6 µl de *carrier RNA*. Os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos, e em seguida, incubados em temperatura ambiente, com posterior centrifugação (spin). Foi adicionado 560 µl de álcool 100%, sendo os tubos agitados novamente em vórtex, com posterior centrifugação (spin). Após essa etapa, 630 µl da solução anterior foi adicionada na coluna do kit (*Qiaamp Mini Spin Column*), e centrifugada a 6.080 g durante 1 minuto (4°C). Após descarte do filtrado, a coluna foi adicionada em novo tubo (*collection tubes*) sendo repetido o passo anterior. 500 µl do *buffer AW1 wash buffer 1* foi adicionado à coluna, com posterior centrifugação a 6.080 g durante 1 minuto, seguido pela adição de 500 µl do *buffer AW2 wash buffer 2*, com nova centrifugação a 16.560 g por 3,5 minutos. O RNA viral foi suspenso em 60 µl do tampão de eluição, com posterior incubação durante 1 minuto em temperatura ambiente, dando sequência ao processo de centrifugação a 6.080 g por 1 minuto.

4.4 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados na detecção dos flavivirus se pareiam a regiões do gene da proteína NS5 (Tabela 1) e da proteína do capsídeo (C) (Tabela 2).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados na detecção dos Flavivirus (proteína NS5).

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
Iniciadores gênero-específicos para <i>Flavivirus</i>			
FG1 (+)	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	1000	Fulop et al., 1993
FG2 (-)	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA		
Iniciadores espécie-específicos para <i>Flavivirus</i>			
NDEN1 (-)	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472	Bronzoni et al., 2005
NDEN2 (-)	GAACCAGTTTGGTTDRTTTCATCGCTGCC	316	
NDEN3 (-)	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659	
NDEN4 (-)	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222	

*Com o oligonucleotídeo iniciador FG1. (+): sentido positivo. (-): sentido negativo. pb: pares de base.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados na detecção dos flavivirus (proteína C).

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
Iniciadores gênero-específicos para <i>Flavivirus</i>			
DF1 (+)	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAA CC	511	Lanciotti et al., 1992
D2R (-)	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGG		
Iniciadores espécie-específicos para <i>Flavivirus</i>			
TS1 (-)	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482	Lanciotti et al., 1992
TS2 (-)	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119	
TS3 (-)	TAACATCATCATGAGACAGAGG	290	
TS4 (-)	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392	

*Com o oligonucleotídeo iniciador DF1. (+): sentido positivo. (-): sentido negativo. pb: pares de base.

4.4.1 RT-PCR empregando iniciadores para região do gene NS5 e C de DENV

Com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores que pareiam na região do gene da proteína NS5, segundo protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores (2005) com modificações, a reação de transcrição reversa (RT) foi feita pela adição de 8 µl de RNA em uma mistura contendo 4 µl de solução tampão 5x concentrada (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,4 µl de DTT (*dithiothreitol*) a 0,1 M, 1,6 µl da mistura contendo 2,5 mM de dNTP (*deoxynucleoside triphosphate*), 1 µl do oligonucleotídeo iniciador FG2 (15 µM), 0,5 µL (40 U/µL) do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-Invitrogen, USA), 1 µl (200 U/µl) de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20 µl. A mistura foi incubada a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita com 8 µl do produto da RT, 5 µl da solução tampão 10x concentrada (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µl de MgCl₂ a 50 mM, 4 µl da mistura contendo 2,5 mM de dNTP, 1 µl do oligonucleotídeo iniciador FG1 (15 µM), 1 U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 50 µl. A mistura foi submetida a um passo de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 minutos. As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador *Veriti Thermal Cycler* (*Applied Biosystem*, USA).

De acordo com o protocolo descrito por Lanciotti e colaboradores (1992), com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores que se pareiam na região da proteína C, a reação de RT foi feita primeiramente com a adição de 7 µl de RNA em 5 µl do oligonucleotídeo iniciador D2R (10 µM), a mistura foi incubada a 70°C por 5 minutos. A segunda etapa compreende a adição 4 µl de solução tampão 5x concentrada (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375

mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl de DTT a 0,1 M, 2 µl da mistura contendo 2,5 mM de dNTP, seguida por uma incubação de 42°C por 5 minutos. A terceira etapa compreende a adição de 1 µl (200 U/µl) da enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA), seguida por incubação a 42°C por 55 minutos e a 72°C por 15 minutos.

A PCR foi feita com a adição de 5 µl do produto da RT, 5 µl da solução tampão 10x concentrada (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µl de MgCl₂ a 50 mM, 1 µl da mistura contendo 2,5 mM de dNTP, 1 µl do oligonucleotídeo iniciador D1F (10 µM), 1 U da enzima polimerase e água suficiente para completar 50 µl. O ciclo de amplificação consistiu em um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 72°C por 10 minutos.

4.4.2 Multiplex-Nested-PCR

Multiplex-Nested-PCR foi utilizada para a identificação do DENV, conforme descrito no item 4.4.1, com a exceção dos oligonucleotídeos iniciadores usados. Segundo o estudo apresentado por Bronzoni e colaboradores (2005) com modificações, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores que se anelam na região do gene da proteína NS5, NDEN-1 (-), NDEN-2 (-), NDEN-3 (-), NDEN-4 (-), FG1 (+) (1 µl de cada oligonucleotídeo iniciador a 15 µM). O ciclo de amplificação consistiu em um passo de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguido por 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 minutos.

Os oligonucleotídeos iniciadores que se pareiam na região da proteína C, TS1 (-), TS2 (-), TS3 (-), TS4 (-), D1F (+) (1 µl de cada oligonucleotídeo iniciador a 10 µM) foram utilizados com o ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 72°C por 10 minutos (Lanciotti et al., 1992).

4.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Para todas as amostras foi feito o fracionamento do DNA amplificado em gel de agarose a 1,5% (peso/volume) com coloração de brometo de etídio, para se observar os DNA amplificados à luz ultravioleta. Precauções para se evitar contaminações foram seguidas, e controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações.

4.5 Sequenciamento

Os DNAs amplificados obtidos foram sequenciados pelo método dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977).

4.5.1 Gene da proteína C

A co-infecção (DENV-1/DENV-4) foi confirmada por duas metodologias que utilizam oligonucleotídeos iniciadores que se pareiam a regiões do gene da proteína NS5 (Bronzoni e colaboradores (2005)) e da proteína C (Lanciotti e colaboradores (1992)).

A amplificação do DNA para o sequenciamento do gene da proteína do capsídeo (C) foi realizada segundo metodologia de Lanciotti e colaboradores (1992) (descrita anteriormente nos itens 4.4.1 e 4.4.2), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 2.

Os DNAs amplificados pela Nested-PCR para o gene da proteína C foram purificados com etanol seguindo a metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). Os DNAs amplificados foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5 mL para a adição de 3 µL de acetato de sódio 3M (pH=5,2) seguido de adição de 150 µL de etanol 100%. O DNA foi precipitado por 60 minutos a -80°C. Após centrifugação de 20 minutos a 16.100 g, 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 µL de etanol 70%. Em seguida foi realizada centrifugação de 10 minutos, a 16.100 g, 4°C para obtenção de um precipitado, o qual foi eluído em 20 µL de água ultra PURE (InvitrogenTM).

A quantificação foi realizada utilizando-se o equipamento *Nanodrop 1000* (*Thermo Scientific*) e os purificados foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o *BigDye Terminator kit v.3.0* (*Applied Biosystems*, Bedford, MA), seguindo as instruções do fabricante. A reação foi composta pela mistura de DNA viral amplificado (100-300 ng), 4 µl de tampão de reação contendo os dideoxinucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (*terminator reaction mix*), 3,2 µM de cada *primer* (Tabela 2) e água ultra PURE para volume final de 20 µl. As reações foram processadas em termociclador automático (*Veriti Thermal Cycler*, *Applied Biosystem*, USA), programado para realizar 25 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Para a precipitação do DNA foram adicionados a reação 5 µL de EDTA 125 mM pH 8,25 µL de etanol 100% gelado, e deixado por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi centrifugada a 15.700 g por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. A reação foi então lavada com 60 µL de etanol 70% gelado, centrifugada a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e foi novamente descartado o sobrenadante.

Foram adicionados 20 µL de formamida *high dye* (pH 7,0) e a reação passou por uma desnaturação a 95°C por dois minutos. A reação foi mantida no gelo até ser sequenciada no equipamento ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Life Technologies).

Após o sequenciamento as sequências nucleotídicas foram analisadas usando os programas BLAST (*Basic Local Aligning Search Toll*), para verificar se correspondiam ao sorotipo analisado, e o DS Gene 2.0 (Alcercys, USA), para edição das sequências nucleotídicas e posterior construção de uma árvore filogenética confiável. As sequências foram depositadas no *GenBank* (números de acesso: DENV-1 JQ950328 e DENV-4 JQ950329).

4.5.2 Gene do envelope do DENV-4

A amplificação para o sequenciamento do gene do envelope das 33 amostras de DENV-4 isoladas no presente estudo (BR/SJRP/131/2011, BR/SJRP/485/2012, BR/SJRP/500/2012, BR/SJRP/502/2012, BR/SJRP/505/2012, BR/SJRP/506/2012, BR/SJRP/510/2012, BR/SJRP/514/2012, BR/SJRP/529/2012, BR/SJRP/535/2012, BR/SJRP/545/2012, BR/SJRP/554/2012, BR/SJRP/555/2012, BR/SJRP/556/2012, BR/SJRP/561/2012, BR/SJRP/562/2012, BR/SJRP/564/2012, BR/SJRP/568/2012, BR/SJRP/580/2012, BR/SJRP/587/2012, BR/SJRP/610/2013, BR/SJRP/611/2013, BR/SJRP/613/2013, BR/SJRP/614/2013, BR/SJRP/731/2013, BR/SJRP/732/2013, BR/SJRP/733/2013, BR/SJRP/848/2013, BR/SJRP/849/2013, BR/SJRP/850/2013, BR/SJRP/851/2013, BR/SJRP/2345/2014, BR/SJRP/2194/2014) foi realizada segundo metodologia adaptada de Christenbury e colaboradores (2010), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 3.

A reação de transcrição reversa foi realizada pela adição de 8 µl de RNA em uma mistura contendo 4 µl de solução tampão 5x concentrada (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,4 µl de DTT a 0,1 M, 1,6 µl da mistura contendo 2,5 mM de dNTP, 2,5 µl do oligonucleotídeo iniciador D4-2402R (10 µM), 0,5 µL (40 U/ µL) de RNaseOUT, 1 µl (200 U/µl) de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20 µl. A mistura foi incubada a 50°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos.

A PCR foi realizada partindo-se de 8 µL do cDNA diluído em 5 µL de solução tampão 10x concentrada (500 mM Tris-HCl, 150 mM *Ammonium Sulfate* [pH 9.3 ajustado com NH₄OH], 25 mM de MgCl₂, 1% TWEEN® 20), 2,5 µL da mistura contendo 2,5 mM de dNTP, 1 µL de DMSO (*Dimethyl sulfoxide*), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (D4-664F e D4-2402R) a 10 pmol, 0,5 U de *Accutag LA DNA Polymerase* (Sigma, USA) e água

suficiente para completar 50 µL. O ciclo de amplificação consiste de um passo inicial para desnaturação a 98°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 20 segundos a 51°C e 3 minutos a 68°C. Encerrando-se com uma extensão final de 10 minutos a 68°C.

Tabela 3. Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR do gene de envelope do DENV-4, sua sequência (5' – 3') e tamanho do produto amplificado.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>	<i>Amplicon</i>
D4-664F*	ACR TGG ATG TCA TCR GAR GG	1738 pb
D4-2402R*	TKG TAC TGY TCY RTC CAR G	

*Oligonucleotídeos iniciadores identificados pela posição no genoma do DENV-4 segundo Christenbury e colaboradores, 2010.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo, com tampão TBE e visualizados em luz ultravioleta, para confirmação da amplificação dos fragmentos de interesse. Os produtos amplificados foram purificados com etanol seguindo a metodologia descrita anteriormente no item 4.5.1.

A quantificação foi realizada utilizando-se o equipamento *Nanodrop 1000* (*Thermo Scientific*) e os purificados foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o *BigDye Terminator kit v.3.0* (*Applied Biosystems*, Bedford, MA), seguindo as instruções do fabricante. A reação foi composta pela mistura de DNA viral amplificado (100 – 300 ng), 4 µl de tampão de reação contendo os dideoxinucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (*terminator reaction mix*), 3,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 5) e água ultra PURE para volume final de 20µl. As reações foram processadas em termociclador automático (*Veriti Thermal Cycler*, *Applied Biosystem*, USA), programado para realizar um passo inicial para desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de marcação fluorescente para sequenciamento do gene que codifica a proteína E do DENV-4 (Tabela 4) foram desenhados baseando-se no alinhamento com o genoma completo de DENV-4 (Dengue vírus 4, número de acesso no *GenBank*: JN559740.2).

Para a precipitação do DNA foi utilizada a metodologia descrita anteriormente no item 4.5.1. Posteriormente foram adicionados 20 µL de formamida *high dye* (pH 7,0) e a reação passou por uma desnaturação a 95°C por dois minutos. A reação foi mantida no gelo até ser sequenciada no equipamento ABI 3130 *Genetic Analyzer* (*Life Technologies*).

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de marcação fluorescente para sequenciamento do gene que codifica a proteína E do DENV-4.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' - 3')</i>	<i>Posição*</i>
664F	ACR TGG ATG TCA TCR GAR GG	765-784
865F	GAY TTT GTR GAA GGR GTC TC	966-985
REV382-400	GGA CAT CTT GTT GCC GTA G	1144-1162
1162F	GGR AAR GGA GGW GTT GTR AC	1263-1282
REV644-665	CAT GGC TGT AAC TCC ATG ATT G	1406-1427
1450F	ACR TGG CTY GTG CAY AAR CAA TG	1551-1573
REV926-947	TTC CTG AGA TCC CAG CAC TGT C	1688-1709
1721F	AGG GAA TGT CAT AYA CGA TG	1822-1841
REV1209-1226	ACG CCC AAC CAC TTT TTC	1972-1988
1997F	TRA CAC TCC ATT GGT TYA GR	2098-2117
D4a2	AAC YTG GTG YAC AGC CTT TCC C	2234-2255
FORW1555-1576	GGT TCT TAG TGT TGT GGA TTG G	2317-2333
2402R	TKG TAC TGY TCY RTC CAR G	2503-2522

* Posição no genoma estabelecida após comparação com a sequência do genoma completo do DENV-4 (*Dengue virus 4 strain H402276, complete genome*, número de acesso no *GenBank* JN559740.2) segundo Christenbury e colaboradores (2010) com modificações.

Inicialmente as sequências nucleotídicas do envelope do DENV-4 foram analisadas usando os programas DS Gene 2.0 (*Alcerys*, USA) e o BLAST (*Basic Local Aligning Search Tool*) disponível no portal do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

A edição das sequências e a montagem dos *contigs* foram realizadas com auxílio do programa *Seq ManTM* (4.05 - *Expert Analysis Software* - DNASTAR, Inc., EUA). As sequências de DENV-4, obtidas neste estudo, foram alinhadas com sequências do genoma dos vírus circulantes em outras localidades, publicados no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o programa *Se Al* (*Sequence Alignment Editor v.2.0a11*).

A edição das sequências obtidas e montagem das sequências consenso foram realizadas com auxílio do programa *Accelrys Gene v.2.5* (*Accelrys*) utilizando-se a sequência brasileira do genoma completo do DENV-4 depositada no *GenBank* (*Dengue virus 4 strain H402276 complete genome*, *GenBank* JN559740.2).

4.5.3 Genoma completo dos isolados de DENV-4

Das 33 amostras de soro com o gene do envelope sequenciado (todas isoladas em linhagem C6/36), dez amostras (BR/SJRP/500/2012, BR/SJRP/505/2012, BR/SJRP/506/2012, BR/SJRP/514/2012, BR/SJRP/556/2012, BR/SJRP/580/2012, BR/SJRP/610/2013, BR/SJRP/614/2013, BR/SJRP/733/2013 e BR/SJRP/850/2013), escolhidas através da semana

epidemiológica, foram submetidas à plataforma de sequenciamento *Illumina GA* utilizando *MiSeq Reagent Kits* de 300 ciclos como estratégia de obter o sequenciamento do genoma completo. Quanto às amostras isoladas em linhagem C6/36, duas (segunda passagem referente às amostras BR/SJRP/613 e BR/SJRP/614) foram submetidas à plataforma de sequenciamento *Illumina GA*, conforme descrito a seguir.

4.5.3.1 Quantificação e tratamento do RNA

Primeiramente o RNA total foi extraído utilizando-se o QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen®), segundo instruções do fabricante. O RNA obtido foi quantificado (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies) e posteriormente tratado com DNase (Sigma), segundo normas do fabricante.

4.5.3.2 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

A reação de transcrição reversa foi realizada pela adição de 10 µl de RNA em uma mistura contendo 1 µl de Random *Primer* (50ng), 1 µl da mistura contendo 10 mM de dNTP e 1 µl de água. A mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos. A seguir foram adicionados 4 µl de solução tampão 5x concentrada (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 µl de DTT a 0,1 M, 1 µL de RNaseOUT (40 U/µL), 1 µl (200 U/µl) de enzima transcriptase reversa (Superscript II-Invitrogen, USA). A mistura foi incubada a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e a 70°C por 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C.

4.5.3.3 Obtenção da dupla fita de DNA

Segundo Sambrook e Russell (2001), para cada 10 µL de cDNA foram adicionados 90 µL da mistura contendo 10 µL de solução tampão 10x concentrada (300 mM Tris-HCl [pH 7.8], 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT e 10 mM ATP), 0,4 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de RNase H (5 U/mL), 0,2 µL de T4 DNA/pol (5u/µL), 0,3 µL de T4 Ligase (5u/µL; Invitrogen) e água suficiente para completar 100 µL. A mistura foi incubada a 12°C por 60 minutos e 22°C por 60 minutos.

4.5.3.4 Purificação e quantificação da dupla fita de DNA

Após a síntese da dupla fita de DNA foi realizada a quantificação das amostras que foram amplificadas e purificadas (*Agencourt AMPure XP*), utilizando o aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer*, e o kit usado foi o *DNA High Sensitivity* (*Life Technologies*). As amostras foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante (0,2 - 100ng de DNA dupla fita) e

posteriormente armazenadas para construção da biblioteca de DNA (ULLMANN, ARAÚJO JUNIOR, 2014).

Após o sequenciamento do genoma completo no *Illumina MiSeq*, a montagem dos *contigs* foi feita no programa *Geneious* utilizando como referência o genoma completo de DENV-4 (*Dengue virus 4, complete genome* - Número de acesso no *Genbank*: NC002640).

4.6 Análise filogenética

4.6.1 Gene da proteína C

Foram selecionadas 31 sequências do DENV-1 e 33 sequências do DENV-4, correspondentes ao gene da proteína do capsídeo (C) do DENV, para a análise filogenética. Estas sequências encontram-se disponíveis no *GenBank* (ANEXO III).

O modelo de evolução molecular selecionado para a construção da árvore filogenética do gene da proteína do capsídeo foi o de Tamura e Nei (1993) através da utilização do programa MEGA (v.6.0.5). Foi utilizado o método *Neighbor-joining* para construção da árvore filogenética.

4.6.2 Gene do envelope do DENV-4

Para investigar as relações filogenéticas entre as 33 amostras de DENV-4 isoladas no presente estudo foram selecionadas 36 sequências nucleotídicas referentes ao gene E ou que o contivessem. Estas sequências encontram-se disponíveis no *Genbank* (ANEXO IV).

O modelo de evolução molecular selecionado para a construção da árvore filogenética do gene do envelope foi o de Tamura e Nei (1993) através da utilização do programa MEGA (v.6.0.5). Foi estipulado um *bootstrap* de 1000 réplicas utilizando o método *Neighbor-joining*, sendo posteriormente utilizado o modelo *Maximum likelihood* (ML) para construção da árvore filogenética.

4.6.3 Genoma completo dos isolados de DENV-4

Para investigar as relações filogenéticas entre as 10 amostras de DENV-4 com o genoma completo sequenciado foram selecionadas 20 sequências de genomas completos disponíveis no *Genbank* (ANEXO V). O modelo de evolução molecular selecionado para esse novo conjunto de dados foi o modelo de Tamura e Nei (1993). Foi estipulado um *bootstrap* de 1000 réplicas utilizando o método *Neighbor-joining*, sendo posteriormente utilizado o modelo *Maximum likelihood* (ML) para construção da árvore filogenética.

4.7 Isolamento das amostras de DENV-4 em Linhagem C6/36

Todas as 33 amostras de DENV-4 envolvidas no processo de caracterização e análise filogenética do gene do envelope foram isoladas em linhagem celular C6/36 (clone do mosquito *Aedes albopictus*) segundo metodologia descrita por Figueiredo (1990). As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (Corning, USA) contendo 5 mL do meio de cultura (meio Leibowitz L-15 Cultilab, Campinas, Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino – SFB (Cultilab), 100 U/mL de Penicilina e 100 µg/mL de Estreptomicina. A multiplicação foi realizada a 28°C até as células alcançarem 70 a 80% de confluência. O repique, quando necessário, foi feito no período de até 2 a 5 dias de multiplicação celular.

A monocamada com aproximadamente 70-80% de confluência foi infectada com 100µL de amostra diluída (10µL do soro do paciente em 90µL de meio L15 sem adição de soro fetal). As garrafas foram mantidas a 28°C por 1 hora, para adsorção do vírus e após esse período foi adicionado 5 mL do meio Leibovitz acrescido de 1% de soro fetal bovino. As células foram observadas diariamente em microscópio óptico invertido até, aproximadamente, o décimo dia após a infecção celular. Em seguida, as suspensões celulares infectadas, com ou sem a presença de efeito citopatológico, foram congeladas para rompimento celular e o meio transferido para um tubo Falcon de 50 mL para posterior centrifugação. O sobrenadante foi aliquotado e os tubos foram mantidos a -80°C para realização de testes confirmatórios através do RT-PCR, como descrito anteriormente (4.4.1 e 4.4.2.).

4.8 Modelagem molecular por homologia

Inicialmente, foi feita uma busca por estruturas de proteínas resolvidas por cristalografia de raios X e que tivessem homologia com as sequências de aminoácidos das amostras das proteínas E, NS1, NS3 e NS5 de DENV-4 pelo servidor BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), tendo como banco de dados o PDB (*Protein Data Bank*; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Uma vez escolhida a proteína estrutura molde (Tabela 8) foi realizado um alinhamento da sequência de aminoácidos dessas proteínas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999). Tendo o alinhamento e as coordenadas atômicas da proteína molde (obtidas no PDB), os modelos das proteínas E, NS1, NS3 e NS5 foram construídos utilizando o programa *Modeller* (ESWAR et al., 2006). O servidor UniProt (UNIPROT, 2014) foi utilizado para investigar se as mutações presentes nas proteínas E, NS1, NS3 e NS5 se localizavam em regiões de interação ou em algum sítio ativo da proteína. O ponto isoeletrico (pI) foi calculado utilizando o software ProtParam (LAVIGNE et al.,

2003). Para validação dos modelos foram utilizadas as ferramentas (resolução e fator-R) presentes no servidor SAVES.

Tabela 5. Dados de modelagem (molde, identidade, cobertura e referência) utilizados na escolha da proteína estrutura molde.

Proteína a ser modelada	Proteína com estrutura resolvida (PDB)	Identidade (%)	Cobertura (%)	Referência
NS1	NS1 DENV-2 (4O6B-A)	72%	99%	Akey et al., 2014
NS3	NS3 DENV-4 (2VBC-A)	99%	97%	Luo et al., 2008
NS5	NS5 JEV (4K6M-A)	66%	99,50%	Lu, Gong, 2013
E	E DENV-4 (3UAJ-B)	98%	80%	Cockburn et al., 2012

4.9 Confeção dos mapas georreferenciados

As coordenadas geográficas das residências amostradas dos pacientes positivos para DENV-4 no município de São José do Rio Preto foram obtidas à partir do seu registro de endereço contido na ficha de solicitação de exames do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), fornecida pela prefeitura municipal de São José do Rio Preto (ANEXO II). Os limites geográficos do município foram plotados em um mapa georreferenciado digital do Estado de São Paulo, baseado no mapa da malha municipal do Brasil de 2010, obtido junto ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Figura 10). As atividades de plotagem e tratamento dos mapas digitais foram efetuadas com o programa ArcGIS versão 9.3. Foram construídos mapas: cada um com a distribuição geográfica dos focos positivos por ano (2011, 2012 e 2013) no município de São José do Rio Preto. O ano de 2014 não foi enquadrado nesta análise da distribuição geográfica dos casos de DENV-4 pois os endereços dos pacientes não constavam no banco de dados do SINAN.

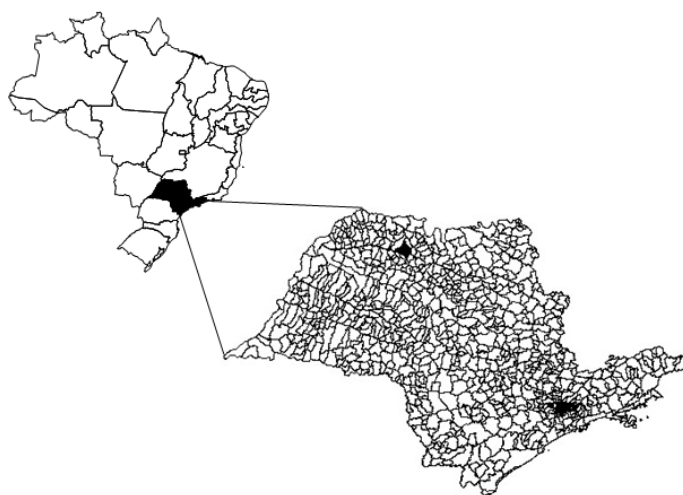


Figura 10. Localização do município de São José do Rio Preto – Estado de São Paulo.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características epidemiológicas do DENV em São José do Rio Preto

A distribuição dos casos de dengue no período pesquisado descreve uma expansão nos casos positivos entre agosto de 2011 a junho de 2014, período no qual foram analisadas 1238 amostras de soro (coletadas até o terceiro dia da doença, período de coleta imprescindível para o bom desempenho dos testes rápidos na detecção do antígeno NS1) de pacientes febris. A média de idade entre os indivíduos acometidos foi de $36,74 \pm 17,21$ anos, variando entre 1 mês e 86 anos, resultado semelhante ao encontrado nos estudos realizados no Rio de Janeiro (DE SIMONE et al., 2004), Rio Grande do Sul (BARONI, OLIVEIRA, 2009), Pará (ARAÚJO et al., 2002) e Amazonas (FIGUEIREDO et al., 2011). No entanto, alguns estudos têm sinalizado a migração de casos graves da doença para a faixa etária mais jovem, a exemplo do que já ocorre em países asiáticos, com consequente aumento de hospitalizações e óbitos nessa população (LIBRATY et al., 2009; ROCHA, TAUIL, 2009; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011; LIMA et al., 2013; MARTINS et al., 2014). Em 2008, a doença provocou pânico, insegurança e desavenças políticas e institucionais, com repercussões nacionais e internacionais, particularmente em razão da gravidade com que atingiu a população infantil no Rio de Janeiro (BARRETO, TEIXEIRA, 2008). Porém esse deslocamento de faixa etária já vinha ocorrendo de forma menos visível nos internamentos por febre hemorrágica da dengue ocorridos no ano de 2007 em todo o país (BARRETO, TEIXEIRA, 2008).

Quando analisada a variável gênero, encontramos um discreto predomínio do gênero feminino, com 53,38% ($n = 426$) dos 798 casos confirmados por PCR, resultado semelhante aos valores encontrados em estudos realizados nas cidades de Campinas - SP (MALAVASI, CORDEIRO, 2011), Giruá - RS (BARONI, OLIVEIRA, 2009), Jaciara - MT (FRANÇA et al., 2011), Manaus - AM (BASTOS, 2004), São Luís - MA (GONÇALVES, REBÊLO, 2004) e São Sebastião - SP (RIBEIRO et al., 2006).

Essa prevalência pode estar vinculada ao comportamento do vetor *Aedes aegypti* encontrado frequentemente em ambientes urbanos, cuja transmissão está localizada predominantemente no domicílio e peridomicílio, onde as mulheres passam a maior parte do tempo, ou por estas serem mais presentes nos serviços de saúde (TORRES, 2005; LIMA-CAMARA et al., 2006).

Diferentes autores encontraram uma maior ocorrência de casos no gênero masculino e sugerem que este achado em alguns grupos populacionais de diferentes regiões do Brasil pode

não ser representativo para a infecção no total da população (PASSOS et al., 2004; CASALI et al., 2004; MONTENEGRO et al., 2006; VILAR, 2008). Já para outros autores o gênero não interfere na ocorrência da infecção por dengue (RIBEIRO, SOUSA, ARAÚJO, 2008).

A correlação estatística entre idade dos pacientes e sorotipo (DENV-1 $38,12 \pm 18,82$; DENV-2 $38,06 \pm 18,78$; DENV-4 $36,57 \pm 16,69$ e co-infecção $29,66 \pm 18,94$) demonstrou que não houve significância estatística ($P = 0,4470$; $F = 0,8876$) para $p \leq 0,05$.

A análise dos dados referentes à correlação entre gênero dos pacientes e sorotipo não apresentou diferença estatística significativa, DENV-1 ($39,47 \pm 20,37$ masculino; $36,40 \pm 16,92$ feminino; $P = 0,4868$), DENV-2 ($36,86 \pm 18,51$ masculino; $33,92 \pm 14,43$ feminino; $P = 0,5634$), DENV-4 ($36,43 \pm 16,91$ masculino; $36,68 \pm 16,55$ feminino; $P = 0,7781$) e co-infecção ($42,33 \pm 10,59$ masculino; $17 \pm 17,43$ feminino, não sendo possível comparar as idades). O risco portanto de se infectar com qualquer sorotipo de dengue, de acordo com o cenário encontrado em São José do Rio Preto entre 2011 e 2014, independe do gênero e faixa etária, pois a susceptibilidade passa a ser universal a medida em que se instala o processo de endemização da doença (RIBEIRO et al., 2008).

5.2. Características moleculares do DENV em São José do Rio Preto

A detecção do antígeno NS1 por métodos rápidos (kit comercial *Panbio® Dengue Early ELISA*) tem demonstrado ser um método alternativo eficiente para o diagnóstico rápido, sensível e específico da infecção por DENV (DUSSART et. al., 2008; HUHTAMO et al., 2010). Das 1238 amostras analisadas, 1098 foram positivas para o antígeno NS1, resultado obtido com o kit comercial *Panbio® Dengue Early ELISA*, sendo 798 (72%) confirmadas por Multiplex-Nested-PCR (Figuras 11 e 12). Segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica, o município de São José do Rio Preto apresentou 21.083 casos de dengue no mesmo período: 910 casos em 2011, 416 em 2012, 19.317 em 2013 e 440 casos até junho de 2014 (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2014).

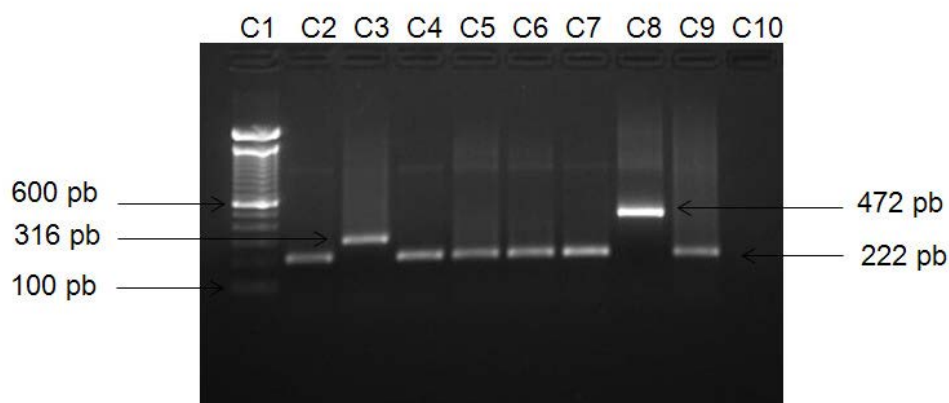


Figura 11. Foto representativa do gel de agarose que mostra bandas referentes ao segmento de NS5 dos isolados de DENV-1 (472 pb), DENV-2 (316 pb) e DENV-4 (222 pb) por Multiplex-Nested-PCR, de acordo com o protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores (2005). Colunas: C1, padrão de tamanho molecular (100 pb); C2, DENV-4; C3, DENV-2; C4 a C7, DENV-4; C8, DENV-1; C9, DENV-4; C10, controle negativo.

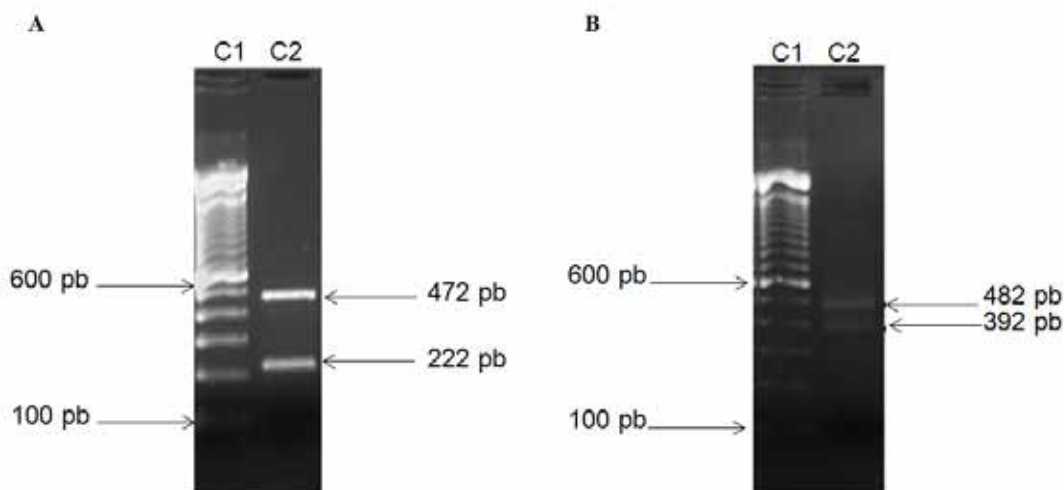


Figura 12. Fotos representativas dos géis de agarose que mostram um caso de co-infecção (DENV-1/DENV-4) através de duas metodologias. Colunas: C1, padrão de tamanho molecular (100 pb) e C2, co-infecção DENV-1/DENV-4. (A) Proteína NS5 (BRONZONI et al., 2005): DENV-1 (472 pb) e DENV-4 (222 pb). (B) Proteína C (Lanciotti et al., 1992): DENV-1 (482 pb) e DENV-4 (392 pb) (COLOMBO et al., 2013).

No presente estudo, entre agosto de 2011 a julho de 2012, foram obtidos 79 amostras positivas: 54 (69%) DENV-1, 16 (20%) DENV-4, 8 (10%) DENV-2 e 1 (1%) co-infecção (DENV-1/DENV-4); 591 amostras positivas entre agosto de 2012 a julho de 2013: 490 (83%) DENV-4, 62 (10,5%) DENV-2, 36 (6%) DENV-1 e 3 (0,5%) co-infecção (DENV-1/DENV-4); 122 amostras positivas entre agosto de 2013 a junho de 2014: 89 DENV-1 (73%), 16 DENV-2 (13%), 16 DENV-4 (13%), 1 (1%) co-infecção (DENV-1/DENV-2) (Figuras 13 e 14), sendo possível estabelecer uma circulação simultânea (co-circulação) dos três sorotipos em SJRP no período analisado, evidência clara de hiperendemicidade, fato este que resultou no aumento da morbidade, formas graves de dengue e mortes na região. Importante ressaltar

que a co-circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 esteve associada a alças epidêmicas anuais, ocorrendo principalmente nos meses quentes e úmidos (BASTOS et al., 2012; CARRINGTON et al., 2005; PESSANHA et al., 2010; MELO et al., 2012; TEIXEIRA et al. 2009).

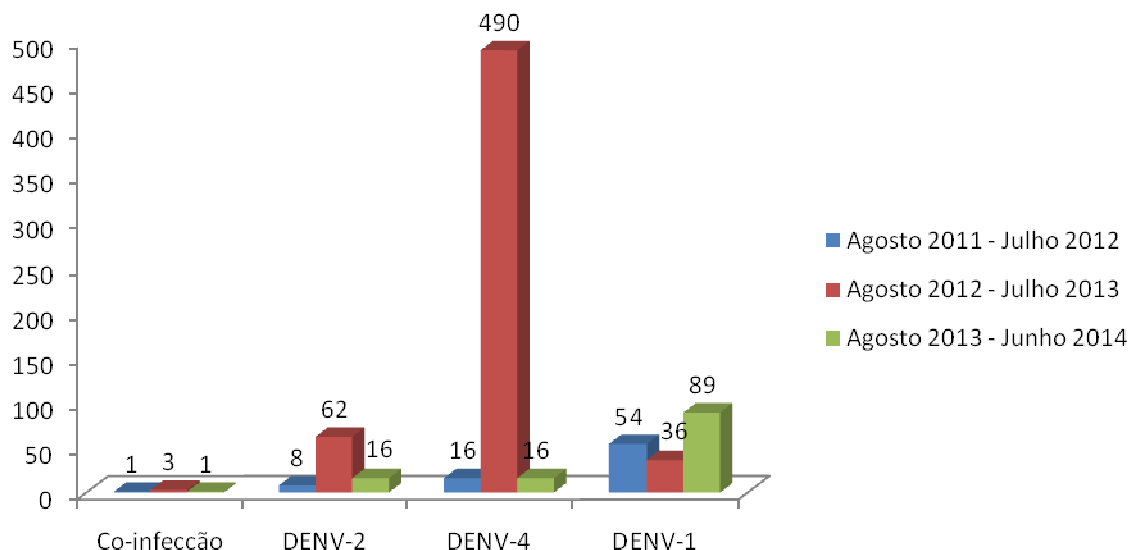


Figura 13. Número de amostras de cada sorotipo do DENV identificados nas amostras clínicas coletadas no período entre agosto de 2011 a junho de 2014. Eixo y: número dos sorotipos identificados.

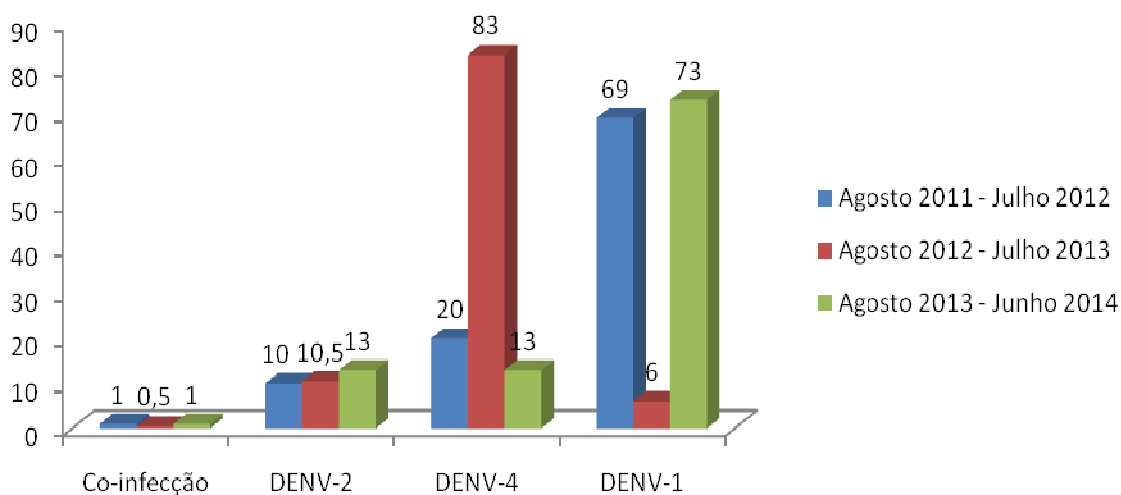


Figura 14. Distribuição anual da positividade para DENV nas amostras clínicas coletadas no período entre agosto de 2011 a junho de 2014. Eixo y: porcentagem dos sorotipos identificados.

A emergência de DENV-4 foi uma preocupação para as autoridades de saúde uma vez que existem evidências de que após a introdução de um dado sorotipo do DENV em um determinado local, segue-se uma explosão epidêmica com altas taxas de incidência e grande número de casos (BARRETO et al, 2008; ZELLER et al., 2013).

Dentre os casos de co-infecção observados 0,6% (5/798) corresponderam aos sorotipos DENV-1/DENV-4 e 0,1% (1/798) DENV-2/DENV-4.

A co-infecção por DENV pode ocorrer em áreas com circulação endêmica, concomitante diferentes sorotipos. Casos de co-infecção com DENV-1 e 2 (ROCCO et al., 1998; SANTOS et al., 2003), DENV-2 e 3 (KANESA-THASAN et al., 1994; WANG et al., 2003; WENNING et al., 2005; ARAÚJO et al., 2006), DENV-1 e 3 (LAILLE et al., 1991), DENV-3 e 4 (FIGUEIREDO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2011), DENV-1 e DENV-4 (COLOMBO et al., 2013) vem sendo relatados. Análises filogenéticas das sequências obtidas em um dos casos de co-infecção, indicaram a presença do genótipo V (Figura 15A) e II (Figura 15B) de DENV-1 e DENV-4, respectivamente, refletindo nos genótipos circulantes no Brasil no momento atual (COLOMBO et al., 2013; DRUMOND et al., 2012; SOUZA et al., 2011). Além da genotipagem, foi possível identificar uma assinatura genética (substituição do aminoácido Fenilalanina por Leucina - F49L) nas amostras brasileiras de DENV-4, conforme mostrado na Figura 16 (Apêndice II).

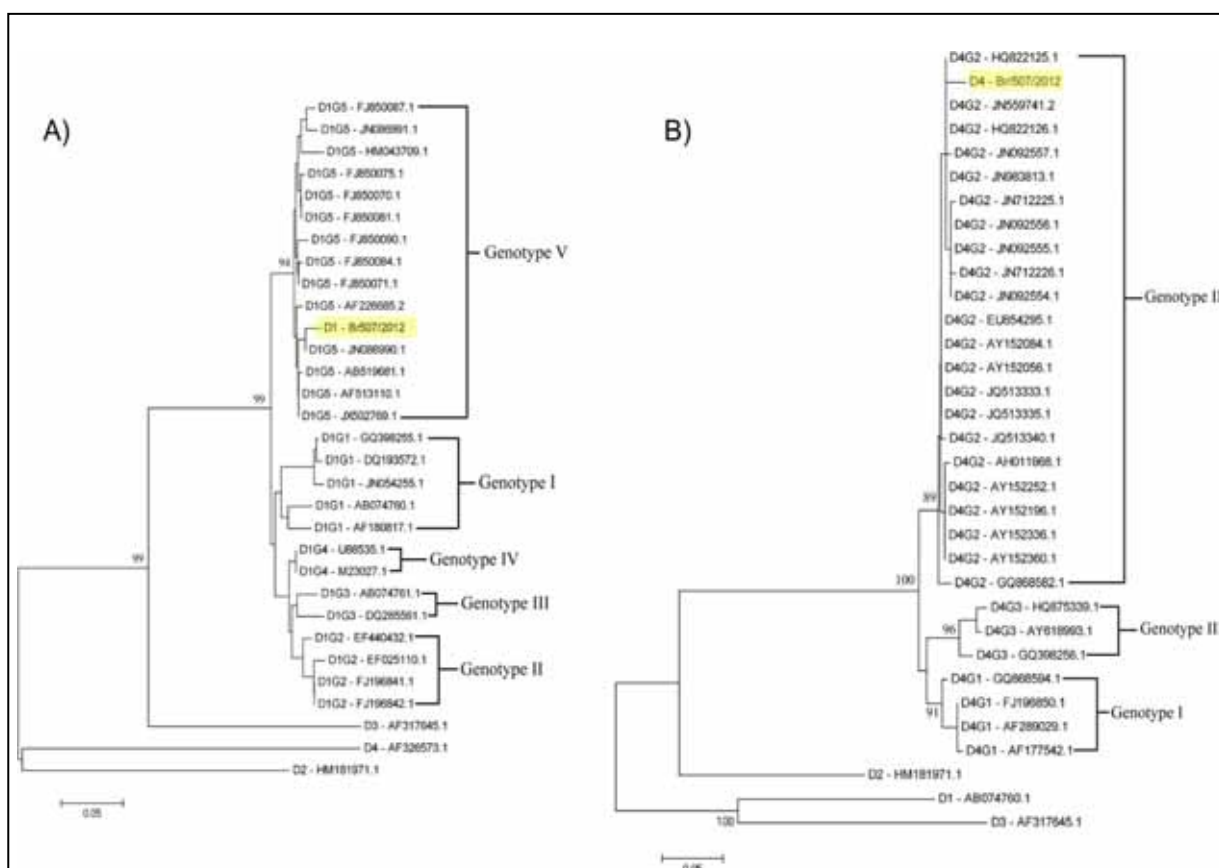


Figura 15. (A) Árvore filogenética de DENV-1 construída pelo método de Neighbor-Joining. A sequência RP/BR/2012/507a, com 365 pares de base (pb) do gene que codifica a proteína do Capsídeo corresponde à amostra coletada na co-infecção em SJRP. São mostrados representantes de cada um dos genótipos de DENV-1. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 réplicas e a barra representa 0,05nt por sítio. Representantes

de DENV-2, DENV-3 e DENV-4 foram utilizados como grupos externos. **(B) Árvore filogenética inferida pelo método de *Neighbor-Joining* de DENV-4.** A sequência RP/BR/2012/507b, de 257 pb do gene que codifica a proteína do Capsídeo corresponde à amostra coletada na co-infecção em SJRP. São mostrados representantes de cada um dos genótipos de DENV-4 e os demais sorotipos foram utilizados como grupo externo. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 réplicas e a barra representa 0,05nt por sítio. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652013000400009>. Representantes de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foram utilizados como grupos externos (COLOMBO et al., 2013).

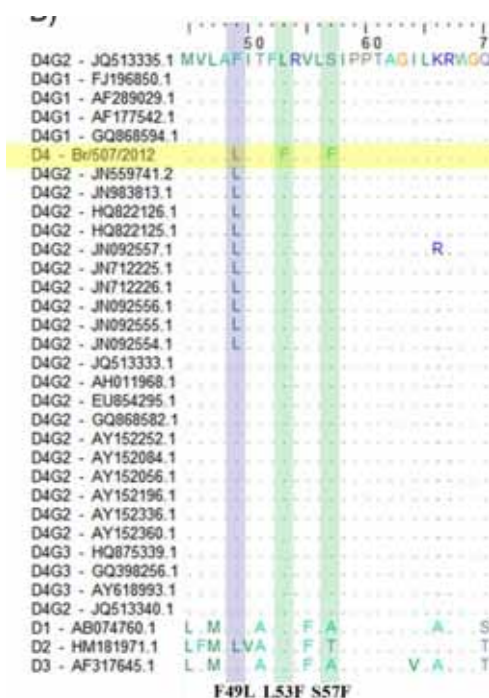


Figura 16. Alinhamento de 33 sequências de aminoácidos da proteína do capsídeo de amostras obtidas no *GenBank* e a amostra RP/BR/2012/507b de DENV-4 (em amarelo). A substituição F49L está marcada em azul. São mostrados somente aminoácidos diferentes da amostra referência (JQ513335.1) (COLOMBO et al., 2013).

As figuras 17 e 18 mostram a distribuição mensal do número de casos de dengue observados no período entre agosto 2011 a julho 2012, agosto 2012 a julho 2013 e agosto de 2013 a junho de 2014, respectivamente.

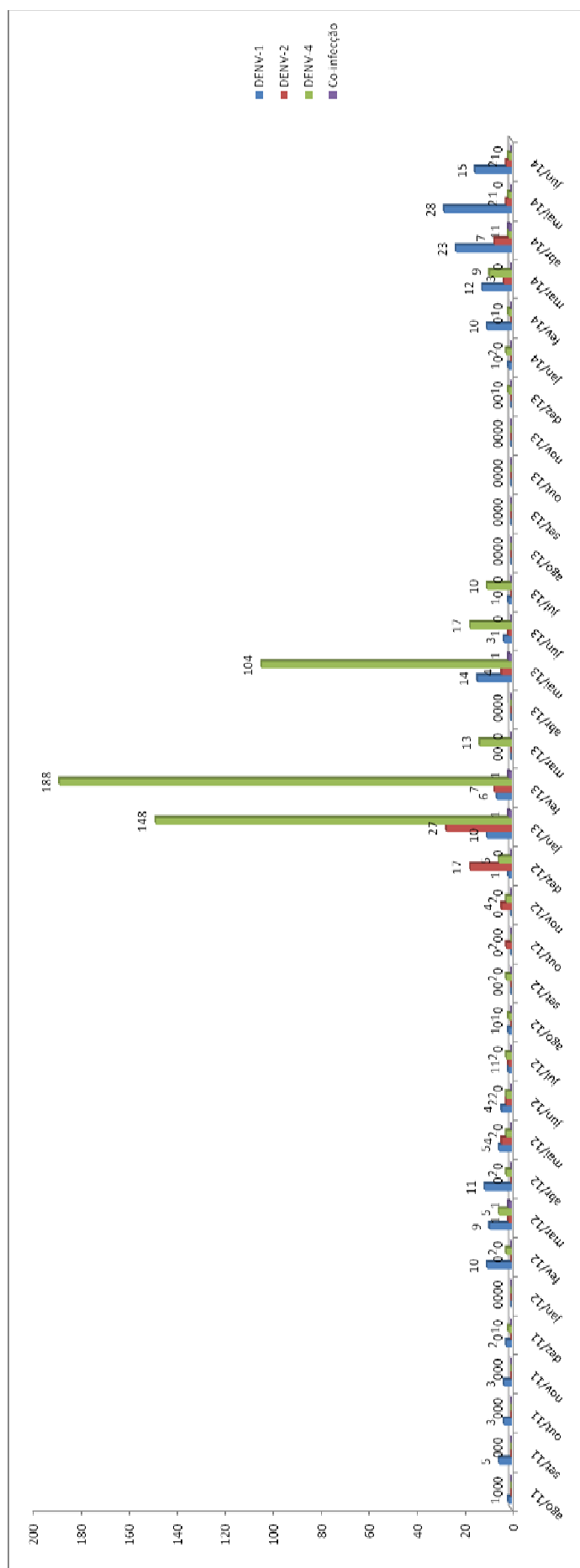


Figura 17. Distribuição mensal do número de casos avaliados de dengue entre agosto de 2011 a junho de 2014. Eixo y: número de casos. Eixo x: distribuição mensal dos casos de dengue.

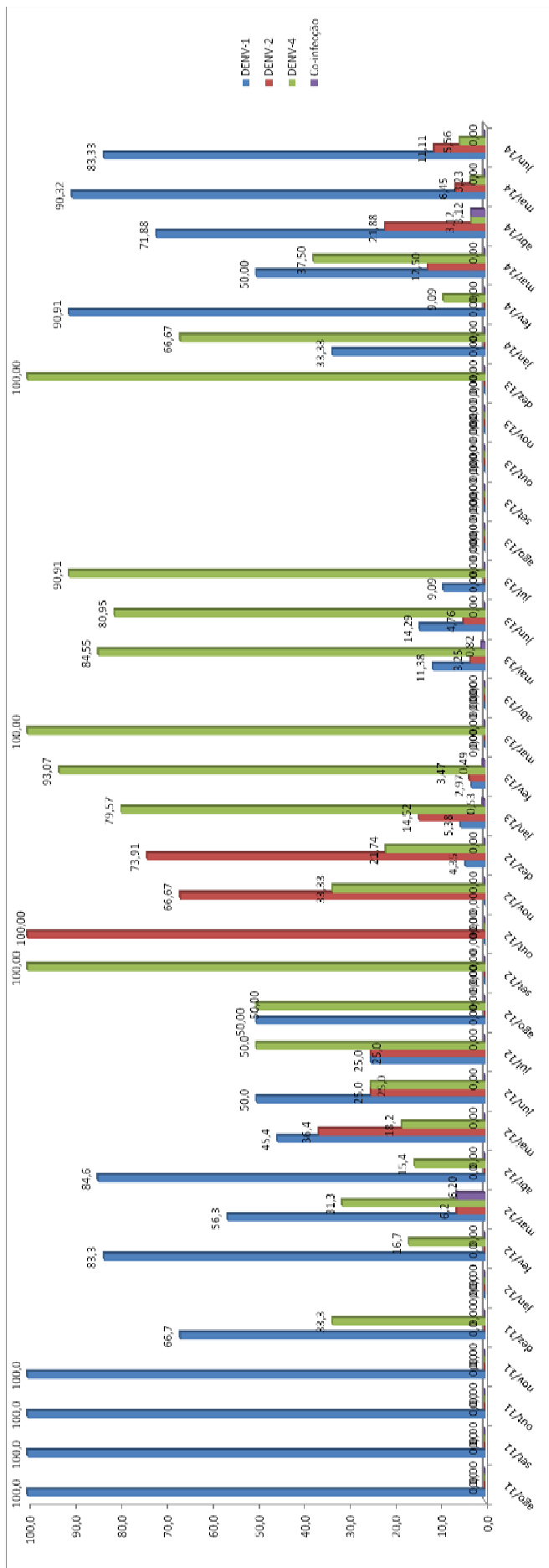


Figura 18. Distribuição mensal da porcentagem de casos avaliados de dengue avaliados no período entre agosto de 2011 a junho de 2014. Eixo y: porcentagem de casos. Eixo x: distribuição mensal dos casos de dengue.

Considerando o período entre agosto 2011 a julho 2012, foram observados 79 casos positivos. Sendo um caso (100%) de DENV-1 no mês de agosto, cinco (100%) de DENV-1 em setembro, três (100%) de DENV-1 em outubro, três (100%) de DENV-1 em novembro, dois (66,7%) de DENV-1 e um (33,3%) de DENV-4 em dezembro; no mês de janeiro de 2012 não foi observado nenhum caso positivo para DENV, já em fevereiro, 10 casos (83,3%) de DENV-1 e 2 (16,7%) de DENV-4 foram observados, 9 (56,3%) de DENV-1, 1 (6,2%) de DENV-2, 5 (31,3%) de DENV-4 e 1 (6,2%) co-infecção DENV-1/DENV-4 no mês de março, 11 (84,6%) DENV-1 e 2 (15,4%) DENV-4 em abril, 5 (45,4%) DENV-1, 4 (36,4%) DENV-2, 2 (18,2%) DENV-4 em maio, 4 (50%) DENV-1, 2 (25%) DENV-2 e 2 (25%) DENV-4 em junho, 1 (25%) DENV-1, 1 (25%) DENV-2 e 2 (50%) DENV-4 em julho.

No período entre agosto 2012 a julho 2013, foram observados 591 casos positivos. Um caso (50%) de DENV-1 e um (50%) de DENV-4 no mês de agosto, dois (100%) DENV-4 em setembro, dois (100%) DENV-2 em outubro, quatro (66,67%) DENV-2 e dois (33,33%) DENV-4 em novembro, um (4,35%) DENV-1, 17 (73,91%) DENV-2 e cinco (21,74%) DENV-4 em dezembro, 10 (5,38%) DENV-1, 27 (14,52%) DENV-2, 148 (79,57%) DENV-4 e uma (0,53%) co-infecção DENV-1/DENV-4 em janeiro de 2013, 6 (2,97%) DENV-1, 7 (3,47%) DENV-2, 188 (93,07%) DENV-4 e uma (0,49%) co-infecção DENV-1/DENV-4 em fevereiro, 13 (100%) DENV-4 em março, não houve nenhum caso positivo para DENV no mês de abril, 14 (11,38%) DENV-1, quatro (3,25%) DENV-2, 104 (84,55%) DENV-4, uma (0,82%) co-infecção DENV-1/DENV-4 em maio, três (14,29%) DENV-1, um (4,76%) DENV-2 e 17 (80,95%) DENV-4 em junho, um (9,09%) DENV-1, 10 (90,91%) DENV-4 em julho.

No período entre agosto 2013 a junho 2014, foram constatados 120 casos positivos. Entre agosto e novembro de 2013 não foram observados nenhum caso positivo para DENV, um caso (100%) de DENV-4 foi observado no mês de dezembro, um (33,33%) DENV-1, dois (66,67%) DENV-4 em janeiro de 2014, 10 (90,91%) DENV-1 e um (9,09%) DENV-4 em fevereiro, 12 (50%) DENV-1, três (12,5%) DENV-2 e nove (37,5%) DENV-4 em março, 23 (71,88%) DENV-1, sete (21,88%) DENV-2, um (3,12%) DENV-4 e um (3,12%) DENV-1/DENV-2 em abril, 28 (90,32%) DENV-1, 2 (6,45%) DENV-2 e um (3,23%) DENV-4 em maio, 15 (83,33%) DENV-1, 4 (11,11%) DENV-2 e um (5,56%) DENV-4 em junho.

Quando se analisa o padrão de ocorrência mensal dos casos de dengue, logo se observa uma nítida mudança na sua distribuição durante o ano, variando de acordo com a flutuação no regime pluvial (dado não mostrado). Independente da região ecológica, há uma tendência geral dos mosquitos concentrarem suas atividades como adultos na estação

chuvosa. Este padrão reflete-se também na distribuição do dengue ao longo do ano (REBÊLO et al., 1999).

A sucessão de epidemias intercaladas por períodos de pequeno número de casos denominados períodos interepidêmicos, pode ser interpretada como uma situação epidemiológica de dengue endêmico, tendência já observada em São José do Rio Preto (MONDINI et al., 2005). A situação endêmica requer, de um lado, a continuidade das ações de controle vetorial, públicas e da sociedade em geral, a serem progressivamente estimuladas na medida inversa da queda das notificações (MALAVASI, CORDEIRO, 2011).

5.3. Isolamento de Dengue virus em linhagem celular C6/36

Amostras de relevante interesse de cada sorotipo (DENV-1, 2 e 4) foram isoladas em linhagem celular C6/36 (clone do mosquito *Aedes albopictus*), para formação de estoque viral: 41 isolados de DENV-4 (BR/SJRP/131/2011, BR/SJRP/485/2012, BR/SJRP/500/2012, BR/SJRP/502/2012, BR/SJRP/505/2012, BR/SJRP/506/2012, BR/SJRP/510/2012, BR/SJRP/514/2012, BR/SJRP/529/2012, BR/SJRP/535/2012, BR/SJRP/545/2012, BR/SJRP/554/2012, BR/SJRP/555/2012, BR/SJRP/556/2012, BR/SJRP/559/2012, BR/SJRP/561/2012, BR/SJRP/562/2012, BR/SJRP/596/2012, BR/SJRP/598/2012, BR/SJRP/603/2012, BR/SJRP/605/2012, BR/SJRP/607/2013, BR/SJRP/608/2013, BR/SJRP/610/2013, BR/SJRP/611/2013, BR/SJRP/613/2013, BR/SJRP/614/2013, BR/SJRP/617/2013, BR/SJRP/618/2013, BR/SJRP/731/2013, BR/SJRP/732/2013, BR/SJRP/733/2013, BR/SJRP/848/2013, BR/SJRP/849/2013, BR/SJRP/850/2013, BR/SJRP/851/2013, BR/SJRP/852/2013, BR/SJRP/853/2013, BR/SJRP/854/2013, BR/SJRP/2194/2014, BR/SJRP/2345/2014), 16 isolados de DENV-1 (BR/SJRP/287/2011, BR/SJRP/354/2011, BR/SJRP/395/2011, BR/SJRP/430/2011, BR/SJRP/434/2011, BR/SJRP/437/2011, BR/SJRP/442/2011, BR/SJRP/455/2011, BR/SJRP/473/2011, BR/SJRP/477/2011, BR/SJRP/478/2011, BR/SJRP/481/2011, BR/SJRP/484/2012, BR/SJRP/492/2012, BR/SJRP/515/2012, BR/SJRP/516/2012), 7 isolados de DENV-2 (BR/SJRP/567/2012, BR/SJRP/572/2012, BR/SJRP/585/2012, BR/SJRP/625/2013, BR/SJRP/779/2013, BR/SJRP/846/2013, BR/SJRP/869/2013).

5.4. Avaliação do ensaio *Panbio® Dengue Early ELISA*

No estado de São Paulo, o DENV-4 foi detectado em 2011. Como não havia até o momento uma avaliação dos kits rápidos para detecção de NS1 com relação a esse sorotipo no Estado de São Paulo, aliado ao fato de que o estudo realizado por Souza e colaboradores

(2011), que descreve a introdução do DENV-4 na região de São José do Rio Preto (amostra processada também pelo Laboratório de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – identificação: BR/SJRP/131/2011), sugere que houve uma “falha” ao detectar a introdução deste sorotipo no país, o presente estudo apresentou como objetivo avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do ensaio *Panbio® Dengue Early ELISA*, utilizado pela Vigilância em dengue de São José do Rio Preto como método de triagem na detecção do antígeno NS1. Para isso foram analisadas duas situações epidemiológicas diferentes: (i) 80 amostras de soro coletadas durante período não-epidêmico (abril a julho de 2012) - 40 amostras NS1 negativas (nenhuma positiva por Multiplex-Nested-PCR) e 40 NS1 positivas, destas 34 amostras (85%) se mostraram positivas para DENV por Multiplex-Nested-PCR (19 DENV-1, 7 DENV-2, 0 DENV-3, 8 DENV-4) (Tabela 9); (ii) 140 amostras coletadas durante o período epidêmico (abril a julho 2013) – 100 NS1 negativas e 40 NS1 positivas. Das 40 amostras NS1 positivas, 34 (85%) foram positivas para DENV por Multiplex-Nested-PCR (3 DENV-1, 0 DENV-2, 0 DENV-3, 31 DENV-4). Dentre as 100 amostras NS1 negativas, 15 (15%) foram positivas para DENV-4 por Multiplex-Nested-PCR (Tabela 6). A proporção de casos positivos em condição não-epidêmica foi 0 e na condição de epidemia foi de 0,15, z-score de -2.5923 e valor-p de 0.0096, significativo para $p < 0.05$ (Apêndice I).

Tabela 6. Resultados do kit *Panbio® Dengue Early ELISA* de acordo com o número de dias após o início da febre em pacientes com infecção pelo DENV (80 amostras coletadas durante uma condição de não-epidemia e 140 amostras coletadas durante uma condição de epidemia) em função do sorotipo do DENV detectado por Multiplex-Nested-PCR (COLOMBO et al., 2013).

Número de soros testados	PanBio® Dengue Early ELISA	Multiplex-Nested-PCR	Sorotipos
	Número de casos positivos	Número de casos positivos	Número de casos positivos
Condição não-epidêmica			
40	0	0	
40	40	34	DENV-1 (19), DENV-2 (7), DENV-4 (8)
Condição epidêmica			
100	0	15	DENV-4 (15)
40	40	34	DENV-1 (3), DENV-4 (31)

Os dados observados comprovam a presença de resultados falsos negativos para NS1 com a utilização do kit comercial *Panbio® Dengue Early ELISA* durante o período de alta circulação de DENV-4 (condição epidêmica). Outros estudos também evidenciaram variações de sensibilidade em relação aos sorotipos DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BESSOFF et al, 2008; DUSSART et al., 2008; McBRIDE, 2009; RAMIREZ et al., 2009; LIMA et al., 2010; SILVA et al., 2011).

Dessa forma corrobora a hipótese de que a sensibilidade, especificidade e acurácia do ensaio *Panbio® Dengue Early ELISA* deve ser reavaliada pela Vigilância em dengue no estado de São Paulo, como método de triagem para para detecção do antígeno NS1 (SILVA et al., 2011; COLOMBO et al., 2013).

5.5 Análise da distribuição espacial das amostras de DENV-4

Mesmo com limitações para localizar as coordenadas geográficas das residências amostradas dos pacientes positivos para DENV-4 no município de São José do Rio Preto, obtidas por intermédio do banco de dados do SINAN, que envolvem, sobretudo falha no preenchimento de campos, foi possível obter uma distribuição espacial dos casos de DENV-4 no município de São José do Rio Preto nos anos 2011, 2012 e 2013, através de pontuação abrangendo uma determinada área (Figura 19). Em 2011, quatro bairros (80% dos casos georreferenciados) foram registrados com ocorrência de casos de DENV-4, nove bairros em 2012 (68% dos casos georreferenciados) e 42 (33% dos casos georreferenciados) em 2013.

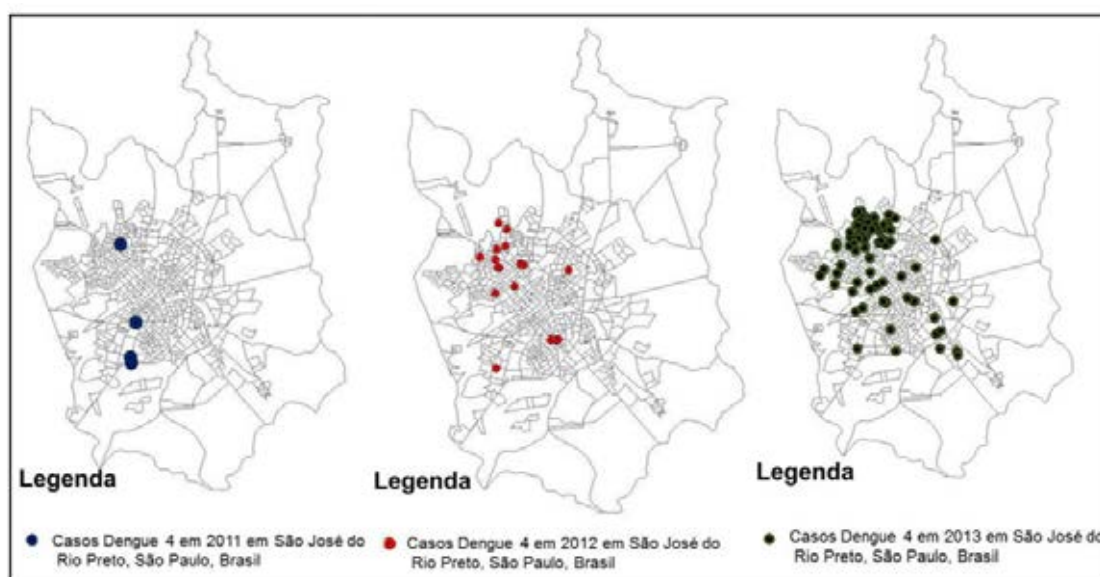


Figura 19. Amostras de dengue 4 georreferenciadas, para o município de São José do Rio Preto, nos anos 2011, 2012 e 2013.

Nota-se que os focos possuem uma distribuição uniforme nos três anos avaliados, variando na quantidade de casos. Em relação aos pontos isolados sugere-se que ocorreram casos de DENV-4 e por alguma falha (os pacientes podem não ter procurado as unidades de saúde nos primeiros dias da infecção para elucidar o diagnóstico) não foram registrados.

Outro fato detectado foi que a zona norte de São José do Rio Preto (região urbana com a maior concentração populacional da cidade) apresentou maior número de casos de dengue 4. Em estudo realizado por Mondini e Chiaravalloti-Neto (2008), os casos de dengue

confirmados entre 1994 e 1998 (período de circulação exclusiva do DENV-1) foram agrupados segundo setores censitários urbanos de São José do Rio Preto, apresentando alta incidência na zona norte da cidade.

Mondini e colaboradores (2005) constataram que no primeiro quadrimestre do período entre 1994 e 1998, a transmissão foi iniciada em poucos setores na zona norte do município, estendendo-se posteriormente ao restante do município. Provavelmente as ações de controle que foram desencadeadas após o início da transmissão tiveram menor efetividade nessa região. Dessa forma, a constatação de que a maior incidência de DENV-4 fosse encontrada em setores com menor nível socioeconômico era esperada para o período analisado no presente estudo (2011 – 2013), assim como para DENV-1 no período entre 1994 e 1998 (MONDINI, CHIARAVALOTTI-NETO, 2008); isso porque é na zona norte de São José do Rio Preto que se encontram os agrupamentos com a população mais carente do município e onde primordialmente houve a introdução do vírus (MONDINI et al., 2005).

5.6 Caracterização genotípica e análise filogenética dos isolados de DENV-4.

Foram amplificados de 33 amostras clínicas positivas para DENV-4, em uma única PCR, os 1738pb correspondentes a região do envelope do DENV-4 (Figura 20).

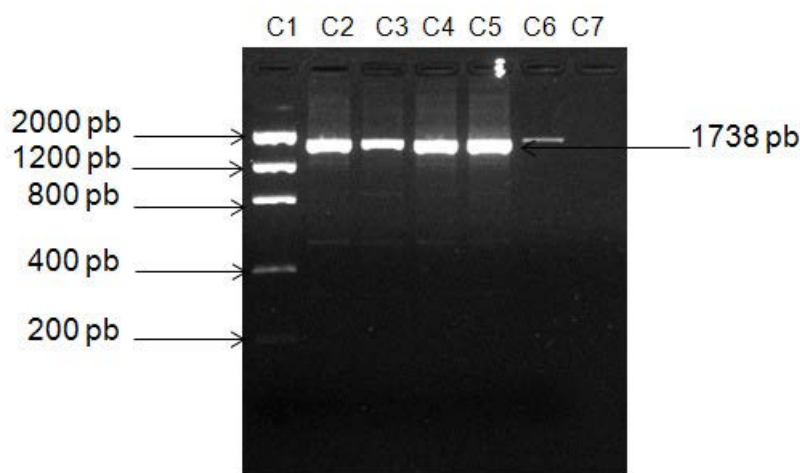


Figura 20. Foto representativa do gel de agarose que mostra bandas referentes à amplificação do gene do envelope de DENV-4 (1738 pb). Colunas: C1, *Low DNA mass ladder*; C2 a C6, DENV-4; C7, controle negativo.

5.6.1 Filogenia e genotipagem baseados na análise do gene do envelope (E)

Após o alinhamento e edição das 33 amostras sequenciadas, o fragmento correspondente ao gene E com 1489 nucleotídeos, compreendendo os nucleotídeos 941 a 2429 do gene E do genoma de referência da amostra NC-002640. As sequências localizaram-se no mesmo clado e foram caracterizadas como pertencentes ao Genótipo II (Americano)

(Figura 21). Este padrão filogenético foi similar as de outras amostras em circulação no país (CAMPOS et al., 2013; NAVECA et al., 2012; SOUZA et al., 2011), assim como em outros países da América do Sul, América Central e Caribe (ACOSTA et al., 2011; FORSHEY et al., 2009; FOSTER et al., 2003; LANCIOTTI et al., 1997; NUNES et al., 2012; RIGAU-PÉREZ et al., 2002; VILLABONA-ARENAS, ZANOTTO, 2011). A introdução do genótipo I, proveniente de um país asiático (MELO et al., 2009), foi documentada por Figueiredo e colaboradores (2008), bem como por Martins e colaboradores (2014), porém São José do Rio Preto ainda não apresenta circulação de diferentes genótipos com relação ao DENV-4.

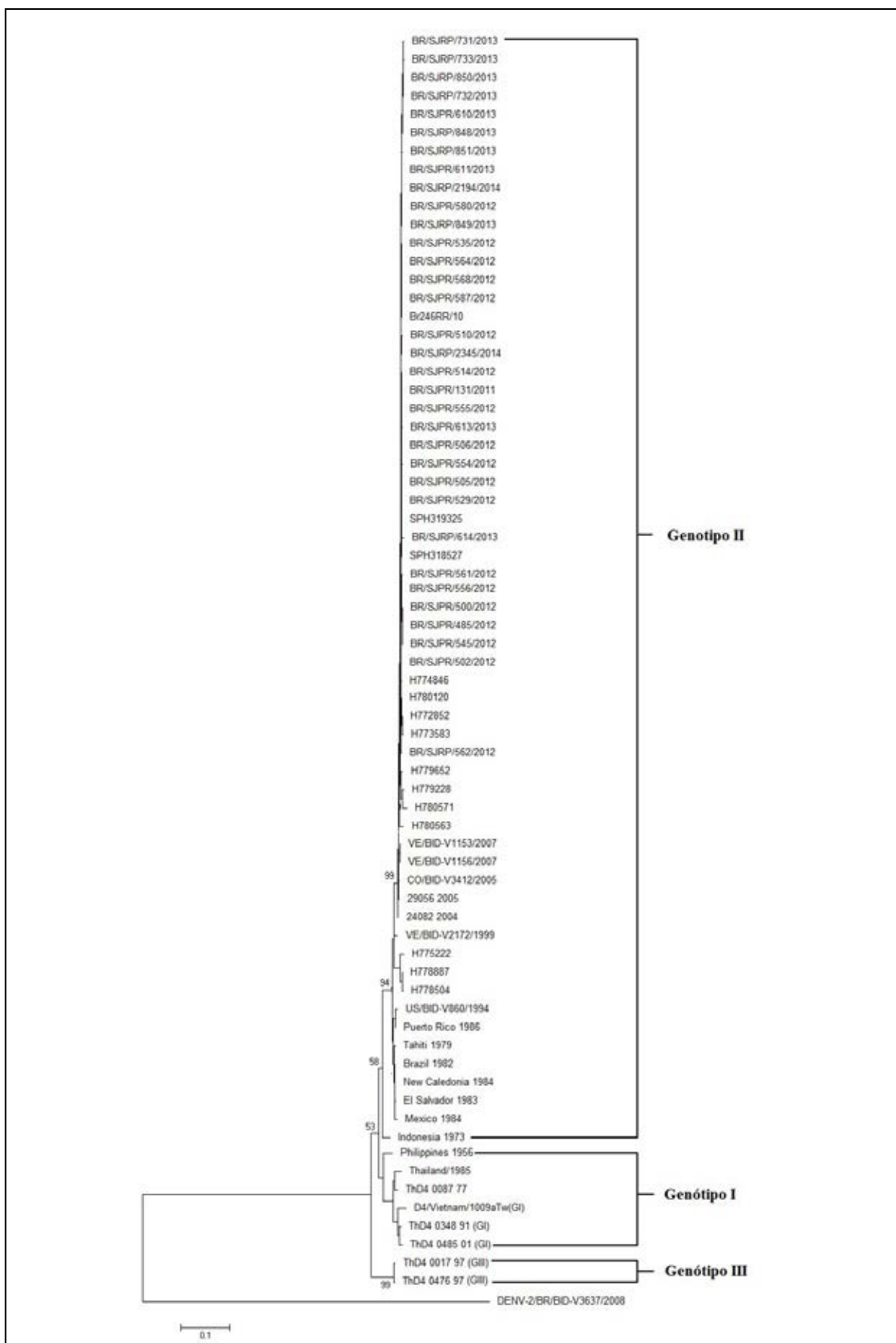


Figura 21. Reconstrução filogenética pelo método *Maximum Likelihood* de 33 seqüências de DENV-4, inferidas à partir de 1457 nucleotídeos do gene que codifica a proteína do Envelope (E). Representante de

DENV-2 (DENV-2/BR/BID-V3637/2008) foi utilizado como grupo externo. Identificação das amostras de DENV-4 do presente estudo: País/cidade/identificação da amostra/ano de isolamento.

5.6.2 Caracterização molecular baseada nas sequências completas do genoma viral

5.6.2.1 Análise do genoma completo dos DENV-4 obtidos no presente estudo

O sequenciamento do genoma completo dos dez isolados de DENV-4 circulantes em São José do Rio Preto (BR/SJRP/500/2012, BR/SJRP/505/2012, BR/SJRP/506/2012, BR/SJRP/514/2012, BR/SJRP/556/2012, BR/SJRP/580/2012, BR/SJRP/610/2013, BR/SJRP/614/2013, BR/SJRP/733/2013 e BR/SJRP/850/2013) compreendeu aproximadamente 10.292 nucleotídeos. Referente às amostras isoladas em C6/36 (segunda passagem referente às amostras BR/SJRP/613 e BR/SJRP/614), foi detectada a presença de *Aedes albopictus* C6/36 cell densovirus (AeDNV) co-infectando a linhagem de células C6/36 (identidade genética em torno de 100% quando comparado ao genoma de referência de AeDNV - AY095351) (Figura 22), achado laboratorial que demonstra a importância do tratamento do RNA extraído do sobrenadante de células C6/36 com DNase para evitar contaminação, uma vez que o AeDNV, um vírus de DNA, está presente nessa linhagem desde seu estabelecimento (MOSIMANN et al., 2011).

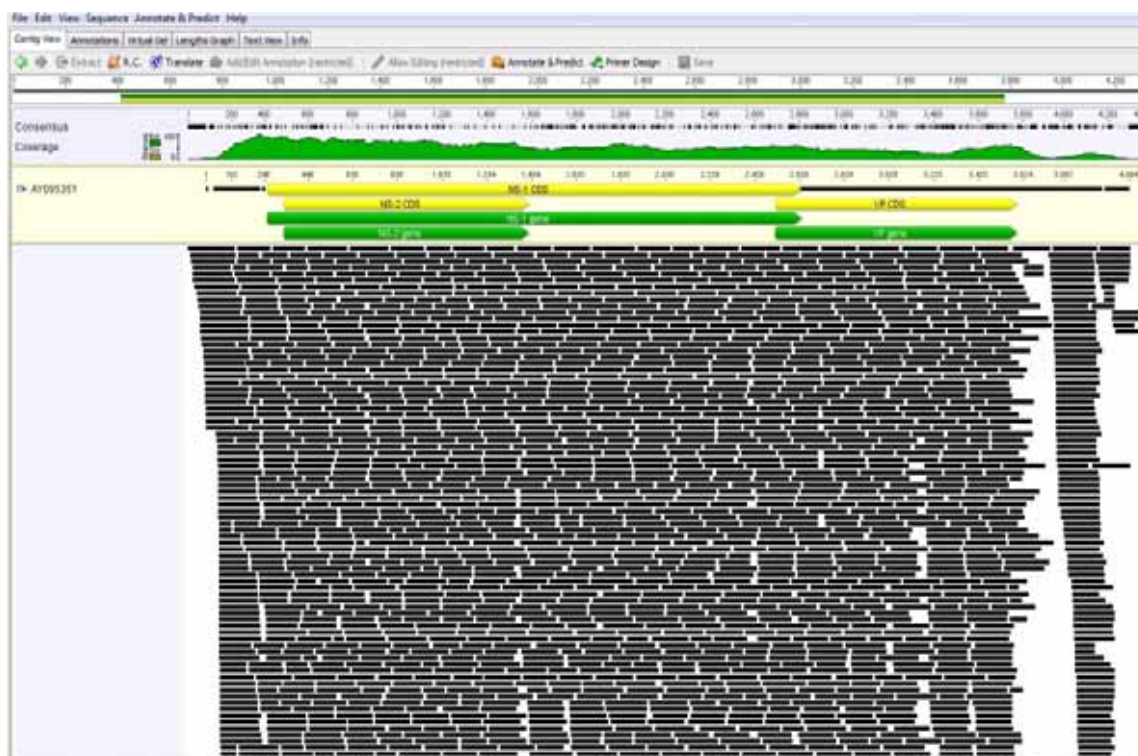


Figura 22. Identidade entre sequências de AeDNV encontradas em amostras isoladas em C6/36 e a sequência AY095351 (Nº de acesso *GenBank* da cepa referência utilizada para comparação).

5.6.2.2 Filogenia e genotipagem baseados na análise do genoma completo dos DENV-4 obtidos no presente estudo

A análise do genoma completo dos dez isolados de DENV-4 circulantes em São José do Rio Preto, demonstrou que todos os isolados estudados, pertencentes ao Genótipo Americano, encontram-se filogeneticamente relacionados com os isolados encontrados na região norte da América do Sul (Figura 23), dado que corrobora com o que foi demonstrado no trabalho realizado por Nunes e colaboradores (2012) que revelou múltipla introdução do genótipo II no Brasil, emergindo e reemergindo no país através de três origens distintas: Sudeste Asiático, região do Caribe e Venezuela.

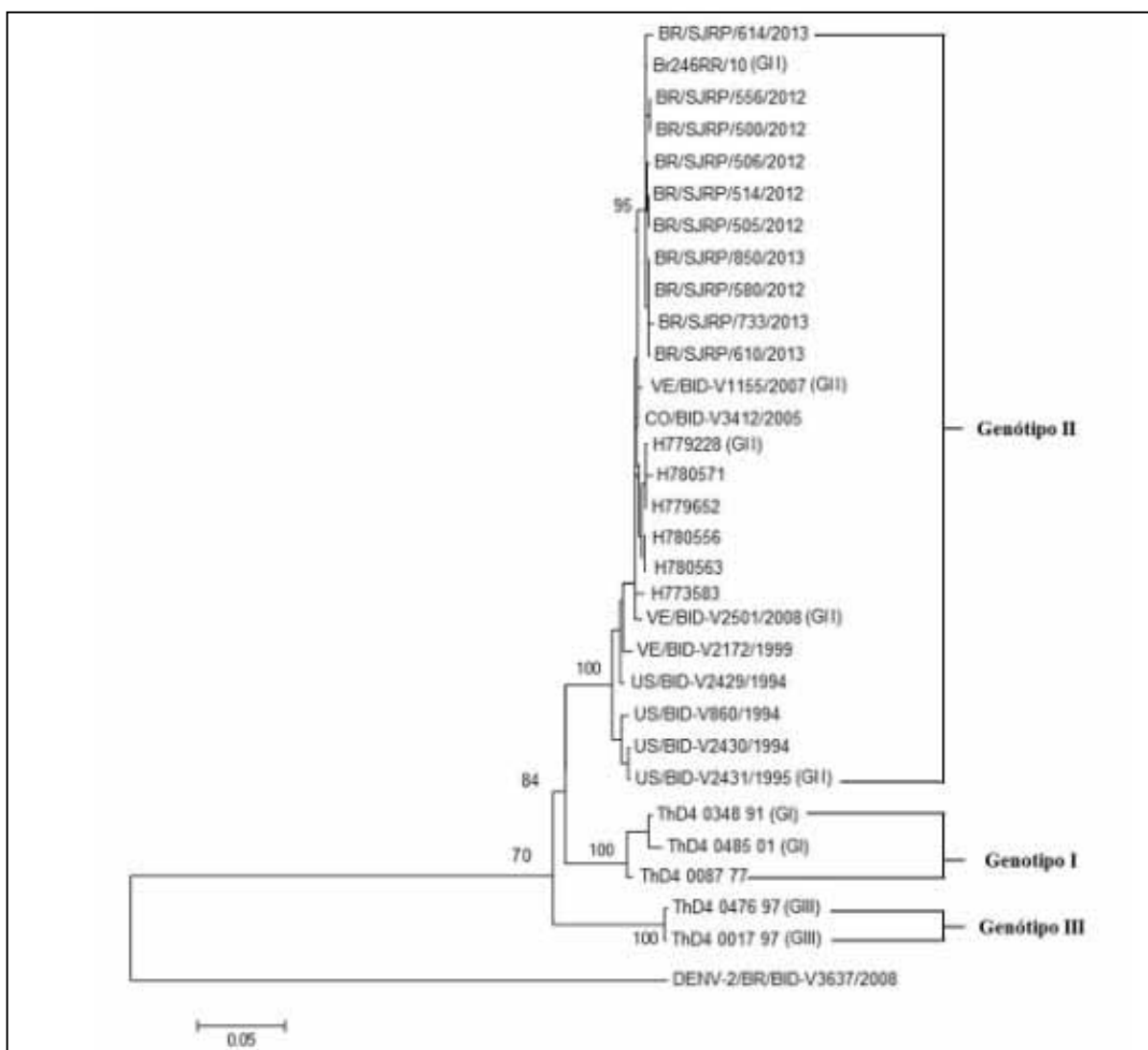


Figura 23. Árvore filogenética de linhagens de DENV-4 baseada na sequência completa do genoma de dez amostras provenientes de São José do Rio Preto através do método *Maximum Likelihood*. Representante de DENV-2 (DENV-2/BR/BID-V3637/2008) foi utilizado como grupo externo. Identificação das amostras de DENV-4 do presente estudo: País/cidade/identificação da amostra/ano de isolamento.

5.6.2.3 Análise das sequências de DENV-4 baseada no alinhamento do gene do envelope, assim como do genoma completo

Substituições em nucleotídeos e aminoácidos foram encontradas ao longo dos genomas dos isolados de DENV-4 estudados.

A média da identidade entre os DENV-4 isoladas em São José do Rio Preto foi de 99,99%, e entre elas e a amostra NC002640, utilizada como referência, foi em média 98,7%. Com relação a porcentagem de similaridade entre o aminoácidos das amostras de DENV-4 isoladas em SJRP e a amostra NC002640 foi encontrado 99,3% de similaridade.

À partir da análise da poliproteína, 128 substituições de nucleotídeos foram observadas ao longo do genoma quando comparadas entre si e com a amostra NC002640. A região 3'UTR não apresentou nenhuma alteração entre os genomas analisados, já a região 5'UTR apresentou uma única alteração nucleotídica entre os genomas analisados. Esta substituição ocorreu no nucleotídeo 43 (T → C) em todos os isolados de SJRP que apresentaram o genoma completo sequenciado (BR/SJRP/500/2012, BR/SJRP/505/2012, BR/SJRP/506/2012, BR/SJRP/514/2012, BR/SJRP/556/2012, BR/SJRP/580/2012, BR/SJRP/610/2013, BR/SJRP/614/2013, BR/SJRP/733/201 e BR/SJRP/850/2013). As demais substituições nucleotídicas encontradas ocorreram em genes estruturais (28%) e não-estruturais (72%).

Foram observadas 51 substituições de aminoácidos (Quadros 1, 2, 3 e 4). Dessas, 12 (21%) foram encontradas em proteínas estruturais, enquanto que 40 (79%) ocorreram em proteínas não-estruturais. Nenhuma das substituições encontradas resultou em alteração da classe dos aminoácidos (conservativas), fato também observado por Weaver e Vasilakis (2009) e Villabona-Arenas e Zanotto (2011).

Quadro 1. Ocorrência de substituição de aminoácidos entre as sequências de DENV-4 (proteína estruturais Capsídeo e precursora de membrana).

Gene	Posição na poliproteína	500/2012	556/2012	580/12	614/2012	NC002640
C	49	L	L	L	L	F
prM	115	H	H	H	H	S

Nº de acesso *GenBank* da linhagem de referência utilizada para comparação: NC002640. F = Fenilalanina, L = Leucina, S = Serina, H = Histidina.

Quadro 2. Ocorrência de substituição de aminoácidos entre as seqüências de DENV-4 (proteína do envelope).

Posição na poliproteína	131/2011	485/2012	500/2012	502/2012	505/2012	506/2012	510/2012	514/2012	529/2012	535/2012	545/2012	554/2012	555/2012	556/2012	561/2012	562/2012	564/2012	NC002640
313	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	M
343	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S
404	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	I
442	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	M
501	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
549	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V
603	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V
630	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I
633	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S
740	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F

Nº de acesso *GenBank* da linhagem de referência utilizada para comparação: NC002640. *Aminoácidos iguais ao da linhagem de referência. Rosa – domínio I, verde – domínio II, azul – domínio III e região hidrofóbica. A = Alanina, F = Fenilalanina, I = Isoleucina, L = Leucina, M = Metionina, S = Serina, T = Treonina, V = Valina.

Quadro 3. Ocorrência de substituição de aminoácidos entre as seqüências de DENV-4 (proteína do envelope) - continuação.

Posição na poliproteína	568/2012	580/2012	587/2012	610/2013	611/2013	613/2013	614/2013	731/2013	732/2013	733/2013	848/2013	849/2013	850/2013	851/2013	2194/2014	2345/2014	NC002640
313	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*	*	*	M
343	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S
404	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	I
442	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	M
501	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
549	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V
603	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V
630	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I
633	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S
740	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F

Nº de acesso *GenBank* da linhagem de referência utilizada para comparação: NC002640. *Aminoácidos iguais ao da linhagem de referência. Rosa – domínio I, verde – domínio II, azul – domínio III e região hidrofóbica. A = Alanina, F = Fenilalanina, I = Isoleucina, L = Leucina, M = Metionina, S = Serina, T = Treonina, V = Valina.

Quadro 4. Ocorrência de substituição de aminoácidos entre as sequências de DENV-4 (proteínas não-estruturais).

Gene	Posição na poliproteína	500	505	506	514	556	580	610	614	733	850	NC002640
NS1	780	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	A
NS1	785	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K
NS1	882	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V
NS1	896	R	*	*	*	R	*	*	*	*	*	K
NS1	905	N	*	*	*	N	*	*	*	*	*	S
NS1	927	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	L
NS1	988	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K
NS1	1064	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D
NS2a	1161	A	*	*	*	A	A	*	A	*	*	V
NS2a	1198	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	I
NS2a	1203	*	*	*	*	*	I	I	*	I	I	M
NS2a	1238	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	V
NS2a	1284	*	I	I	I	*	*	*	*	*	*	M
NS2a	1285	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	P
NS2b	1393	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	A
NS2b	1404	R	*	*	*	R	*	*	*	*	*	C
NS2b	1418	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	V
NS2b	1460	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	V
NS3	1476	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S
NS3	1488	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	K
NS3	1565	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	K
NS3	1909	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	P
NS3	1911	A	*	*	*	A	*	*	*	*	*	G
NS3	1955	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	K
NS3	1974	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Y
NS3	2032	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	E
NS3	2068	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	R
NS4b	2440	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	I
NS5	2492	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T
NS5	2549	*	*	*	*	*	*	*	*	E	*	K
NS5	2550	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	W
NS5	2558	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	V
NS5	2582	*	*	*	*	*	*	*	*	E	*	K
NS5	2628	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	D
NS5	2629	*	*	P	*	*	*	*	*	*	*	T
NS5	2756	*	*	*	*	*	I	I	*	I	I	T
NS5	2910	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*	S
NS5	3136	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K
NS5	3313	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	T
NS5	3372	*	*	*	*	*	S	S	*	S	S	P

Nº de acesso *GenBank* da linhagem de referência utilizada para comparação: NC002640. *Aminoácidos iguais ao da linhagem de referência. A = Alanina, C = Cisteína, D = Aspartato, E = Glutamato, F = Fenilalanina, G = Glicina, I = Isoleucina, K = Lisina, L = Leucina, M = Metionina, N = Asparagina, P = Prolina, Q = Glutamina, R = Arginina, S = Serina, T = Treonina, V = Valina, Y = Tirosina, W = Triftofano.

A proteína do envelope apresenta três domínios: domínio I (abrangendo os resíduos 280-332 e 412-473), domínio II (resíduos nas posições 332-412, 473-560), domínio III (resíduos 576-674) e região hidrofóbica (resíduos 674-774) (contagem realizada à partir da poliproteína) (MODIS et al., 2005).

Mutações em determinadas regiões da proteína E podem influenciar na virulência dos flavivírus, pois no domínio III se encontra o ligante viral à célula hospedeira; o domínio II

atua como dobradiça durante a mudança conformacional fusogênica da proteína e na região de contato entre a interface dos domínios I e III (STROTTMANN, SANTOS, 2008).

Em todas as amostras de São José do Rio Preto foram observadas mutações em comum na proteína do envelope. Nas posições 442 no domínio I (M442T, aminoácido apolar por polar), 343 (S343L, aminoácido polar por apolar) e 501 (A501T, aminoácidos polares) no domínio II, 630 (I630V, aminoácidos apolares) e 633 (S633A, aminoácido polar por apolar) no domínio III (Quadros 2 e 3). As substituições metionina por treonina no domínio I e isoleucina por valina no domínio III também foram observadas em outros estudos, os quais sugeriram que mutações entre aminoácidos de características diferentes (polar por apolar, e vice-versa) poderiam alterar a estrutura tridimensional da proteína (BENETT et al., 2003). Frente a idéia proposta por Benett e colaboradores (2003), o presente estudo realizou a análise de modelagem molecular por homologia nos isolados de DENV-4 sequenciados.

Toda a discussão gerada no presente trabalho, no que diz respeito a estrutura do DENV, foi feita à partir das informações geradas para a estrutura cristalizada já publicada para DENV, assim como para outros flavivírus (MODIS et al., 2003; MODIS et al., 2004; MODIS et al., 2005).

Na figura 24 está representado a estrutura tridimensional do modelo da proteína E com as respectivas mutações em comum entre as amostras de São José do Rio Preto que aparecem em folhas beta (M442T e S343L) e expostas como alças ou voltas (A501T, I630V, S633A) que se projetam para a superfície. Estruturalmente estas mutações não demonstraram interferir na conformação da proteína e nem no valor calculado de pI (7.9).

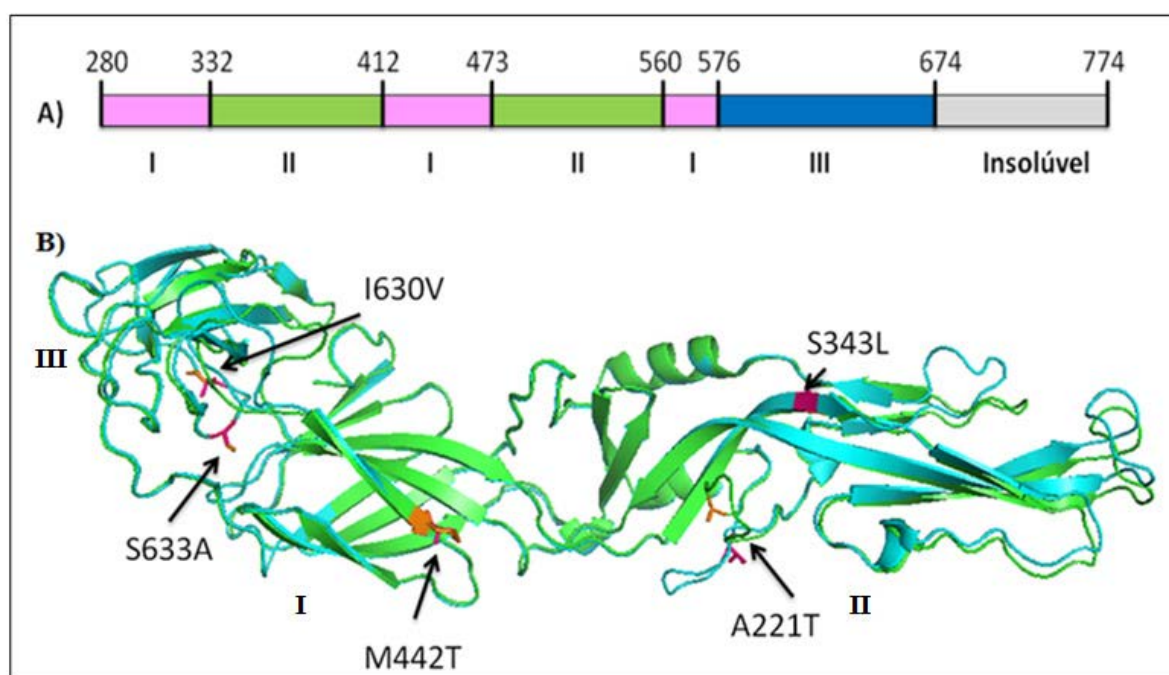


Figura 24. Estrutura tridimensional dos modelos da proteína do envelope (E) do DENV-4. A proteína foi baseada na estrutura cristalográfica de alta resolução da proteína 3UAJ-B do DENV-4 (COCKBURN et al., 2012). A) Localização da proteína E na poliproteína dividida em domínios: domínio I (8 folhas beta), domínio II (12 folhas beta) e domínio III (10 folhas beta). B) Em verde o modelo da proteína E representando NC002640 e em azul claro o modelo representando as mutações encontradas nas amostras sequenciadas de São José do Rio Preto.

Com relação às substituições de aminoácidos nas proteínas não estruturais, apresentaram destaque as proteínas NS1, NS3 e NS5 (Quadro 4). Duas delas, NS3 e NS5, são particularmente interessantes por participarem do complexo de replicação viral e serem determinantes de patogenicidade ao interagirem com dezenas de proteínas do hospedeiro (KHROMYKH et al., 1998; MATUSAN et al., 2001; HANLEY et al., 2002).

Analisando o alinhamento das sequências da proteína NS1, algumas mutações (entre aminoácidos de mesma característica) se apresentaram em comum nas amostras de São José do Rio Preto: A780V, K785R, V882A, L927F, K988R, D1064N (Quadro 4). A mutação entre os aminoácidos lisina por arginina (aminoácidos polares) também foi observada no estudo realizado por Benett e colaboradores (2003).

Na figura 25(A) estão representados os modelos estruturalmente conservados da proteína NS1, construídos em torno de um domínio de folhas beta (Figura 25B e C) (AKEY et al., 2014), com as respectivas mutações que aparecem em folhas beta (A780V, L927F, K988R) e expostas como alças ou voltas (K785R, V882A e D1064N) que se projetam para a superfície. O valor de pI se manteve constante (6.82).

O estudo realizado por Akey e colaboradores (2014) demonstrou que mutações em determinadas regiões conservadas da proteína NS1 (Gly¹⁵⁹-Phe-Gly-Val¹⁶²) podem afetar a replicação viral, enquanto que outras mutações (F160A) podem afetar a viabilidade viral, assim como a síntese de RNA.

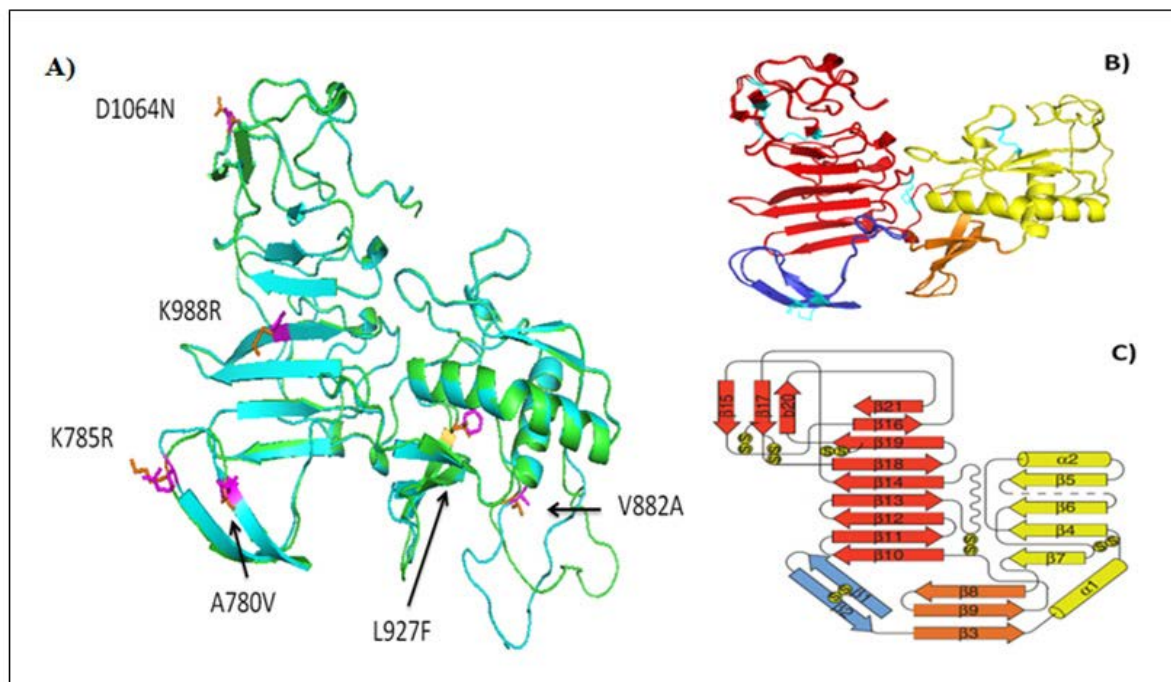


Figura 25. Estrutura tridimensional dos modelos da proteína NS1 do DENV-4. A proteína foi baseada na estrutura cristalográfica de alta resolução da proteína 3UAJ-B do DENV-2 (AKEY et al., 2014). A) Em verde o modelo da proteína NS1 representando NC002640 e em azul claro o modelo representando as mutações encontradas nas amostras sequenciadas de São José do Rio Preto. Em linhas estão destacadas as ligações dissulfeto e as flechas indicam o local das mutações em rosa para o modelo de referência e em laranja para o modelo representando as mutações nas amostras de São José do Rio Preto. B) Estrutura da NS1 com as ligações dissulfeto e colorida por domínios: em azul o domínio beta barril (*Beta-rolls*), em laranja o subdomínio conector, em amarelo o domínio asa (*wing*) e em vermelho o domínio central (*central beta ladder*). C) Diagrama da topologia da NS1 colorida como na figura B.

Com relação ao alinhamento das sequências da proteína NS3, algumas mutações (entre aminoácidos de mesma característica) foram comuns nas amostras de São José do Rio Preto: S1476I (aminoácido polar por apolar), K1488Q (aminoácidos polares), P1909T (aminoácido apolar por polar), E2032K (aminoácidos polares), R2068K (aminoácidos polares) (Quadro 4). A figura 26 mostra os modelos estruturalmente conservados da proteína NS3 com as respectivas mutações que aparecem expostas como alça que se projeta para a superfície. O valor de pI se manteve constante (8.53).

No estudo realizado por Strottmann e Santos (2008), a associação das mutações na proteína E e no domínio helicase da proteína NS3 apresentam um efeito sinérgico na modulação do *fitness* viral *in vitro* e *in vivo*, aumentando a síntese de RNA, a carga viral, a robustez da resposta imune e mortalidade dos animais. No entanto, os vírus contendo apenas as mutações na proteína NS3 (NS3435 e NS3480) foram capazes de se replicar eficientemente no sistema nervoso central de camundongos, causando encefalite e altas taxas de mortalidade, o que sugere que essas mutações desempenham um papel importante na modulação da replicação viral *in vivo* (STROTTMANN, SANTOS, 2008).

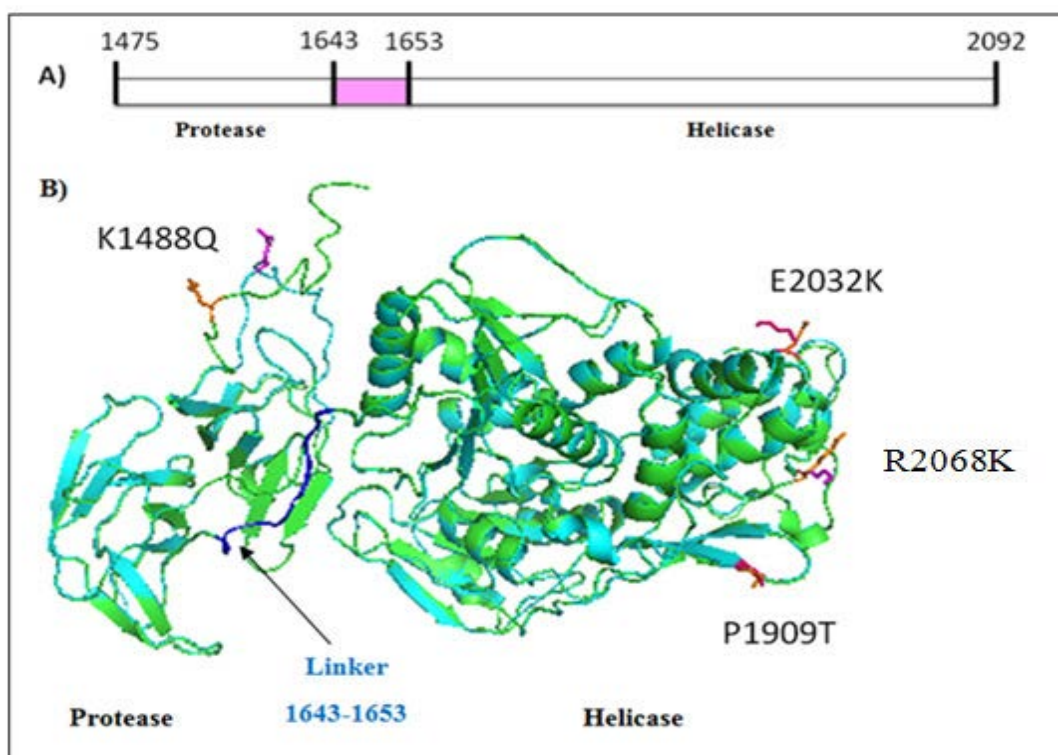


Figura 26. Estrutura tridimensional dos modelos da proteína NS3 do DENV-4. A proteína foi baseada na estrutura cristalográfica de alta resolução da proteína 2VBC-A do DENV-4 (LUO et al., 2008). A) Localização da proteína NS3 na poliproteína. Em rosa a região que liga os domínios Protease e Helicase. B) Em verde o modelo da proteína E representando a sequência de referência NC002640 e em azul claro o modelo representando as mutações encontradas nas amostras sequenciadas de São José do Rio Preto. A região que liga os domínios Protease e Helicase está destacada em azul. Em rosa está destacado o local da mutação dos resíduos de aminoácidos para o modelo de referência e em laranja para o modelo representando as mutações nas amostras de São José do Rio Preto.

Para finalizar as análises das proteínas não-estruturais, o alinhamento das sequências da proteína NS5 indicou três mutações em comum nas amostras de São José do Rio Preto: T2492A (aminoácidos apolares), K3136R (aminoácidos polares), T3313I (aminoácido polar por apolar). Na figura 27 estão representados os modelos estruturalmente conservados da proteína NS5 com as respectivas mutações que aparecem expostas como alças que se projetam para a superfície. O valor de pI se manteve constante (8.85).

A proteína NS5 tem demonstrado a proteína mais conservada no genoma do DENV (RAWLINSON et al., 2006). Entretanto, resíduos ou regiões individuais ainda podem apresentar números mais altos do que o esperado de substituições, permitindo uma mudança na função da proteína (SCHMIDT et al., 2011).

Lim e colaboradores (2013) revelaram através do alinhamento das sequências da proteína NS5, uma conservação de aminoácidos (Glu²⁶⁸ e Glu²⁷⁰) específica entre os quatro sorotipos de DENV. Foi investigado o papel de determinados resíduos na atividade da RNA polimerase, atividade esta que se apresentou aumentada com a mutação T269A.

Uma região homóloga da proteína NS5, presente no vírus Langat (Flavivirus), foi previamente implicada na regulação da função do interferon (PARK et al., 2007). Este estudo levou a Lim e colaboradores (2013) levantar uma hipótese sobre a contribuição que os mesmos testes realizados *in vitro* por Park e colaboradores (2007) poderiam ajudar na compreensão do papel da mutação G374E, presente na proteína NS5 do DENV-3, no *fitness* e/ou na patogênese viral.

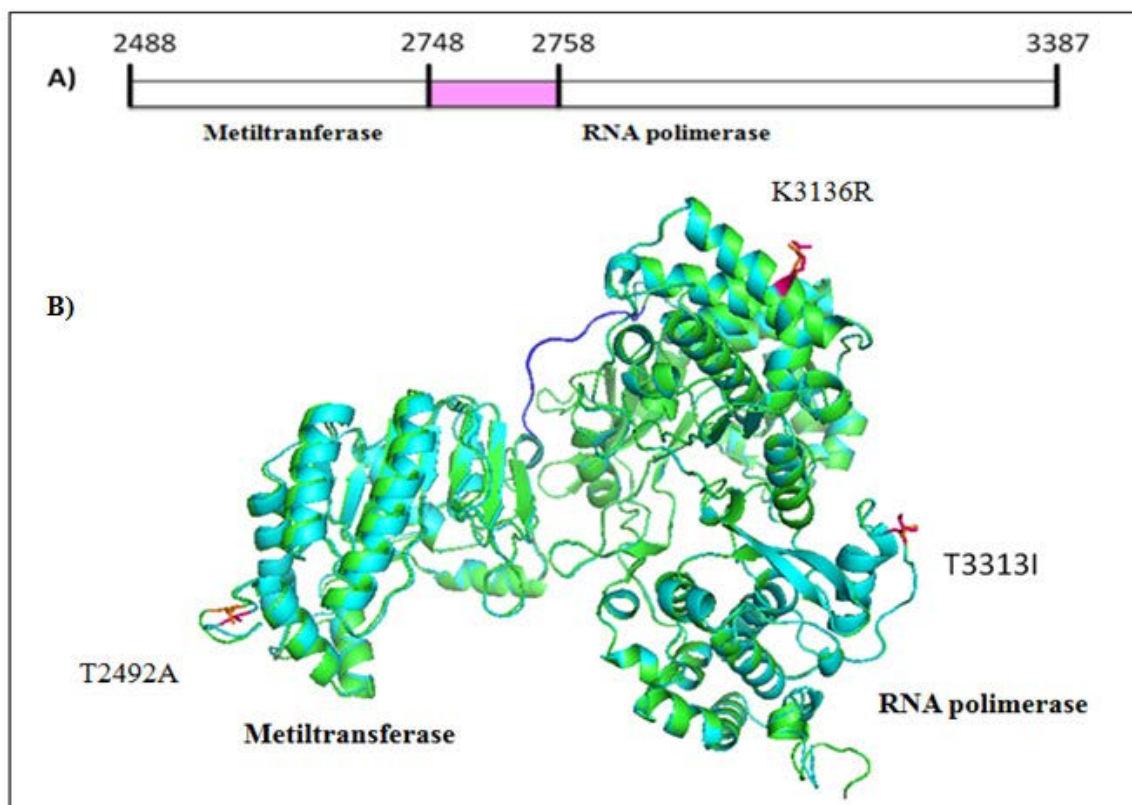


Figura 27. Estrutura tridimensional dos modelos da proteína NS5 do DENV-4. A proteína foi baseada na estrutura cristalográfica de alta resolução da proteína 4K6M-A do vírus da encefalite japonesa (LU, GONG, 2013). A) Localização da proteína NS5 na poliproteína. Em rosa a região que liga o domínio Metiltransferase com o domínio RNA Polimerase. B) Em verde o modelo da proteína E representando a sequência de referência NC002640 e em azul claro o modelo representando as mutações encontradas nas amostras sequenciadas de São José do Rio Preto. Em rosa escuro estão destacadas as mutações dos resíduo de aminoácidos para o modelo de referência e em laranja para o modelo representando as mutações nas amostras de São José do Rio Preto. Em azul escuro está demonstrado a região de ligação entre os dois domínios.

A análise das estruturas das proteínas E, NS1, NS3 e NS5 aqui apresentadas, revela que todas as mutações, consideradas comuns entre as amostras de São José do Rio Preto, não ocorreram em regiões de interação ou sítio ativo das proteínas virais já estabelecidas na literatura (UNIPROT, 2014), sugerindo que estas modificações na sequência primária das proteínas possam não interferir em suas funções (LEITMEYER et al., 1999; LIM et al., 2013; AKEY et al., 2014).

Mais estudos são necessários para entender como as mutações podem ou não influenciar na estrutura das proteínas virais, podendo dessa forma proporcionar um impulso em novas dinâmicas e estudos estruturais, assim como oferecer possibilidades adicionais para o projeto de compostos que são ativos contra Flavivirus (LUO et al., 2008).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Após a análise deste estudo foi possível concluir que existe a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 em São José do Rio Preto entre agosto de 2011 a junho de 2014, evidência clara de hiperendemicidade.
- A média de idade entre os indivíduos acometidos foi de $36,74 \pm 17,21$ anos com discreto predomínio do gênero feminino (53,38%), não havendo correlação estatística significativa com determinado sorotipo.
- Os dados observados (15% das amostras NS1 negativas foram positivas para DENV-4 por Multiplex-Nested-PCR) comprovam a presença de resultados falsos negativos para NS1 com a utilização do kit comercial *Panbio® Dengue Early ELISA* durante o período de alta circulação de DENV-4 (condição epidêmica).
- Amostras de relevante interesse de cada sorotipo (41 DENV-4, 16 DENV-1 e 7 DENV-2) foram isoladas em linhagem celular C6/36 (clone do mosquito *Aedes albopictus*), para formação de estoque viral.
- Com a utilização de técnicas de geoestatística dos casos de dengue foi possível a detecção de áreas (zona Norte de São José do Rio Preto) com risco relativo elevado de ocorrência de dengue (DENV-4 no caso analisado), áreas estas que foram priorizadas com relação ao emprego de medidas de vigilância e controle.
- Foi detectada a presença de um único genótipo e linhagem nos isolados de DENV-4 pertencentes ao genótipo II em São José do Rio Preto, SP. A filogenia do genoma completo de DENV-4 apresenta relação entre os isolados de São José do Rio Preto com os isolados encontrados na região norte da América do Sul.
- Foram observadas 52 substituições de aminoácidos nas regiões estruturais e não-estruturais do genoma, sendo 12 (21%) encontradas em proteínas estruturais e 40 (79%) em proteínas não-estruturais. Nenhuma substituição resultou em alteração da classe dos aminoácidos.
- Todas as mutações encontradas nas proteínas E, NS1, NS3 e NS5, mutações consideradas comuns entre as amostras de São José do Rio Preto, não ocorreram em regiões de interação ou sítio ativo das proteínas virais já estabelecidas na literatura, sugerindo que estas modificações na sequência primária das proteínas possam não interferir em suas funções.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-BAS, C.; GÓMEZ-CORDERO, I. Biología y métodos diagnósticos del dengue. **Revista Biomédica**. v. 16, p.113-137, 2005.
- ACOSTA, P.O.; MAITO, R.M.; GRANJA, F.; CORDEIRO, J.S.; SIQUEIRA, T.; CARDOSO, M.N.; CORADO, A.L.; BARLETTA-NAVECA, R.H.; NAVECA, F.G. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 17, p. 1979-1980, 2011.
- ADAMS, B.; HOLMES, E.C.; ZHANG, C.; MAMMEN, M.P.; NIMMANNITY, S.; KALAYANAOOJ, S.; BOOTS, M. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. v.103, p.14234-9, 2006.
- AKEY, D.L.; BROWN, W.C.; DUTTA, S.; KONWERSKI, J.; JOSE, J.; JURKIW, T.J.; DELPROPOSTO, J.; OGATA, C.M.; SKINIOTIS, G.; KUHN, R.J.; SMITH, J.L. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. **Science**. v. 343, n. 6173, p. 881-5, 2014.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDERSON, J.R.; RICO-HESSE, R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 75, n. 5, p. 886-892, 2006.
- ARAÚJO, J. M.; NOGUEIRA, R. M.; SCHATZMAY, R H. G.; ZANOTTO, P. M.; BELLO, G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 716-725, 2009.
- ARAÚJO, F.M.C.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G.; RAMALHO, I.L.C.; RORIZ, M.L.F.; MELO, M.E.L.; COELHO, I.C.B. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 925-8, 2006.
- ARAÚJO, T.P.; RODRIGUES, S. G.; COSTA, M.I.W.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, A.P.A.T. Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos no Estado do Pará, Brasil, 1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n. 6, p. 579-584, 2002.
- ARMSTRONG, P.M.; RICO-HESSE, R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 68, n. 5, p. 539-544, 2003.

AZEVEDO, A.S.; YAMAMURA, A.M.; FREIRE, M.S.; TRINDADE, G.F.; BONALDO, M.; GALLER, R.; ALVES, A.M.B. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. 1 – 8, 2011.

BASTOS, M.B. **Perfil soroepidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001)**. Manaus (AM). [Tese]. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2004.

BASTOS, M.S.B.; FIGUEIREDO, R.M.P.; RAMASAWMY, R.; ITAPIREMA, E.; GIMAQUE, J.B.L.; SANTOS, L.O.; FIGUEIREDO, L.T.M.; MOURÃO, M.P.G. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 45, n. 3, p. 393-394, 2012.

BARONI, C.J.; OLIVEIRA, T.B. Aspectos Epidemiológicos da Febre Clássica da Dengue, em Giruá – RS. **RBAC**. v. 41, n. 4, p. 289-293, 2009.

BARRETO, F.R.; TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, M.S.; BARRETO, M.L. Spread pattern of the first dengue epidemics in the city of Salvador, Brazil. **BMC Public Health**, v. 8, n. 1, p. 51, 2008.

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. Dengue in Brazil: epidemiological situation and contribution to a research agenda. **Estud. Av.** v. 22, p. 53-72, 2008.

BENNETT, S.N.; HOLMES, E.C.; CHIRIVELLA, M.; RODRIGUEZ, D.M.; BELTRAN, M.; VORNDAM, V.; GUBLER, D.J.; MCMILLAN, O. Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus. **Molecular Biology and Evolution**. v. 20, n. 10, p. 1650-1658, 2003.

BENNETT, S.N.; HOLMES, E.C.; CHIRIVELLA, M.; RODRIGUEZ, D.M.; BELTRAN, M.; VORNDAM, V.; GUBLER, D.J.; MCMILLAN, O. Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade introduction. **J. Gen. Virol.** v. 87, p. 885-893, 2006.

BERNARDES-TERZIAN, A.C.; DE-MORAES-BRONZONI, R.V.; DRUMOND, B.P.; DA SILVA-NUNES, M.; DA SILVA, N.S.; URBANO-FERREIRA, M.; SPERANÇA, M.A.; NOGUEIRA, M.L. Sporadic Oropuche virus infection, Acre, Brazil. **Emergence Infect Dis.** v. 15, n. 2, p. 348-50, 2009.

BERQUÓ, E.S.; GOTLIED, S.L.D.; SOUZA, J.M.P. **Bioestatística**. Editor: Diversos, p. 368, 1999.

BESSOFF, K.; DELOREY, M.; SUN, W.; HUNSPERGER, E. Comparison of 2 commercially available dengue NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of acute DENV infection with a single clinical sample. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 5, p. 1513-1518, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose**. Cadernos de Atenção Básica, n. 21. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 842, 2002.

BRONZONI, R.V.M.; BALEOTTI, F.G.; NOGUEIR, R.M.R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L.T. Duplex Reverse Transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

BURKE, D.S.; MONATH, T.P. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. **Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia**, p. 1043-1125, 2001.

CÂMARA, G; MONTEIRO, A.M.V.; FUCKS, S.D.; CARVALHO, M.S. Análise Espacial e Geoprocessamento. Cap 1. **Análise Espacial e Geoprocessamento**, 2004.

CAMPOS, R.D.M.; VEIGA, C.S.; MENESES, M.D.; de SOUZA, L.M.; FERNANDES, C.A.; MALIRAT, V.; ALBUQUERQUE, J.P.; TANURI, A.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; FERREIRA, D.F. Emergence of Dengue virus 4 genotypes II b and I in the city of Rio de Janeiro. **J. Clin. Virol.** v. 56, n. 1, p. 86-88, 2013.

CAREY, D.E.; MYERS, R.M.; DERANTZ, C.M.; JADHAY, M.; REUBEN, R. Chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 4, p. 434, 1969.

CARNEIRO, A.R.; CRUZ, A.C.R.; VALLINOTO, M.; MELO, D.V.; RAMOS, R.T.; MEDEIROS, D.B.A.; SILVA, E.V.P.; VASCONCELOS, P.F.C. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 805-812, 2012.

CARRILLO-VALENZO, E.; DANIS-LOZANO, R.; VELASCO-HERNÁNDEZ, J.X.; SÁNCHEZ-BURGOS, G.; ALPUCHE, C.; LÓPEZ, I.; ROSALES, C.; BARONTI, C.; DE LAMBALLERIE, X.; HOLMES, E.C.; RAMOS-CASTAÑEDA, J. Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. **Arch. Virol.** v. 155, p. 1401-1412, 2010.

CARRINGTON, C.V.F.; FOSTER, J.E.; PYBUS, O.G.; BENNETT, S.N.; HOLMES, E.C. Invasion and maintenance of Dengue virus type 2 and 4 in the Americas. **Journal of Virology**, v. 79, n. 3, p. 14680-14687, 2005.

CASALI, C.G.; PEREIRA, M.R.R; SANTOS, L.M.J.; PASSOS, M.N.P.; FORTES, B.P.M. VALENCIA, L.I.O.; ALEXANDRE, A.J.; MEDRONHO, R.A. A epidemia de Dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 37, n. 4, p. 296 – 299, 2004.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/>>. Acessado em: 28/10/2014.

CHAMBERS, T.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, and replication. **Annual Review of Microbiology**. v. 44, p. 649-688, 1990.

CHEN, Y.C.; HSIEN-NEG, H.; LIN, C.; CHEN, Y.; KING, C.; WU, H. Generation and characterization of monoclonal antibodies against dengue virus type 1 for epitope mapping and serological detection by epitope-based peptide antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 4, p. 404-411, 2007.

CHEN, Y. T.; MAGUIRE, T.; MARKS, R.M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **Journal of Virology**, v.70, p.8765-8772, 1996.

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

CHIARAVALLOTI-NETO, F. **Epidemiologia do dengue nas regiões de São José do Rio Preto e Araçatuba, São Paulo, 1990 a 1996**. São Paulo, 1996. [Tese]. Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 1996.

CHRISTENBURY, J.G.; AW, P.P.; ONG, S.H.; SCHEREIBER, M.J.; CHOW, A.; GUBLER, D.J.; VASUDEVAN, S.G.; OOI, E.E.; HIBBERD, M.L. A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus. **J. Virol. Methods**. v.169, p.202-6, 2010.

CLARKE, K.C.; MACLAFFERTY, S.L.; TEMPALSKI, B.J. On epidemiology and geographic information systems: a review and discussion of future directions. **Emerging Infectious Diseases**. v. 2, n. 2, p.85-92, 1996.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**. v. 8, n. 23, p. 11418-31, 2006.

COCKBURN, J.J.; NAVARRO SANCHES, M.E.; GONÇALVES, A.P.; ZAITSEVA, E.; STURA, E.A.; KIKUTI, C.M.; DUQUERROY, S.; DUSSART, P.; CHERNOMORDIK, L.V.; LAI, C.J.; REY, F.A. Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus. **EMBO J**. v. 31, n. 3, p. 767-79, 2012.

COLOMBO, T.E.; ARAKI, C.S.; SANTOS, I.N.P.; REIS, A.F.N.; COSTA, F.R.; CRUZ, L.E.A.A.; CASAGRANDE, L.; REGATIERI, L.J.; JUNIOR, J.F.; BRONZONI, R.V.M.; NOGUEIRA, M.L. Dengue-4 false negative results by Panbio® Dengue Early ELISA assay in Brazil. **J. Cli. Virol**. v.58, n. 4, p. 710-2. doi: 10.1016/j.jcv.2013.10.021., 2013.

COLOMBO, T.E.; VEDOVELLO, D.; MONDINI, A.; REIS, A.F.; CURY, A.A.F.; OLIVEIRA, F.H.; CRUZ, L.E.A.; BRONZONI, R.V.M.; NOGUEIRA, M.L. Co-infection of dengue virus by serotypes 1 and 4 in patient from medium sized from Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 55, n. 4, p. 275-285, 2013.

CONJUNTURA SOCIOECONÔMICA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, 2010. Disponível em: <<http://www.riopreto.sp.gov.br>>. Acessado em: 01/12/2013.

COSTA, M.A.R. **A ocorrência do *Aedes aegypti* na Região Noroeste do Paraná: um estudo sobre a epidemia de dengue em Paranavaí – 1999, na perspectiva da geografia médica**. [tese]. Faculdade de Ciência e Tecnologia – UNESP, Presidente Prudente, 2001.

COURAGEOT, M.P.; CATTEAU, A.; DESPRES, P. Mechanisms of dengue virus induced cell death. **Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity**, v. 60, p. 157-186, 2003.

CUI, T.; SUGRUE, R.J.; XU, Q.; LEE, A.K.; CHAN, Y.C.; FU, J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. **Virology**, v. 246, p. 409-417, 1998.

DE PAULA, S.O.; FONSECA, B.A.L. Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 390 - 398, 2004.

DE SIMONE, T.S.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, E.S.M.; GUIMARÃES, F.R.; SANTOS, F.B.; SCHATZMAYR, H.G.; SOUZA, R.V.; TEIXEIRA FILHO, G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 553-562, 2004.

DE THOISY, B.; DUSSART, P.; KAZANJI, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 98, p. 409-412, 2004.

DE THOISY, B.; LACOSTE, V.; GERMAIN, A.; MUNOZ-JORDAN, J.; COLON, C.; MAUFFREY, J.F.; DELAVAL, M.; CATZEFLIS, F.; KAZANJI, M.; MATHEUS, S.; DUSSART, P.; MORVAN, J.; SETIÉN, A.A.; DEPARIZ, X.; LAVERGNE, A. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v. 9, p. 157-170, 2009.

DEJNIRATTISAI, W.; JUMNAINSONG, A.; ONSIRISAKUL, N.; FITTON, P.; VASANAWATHANA, S.; LIMPITIKUL, W.; PUTTIKHUNT, C.; EDWARDS, C.; DUANGCHINDA, T.; SUPASA, S.; CHAWANSUNTATI, K.; MALASIT, P.; MONGKOLSAPAYA, J.; SREATON, G. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v. 238, p. 745 – 748, 2010.

DEUBEL, V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, p.335-365, 1997.

DIALLO, M.; BA, Y.; SALL, A.A.; DIOP, O.M.; NDIONE, J.A.; MONDO, M.; GIRAULT, L.; MATHIOT, C. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999–2000: Entomologic findings and epidemiologic considerations. **Emerg. Infect. Dis.** v. 9, p. 362–367, 2003.

DIBO, M.R.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; BATTIGAGLIA, M.; MONDINI, A.; FAVARO, E.A.; BARBOSA, A.A.C.; GLASSER, C.M. Identification of the best ovitrap installation sites for gravid *Aedes (Stegomyia) aegypti* in residences in Mirassol, state of Sao Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 100, n. 4, p. 339-343, 2005.

dos SANTOS, F.B.; NOGUEIRA, F.B.; CASTRO, M.G.; NUNES, P.C.; DE PILIPPIS, A.M.; FARIA, N.R.; SIMÕES, J.B.; SAMPAIO, S.A.; SANTOS, C.R.; NOGUEIRA, R.M. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Virol.** v. 8, p.387, 2011.

DRAKE, J.W.; HOLLAND, J.J. Mutation rates among RNA viruses. **PNAS**. v. 96, n. 24, p. 13910–13913, 1999.

DRUMOND, B.P.; MONDINI, A.; SCHMIDT, D.J.; BOSCH, I.; NOGUEIRA, M.L. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. **Arch. Virol.** Published on line: 10 July 2012.

DUONG, V.; SIMMONS, C.; GAVOTTE, L.; VIARI, A.; ONG, S.; CHANTHA, N.; LENNON, N.J.; BIRREN, B.W.; VONG, S.; FARRAR, J.J.; HENN, M.R.; DEUBEL, V.; FRUTOS, R.; BUCHY, P. Genetic diversity and lineage dynamic of dengue virus serotype 1 (DENV-1) in Cambodia. **Infect Genet Evol.** v. 15, p. 59-68, 2013.

DUSSART, P.; PETIT, L.; LABEAU, B.; BREMAND, L.; LEDUC, A.; MOUAU, D.; MATHEUS, S.; BARIL, L. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 2, p. 1-9, 2008.

ERBEL, P.; SCHIERING, N.; D'ARCY, A.; RENATUS, M.; KROEMER, M.; LIM, S.P.; YIN, Z.; KELLER, T.H.; VASUDEVAN, S.G.; HOMMEL, U. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. **Nat. Struct. Mol. Biol.** v. 13, n. 4, p. 372-373, 2006.

ESWAR, N.; MARTI-RENO, M.A.; WEBB, B.; MADHUSUDHAN, M.S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.; PIEPER U.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15**, 5.6.1-5.6.30, 2006.

FIGUEIREDO, L.T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 40, p. 224-9, 2007.

FIGUEIREDO, L.T. The use of *Aedes albopictus* C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae families. **Rev. Bras. Med. Trop.** v. 23, n. 1, p. 13-18, 1990.

FIGUEIREDO, M.L.G.; GOMES, A.C.; AMARILLA, A.A.; LEANDRO, A.S.; ORRICO, A.S.; ARAUJO, R.F.; CASTRO, J.S.M.; DURIGON, E.L.; AQUINO, V.H. Mosquitoes infected with dengue viroses in Brazil. **Virology Journal**, v. 7, p. 152, 2010.

FIGUEIREDO, R.; NAVECA F.; BASTOS, M.; MELO, M.; VIANA, S.; MOURÃO, M.; COSTA, C.; FARIAS, I. Dengue virus type 4, Manaus. Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** v. 14, p. 667–669, 2008.

FIGUEIREDO, R.M.P.; NAVECA, F.G.; OLIVEIRA, C.M.; BASTOS, M.S.; MOURÃO, M.P.G.; VIANA, S.S.; MELO, M.N.; ITAPIREMA, E.F.; SAATKAMP, C.J.; FARIAS, I.P. Co-infection of dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 53, n. 6, p. 321-323, 2011.

FONSECA, B.F. Febre Amarela. In: (Ed.). **VERONESI: Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2002.

FONSECA, B.A.L.; FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue. In: (Ed.). **VERONESI: Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 251-257, 2005.

FORSHEY, B.M.; MORRISON, A.C.; CRUZ, C.; ROCHA, C.; VILCARROMERO, S.; GUEVARA, C.; CAMACHO, D.E.; ALAVA, A.; MADRID, C.; BEINGOLEA, L.; SUAREZ, V.; COMACH, G.; KOCHER, T.J. Dengue virus serotype 4, northeastern Peru, 2008. **Emerg. Infect. Dis.** v. 15, p. 1815-1818, 2009.

FOSTER, J., BENNETT, S. N., VAUGHAN, H., VORNDAM, V., MCMILLAN, W. O., CARRINGTON, C. V. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. **Virology**. v. 306, n. 1, p. 126-134, 2003.

FRANÇA, E.L.; FERRARI, C.K.B.; MUNDO, A.D.P.; HONORIO-FRANÇA, A.C. Aspectos epidemiológicos da dengue em Jaciara, Mato Grosso. **Rev. Ciênc. Méd.** v. 20, n. 5-6, p. 121-126, 2011.

FULOP, L.; BARRETT, A.D.T.; PHILLPOTTS, R.; MARTIN, K.; LESLIE, D.; TITBALL, R.W. Titball. Rapid identification of flaviviruses based conserved NS5 gene sequences. **J. Virol. Methods**, v. 44, p. 179-188, 1993.

GARDELLA-GARCIA, C. E., PEREZ-RAMIREZ, G., NAVARRETE-ESPINOSA, J., CISNEROS, A., JIMENEZ-ROJAS, F., RAMÍREZ-PALACIOS, L. R., ROSADO-LEON, R.; CAMACHO-NUEZ, M.; MUNOZ, M.L. Specific genetic markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico. **BMC Microbiology**. v. 8, p. 117, 2008.

GOMEZ-DANTES, H.; RAMOS-BONIFAZ, B.; TAPIA-CONYER, M.C. El riesgo de transmisión del dengue: un espacio para la estratificación. **Salud Publica Mex.** v.37, p. 88-97, 1995.

GONÇALVES NETO, V.S.; REBÊLO, J.M.M. Aspectos epidemiológicos do dengue no município de São Luís, Maranhão, Brasil, 1997-2002. **Cad. Saúde Pública**. v. 20, n. 5, p. 1424-31, 2004.

GUBLER, D.J.; REED, D.; ROSEN, L.; HITCHCOCK, J.R.; Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.27, p. 581 – 589, 1978.

GUBLER, D.J.; SUHARYONO, W.; LUBIS, I.; ERAM, S.; GUNARSO, S. Epidemic dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 30, p. 1094 – 1099, 1981.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue Hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.** v. 33, p. 330-342, 2002.

GUBLER, D.J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flavivirus In: **Fields Virology**. KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds), Philadelphia, USA, Wolters Kluwer Health, p. 1153- 1252, 2007.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Disease**. v. 8, p. 69-80, 2004.

GUZMAN, M.G.; HALSTEAD, S.B.; ARTSB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D.J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H.S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M.B.; PELEGRINO, J.L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R.W. Dengue: a continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 8, p. S7 – 16, 2010.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98, 1999.

HALSTEAD, S.B. Dengue fever, viral hemorrhagic fevers and rabies. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 332-337, 1992.

HALSTEAD, S.B. Dengue hemorrhagic – Fever – a Public – Health Problem and a Field for Research. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 1, p. 1-21, 1980.

HALSTEAD, S.B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G., Editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York: CAB International, p. 23-44, 1997.

HANG, V.T.T.; HOLMES, E.C.; VEASNA, D.; QUY, N.T.Q.; HIEN, T.T.; MICHAEL, Q.; CHURCHER, C.; PARKHILL, J.; CARDOSA, J.; FARRAR, J.; WILLS, B.; LENNON, N.J.; BIRREN, B.W.; BUCHY, P.; HENN, M.R.; SIMMONS, C.P. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in Viet Nam: In vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 4, p. 1-11, 2010.

HANLEY, K.A.; LEE, J.J.; BLANEY, J.E.; MURPHY, B.R.; WHITEHEAD, S.S. Paired charge-to-alanine mutagenesis of dengue virus type 4 NS5 generates mutants with temperature-sensitive, host range, and mouse attenuation phenotypes. **J. Virol.** v. 76, p. 525-531, 2002.

HANLEY, K.A.; NELSON, J.T.; SCHIRTZINGER, E.E.; WHITEHEAD, S.S.; HANSON, C.T. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. **BMC Ecol.** v. 8, n. 1, 2008.

HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Adv. Virus Res.** v. 59, p. 63–97, 2003.

HEINZ, F.; ALISSON, S. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. **Adv. Virus. Res.** v. 55, p. 231-69, 2000.

HOLMES, E. C. RNA virus genomics: a world of possibilities. **The Journal of Clinical Investigations**, Ann Arbor, v.119, n.9, p. 2488-2495, 2009.

HOLMES, E. C. The evolutionary biology of dengue virus. **Wiley Novartis Foundation Symposium 277**, Chichester, p.177-192, 2006.

HOLMES, E.C.; BURCH, S.S. The Causes and Consequences of Genetic Variation in Dengue Virus. **Trends in Microbiology**. v. 8, p. 74–77, 2000.

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

HONÓRIO, N. A.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J.; GONÇALVES, J.M.; LOUNIBOS, L.P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 98, n. 2, p. 191-198, 2003.

HOWE, G.M. **A World geography of human diseases**. London: New York: Academic Press, p. 621, 1977.

HUHTAMO, E.; HASU, E.; UZCÁTEGU, N.Y.; ERRA, E.; NIKKARI, S.; KANTELE, A.; VAPALAHTI, O.; PIIPARINEN, H. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. **J. Clin. Virology**. v. 47, p. 49-53, 2010.

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2012. Disponível em: ><http://www.ictvonline.org>< Acessado em: 15/10/2013.

ITO, M.; TAKASAKI, T.; KOTAKI, A.; TAJIMA, S.; YUWONO, D.; RIMAL, H. S.; DOS SANTOS, F.; DE JESUS, M. D.; LINA, B. B.; TSUDA, Y.; LIM, C. K.; NEROME, R.; CALERÉS, A.; SHINDO, N.; DRAGER, R. D.; JAPARIDZE, A.; KURANE, I. Molecular and virological analyses of dengue virus responsible for dengue outbreak in East Timor in 2005. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p.181-184, 2010.

KANAKARATNE, N.; WAHALA, M.P.B.; MESSER, W.B.; TISSERA, H.A.; SHAHANI, A.; ABEYSINGHE, N.; SILVA, A.M.; GUNASEKERA, M. Severe dengue epidemics in Sri Lanka, 2003-2006. **Emerg. Infect. Dis.** v. 15, p. 192-9, 2009.

KANESA-THASAN, N.; IACONO-CONNORS, L.; MAGILL, A.; SMOAK, B.; VAUGHN, D.; DUBOIS, D.; BURROUS, J.; HOKE, C. Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia. **Lancet**. v. 343, n. 8898, p. 678-682, 1994.

KAO, C.K.; CHAO, D.; WU, H.; CHANG, G. Laboratory diagnostic dengue virus infection: current and future perspective in clinical diagnosis and public health. **J. Microbiol. Immunol. Infect.** v. 38, n. 1, p. 5-16, 2005.

KHROMYKH, A.A.; KENNEY, M.T.; WESTAWAY, E.G. trans-Complementation of flavivirus RNA polymerase gene NS5 by using Kunjin virus replicon-expressing BHK cells. **J. Virol.** v. 72, p. 7270-7279, 1998.

KINOSHITA, H.; MATHENGEL, E.G.M.; HUNG, N.T.; HUONG, V.T.Q.; KUMATORI, A.; YU, F.; PARQUET, M.D.C.; INOUE, S.; MATIAS, R.R.; NATIVIDADE, F.F.; MORITA, K.; HASEBE, F. Isolation and characterization of two phenotypically distinct dengue type-2 virus isolates from the same dengue hemorrhagic Fever patient. **Jpn. J. Infect. Dis.** v. 62, p. 343-50, 2009.

KNIFE, D.M.H.; PETER, M. Flaviviridae. **In: Fields Virology**. 5th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KOSASIH, H.; ALISJAHBANA, B.; WODJAJA, S.; NURHAYATI; MAST, Q.; PARWATI, I.; BLAIR, P.J.; BURGESS, T.H.; VEN, A.V.D.; WILLIAMS, M. The Diagnostic and Prognostic Value of Dengue Non-Structural 1 Antigen Detection in a Hyper-Endemic Region in Indonesia. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 8, p. 1-7, 2013.

KROSCHEWSKI, H.; SAGRIPANT, J.L.; DAVIDSON, A.D. Identification of amino acids in the dengue virus type 2 envelope glycoprotein critical to virus infectivity. **J. Gen. Virol.** v. 90, p. 2457-61, 2009.

KUMMERER, B.M.; RICE, C.M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **J. Virol.** v. 76, n. 10, p. 4773-84, 2002.

KYLE, J.L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu Rev. Microbiol.** v. 62, n. 71-92, 2008.

LAI, C.J.; BRAY, M.; MEN, R.; CAHOUR, A.; CHEN, W.; KAWANO, H.; TADANO, M.; HIRAMATSU, K.; TOKIMATSU, I.; PLETNEV, A.; ARAKI, S.; SHAMEEM, G.; RINAUDO, M. Evaluation of molecular strategies to develop a live dengue vaccine. **Clin. Diagn. Virol.** v.10, p.173-9, 1998.

LAILLE, M.; DEUBEL, V.; SAINTE-MARIE, F.F. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction. **J. Med. Virol.** v. 34, n. 1, p. 51-54, 1991.

LAM, W.E.A. Rapid Multiplex Nested PCR for detection of respiratory viruses. *Journal of Respiratory Viruses*. **J. of Clin. Microbiol.** v. 45, n. 11, p. 3631-360, 2007.

LAMBRECHTS, L.; FANSIRI, T.; PONGSIRI, A.; THAISOMBOONSUK, B.; KLUNGTHONG, C.; RICHARDSON, J.H.; PONLAWAT, A.; JARMAN, R.G.; SCOTT, T.W. Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. **J. Virol.** v. 86, n. 3, p. 1853-1861, 2012.

LANCIOTTI, R.S., CALISHER, C.H., GUBLER, D.J., CHANG, G.J., Vance-Vorndam, A. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v. 30, p. 545-551, 1992.

LANCIOTTI, R.S.; GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **J. Gen. Virol.** v. 78, p. 2279-2284, 1997.

LAVIGNE, R.; SUN, W.D.; VOLCKAERT, G. STORM towards protein function: systematic tailored ORF-data retrieval and management. **Appl. Bioinformatics**, v. 2, n. 3, p. 177-179, 2003.

LEE, K.S.; LAI, Y.L.; LO, S.; BARKHAM, T.; AW, P.; OOI, P.L.; TAI, J.C.; HIBBERD, M.; JOHANSSON, P.; KHOO, S.P.; NG, L.C. Dengue Virus Surveillance for Early Warning, Singapore. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 77–85, 2012.

LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.M.; SALAS, R.; CHACON, I.R.; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

LIBRATY, D.H.; ACOSTA, L.P.; TALLO, V.; SEGUBRE-MERCADO, E.; BAUTISTA, A.; POTTS, J.A.; JARMAN, R.G.; YOON, I.; GIBBONS, R.V.; BRION, J.D.; CAPEDING, R.Z. A Prospective Nested Case-Control Study of Dengue in Infants: Rethinking and Refining the Antibody-Dependent Enhancement Dengue Hemorrhagic Fever Model. **PLoS Negl Trop Dis**. v.6, n. 10, p. 1-11, 2009.

LIM, S.P.; KOH, J.H.K.; SHE, C.C.; LIEW, C.W.; DAVIDSON, A.D.; CHUA, L.S.; CHANDRASEKARAN, R.; CORNVIK, T.C.; SHI, P.; LESCAR, J. A Crystal Structure of the Dengue Virus Non-Structural Protein 5 (NS50 Polymerase Delineates Interdomain Amino Acid Residues That Enhance its Thermostability and *de Novo* Initiation Activities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 43, p. 31105-31114, 2013.

LIMA, F.R.; CRODA, M.G.; MUNIZ, D.A.; GOMES, I.T.; SOARES, K.R.M.; CARDOSO, M.R.; TAURO, R.L.A.M.; CRODA, J. Evaluation of the traditional and revised world health organization classifications of dengue cases in Brazil. **Clinics**. v. 68, n. 10, p. 1299-1304, 2013.

LIMA, E.P.; GOULART, M.O.F.; ALBUQUERQUE, M.R.; VICTOR, F.M.; PINTO, N.B. Time Series Analysis of Incidence of Dengue and *Aedes Aegypti* in Ceará. **Rev. Bras. Promoc. Saude**, v. 26, n. 3, p. 336-343, 2013.

LIMA, M.R.Q.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; SANTOS, F.B. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. v.4, n. 7, e738, 2010.

LIMA-CAMARA, T.N.; HONÓRIO, N.A.; OLIVEIRA LOURENÇO, R. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio De Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**. v. 22, p. 2079-2084, 2006.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **J. Virol.** v. 73, n. 6, p. 4611-21, 1999.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J.; RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE D.M., HOWLEY P.M., GRIFFIN D.E.; LAMB R.A. **Fields Virology**. 5th Edition, vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. USA, 2007.

LU, G.; GONG, P. Crystal Structure of the Full-Length Japanese Encephalitis Virus NS5 Reveals a Conserved Methyltransferase-Polymerase Interface. **PLoS Negl Trop Dis**. v.9, n. 8, p. 1-10, 2013.

LUO, D.; XU, T.; HUNKE, C.; GRUBER, G.; VASUDEVAN, S.G.; LESCAR, J. Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 1, p. 173-183, 2008.

LUPI, O.; CARNEIRO, C.G.; COELHO, I.C.B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **An. Bras. Dermatol.** v. 82, n. 4, p. 291-305, 2007.

MACKENZIE, J.M.; WESTAWAY, E.G. Assembly and maturation of the Flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, p. 10787-10799, 2011.

MALAVASI, H.G.; CORDEIRO, M.R.D. **Análise espacial da epidemia de dengue em Campinas/SP no ano de 2007**. [tese]. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2011.

MARTINS, V.C.A.; BASTOS, M.S.; RAMASAWMY, R.; FIGUEREDO, R.P.; GIMAQUE, J.B.L.; BRAGA, W.S.M.; NOGUEIRA, M.L.; NOZAWA, S.; NAVECA, F.G.; FIGUEIREDO, L.T.M.; MOURÃO, M.P.G. Clinical and Virological Descriptive Study in the 2011 Outbreak of Dengue in the Amazonas, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** v.9, n. 6, p. 390, 2014.

MASRINOUL, P.; DIATA, M.O.; PAMBUDI, S.; LIMKITTIKUL, K.; IKUTA, K.; KUROSU, T. Highly conserved region 141168 of the NS1 protein is a new common epitope region of dengue virus. **Jpn. J. Infect. Dis.** v. 64, n. 2, p. 109-115, 2011.

MATUSAN, A.E.; PRYOR, M.J.; DAVIDSON, A.D.; WRIGHT, P.J. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. **J. Virol.** v. 75, p. 9633-9643, 2001.

McBRIDE, W.J.H. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 64, p. 31-6, 2009.

MEDRONHO, R.A. Dengue e o ambiente urbano. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, p. 159-161, 2006.

MELO, P.R.S.; DOMINGO, C.; SANTOS, S.C.; CERQUEIRA, B.A.; ANDRADE, L.J.; NUNES, J.B.; CIUFFO, I.A.; TENÓRIO, A.; BLANTON, R.E.; REIS, M.G. Molecular surveillance of dengue virus in Bahia State, Brazil. **American Journal of Molecular Biology**, v. 2, p. 42-48, 2012.

MELO, F.L.; ROMANO, C.M.; ZANOTTO, P.M.A. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? **PLoS Negl Trop Dis.** v.3, n. 4, p. 390, 2009.

MESSER WB, GUBLERT D.J.; HARRIS E.; SIVANANTHAN, K.; SILVA, A.M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerg. Infect. Dis.** v. 9, p. 800-9, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue**.

Brasília: Ministério da Saúde; 2009. Disponível em: <<http://www.combateadengue.pr.gov.br>>. Acessado em 17/05/2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica de 11/08/10: isolamento do sorotipo DENV-4 em Roraima/Brasil; Brasília: Ministério da Saúde; 2010.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_roraima_11_08_versao3.pdf>. Acessado em 17/05/2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde MS/SVS. Balanço Dengue. **Informe Técnico 2011; 1:1–12.** Available at URL: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525>. Acessado em 17/05/2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **LIRAA Jan/Fev 2014.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/18/LIRAA-Jan---18.03.2014.pdf>>. Acessado em 25/10/2014.

MIR, D.; ROMERO, H.; CARVALHO, L.M.F.; BELLO, G. Spatiotemporal Dynamics of DENV-2 Asian-American Genotype Lineages in the Americas. **Plos. Negl. Trop. Dis.** v. 9, n. 6, p. 1-11, 2014.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** v. 100, n. 12, p. 6986–6991, 2003.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature.** v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **J. Virol.** v. 79, n. 2, p. 1223–1231, 2005.

MONATH, T.P. Yellow fever: an update. **Lancet Infect Dis.** v. 1, n. 1, p. 11-20, 2001.

MONDINI, A.; BRONZONI, R.V.M.; NUNES, S.H.P.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; MASSAD, E.; ALONSO, W.J. LÁZZARO, E.S.; FERRAZ, A.A.F.; ZANOTTO, P.M.A.; NOGUEIRA, M.L. Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban Dengue 3 outbreak in São Paulo, Brazil. **Plos. Negl. Trop. Dis.** v. 3, n. 5, p. 448, 2009.

MONDINI, A.; CARDEAL, I.L.; LÁZZARO, E.; NUNES, S.H.; MOREIRA, C.C.; RAHAL, P.; MAIA, I.; FRANCO, C.; GÔNGORA-FILHO, F.; CABRERA, E.M.; FIGUEIREDO, L.T.M.; FONSECA, F.G.; BRONZONI, R.V.M.; CHIARAVALLOTI-NAYAK, V.; DESSAU, M.; KUCERA, K.; ANTHONY, K.; LEDIZET, M.; MODIS, Y. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. **J. Virol.** v. 83, n. 9, p. 4338-4344, 2009.

MONDINI, A.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Spatial correlation of incidence of dengue with socioeconomic, demographic and environmental variables in a Brazilian city. **Science of The Total Environment**, v. 393, p. 241-248, 2008.

MONDINI, A.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Variáveis socioeconômicas e a transmissão de dengue. **Rev. Saúde Pública**, v.41, n.6, p. 1-7, 2007.

MONDINI, A.; CHIARAVALLOTI NETO, F.; SANCHES, M. G. Y.; LOPES, J. C. C. Análise espacial da transmissão de dengue em cidade de porte médio do interior paulista. **Revista de Saúde Pública**. v. 39, n. 3, p. 444-451, 2005.

MONTENEGRO, D.; LACERDA, H.R.; LIRA, T.M.; OLIVEIRA, D.S.C.; LIMA, A.A.F.; GUIMARÃES, M.J.B.; VASCONCELOS, P.G. Aspectos clínicos e epidemiológicos da epidemia de dengue no Recife, PE, em 2002. **Rev. Soc. Bras. de Med. Tropical**. v. 39, p. 9-13, 2006.

MORAIS, A.T.S.; TERZIAN, A.C.B.; DUARTE, D.V.B.; BRONZONI, R.V.M.; MADRID, M.C.F.S.; GAVIOLI, A.F.; LAURA, H.V.G.; OLIVEIRA, A.G.; ZANELLI, C.F.; VALENTINI, S.R.; RAHAL, P.; NOGUEIRA, M.L. The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with Flavivirus NS5 and may modulate yellow fever virus replication. **Virology Journal**, v. 10:205, 2013.

MORELAND, N.J.; TAY, M.Y.F.; LIM, E.; PARADKAR, P.N.; DOAN, D.N.P.; YAU, Y.H.; SCHOCHAT, S.G.; VASUDEVAN, S.G. High affinity human antibody fragments to dengue virus non-structural protein 3. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 11, e. 881, 2010.

MOSIMANN, A.L.; BORDIGNON, J.; MAZZAROTTO, G.C.A.; MOTT, M.C.M.; HOFFMANN, F.; DUARTE, C.N.D. Genetic and biological characterization of a densovirus isolate that affects dengue virus infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.106, n.3, p. 285-292, 2011.

MOURA, A.S.; ROCHA, R.L. **Endemias e epidemias: dengue, leishmaniose, febre amarela, inuenza, febre maculosa e leptospirose**. Belo Horizonte, Nescon UFMG, 2012. Disponível em: <<https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/3285.pdf>>,. Acessado em: 20/10/2014.

NAYAK, V.; DESSAU, M.; KUCERA, K.; ANTONY, K.; LEDIZET, M.; MODIS, Y. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. **J. Virol.** v. 83, n. 9, p. 4338–4344, 2009.

NATHASON, N. Epidemiolgy. In: D.M.H. Knipe, P.M. (Ed.) **Fields Virology**. v. 1, p. 424-446, 2007.

NAVECA, F.G.; SOUZA, V.C.; SILVA, G.A.V.; MAITO, R.M.; GRANJA, F.; SIQUEIRA, T.; ACOSTA, P.O.A. Complete Genome Sequence of a Dengue Virus Serotype 4 Strain Isolated in Roraima, Brazil. **Journal of Virology**. v. 86, n. 3, p. 1897-1898, 2012.

NOBUCHI, H. Os sintomas de uma doença similar ao dengue registrados em uma enciclopédia médica Chinesa (original em Japonês). **Kanpo Rinsho**, v. 26, p. 422-425, 1979.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FILIPPIS, A.M.B.; PEREIRA, M.A.S.; SCHATZMAYER, H.G. Dengue viruses type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E. & SCHATZMAYR, H. G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 253, 1990.

NUNES, M.R.T.; FARIA, N.R.; VASCONCELOS, H.B.; MEDEIROS, D.B.A.; LIMA, C.P.S.; CARVALHO, V.L.; SILVA, E.V.P.; CARDOSO, J.F.; SOUZA Jr., E.C.; NUNES, K.N.B.; RODRIGUES, S.G.; ABECASIS, A.B.; SUCHARD, M.A.; LEMEY, P.; VASCONCELOS, P.F.C. Phylogenography of Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010-2011. **Emerg. Infect. Dis.** v. 18, n. 11, p. 1858-1864, 2012.

OLIVEIRA, A.S.; QUINTANA, V.H.A. **Clonagem e expressão das proteínas recombinants NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3**. [tese]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. Capítulo 1, 2 ed., 1997.

OSANAI, C.H.; ROSA, A.O.; TANG, A.T. AMARAL, R.S.; PASSOS, A.D.; TAUIL, P.L. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 25, n. 1, p. 53-4, 1983.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Novos dados da Dengue no Brasil**, 2013. Disponível em: >[http:// www.paho.org](http://www.paho.org)< Acessado em 07/08/2013.

PASSOS, M.N.P; SANTOS, L.M.J.G.; PEREIRA, M.R.R.; CASALI, C.G.; FORTES, B.P.M.D.; VALENCIA, L.I.O.; ALEXANDRE, A.J.; MEDRONHO, R.A. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorridos no município do Rio de Janeiro. **Ver. Soc. Bras. Med. Tropical.** v. 37, n. 4, p. 293-295, 2004.

PASTORINO, B.; NOUGAIREDE, A.; WURTZ, N.; GOULD, E.; LAMBALLERIE, X. Role of host factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Research, Amsterdam**, v. 87, p.281-294, 2010.

PEELING, R.W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J.L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M.J.; DEVI, S.; SHAMALA, D.; ENRIA, D.A.; FARRAR, J.; GUBLER, D.J.; GUZMAN, M.G.; HALSTEAD, S.B.; HUNSPERGER, E.; KLIKS, S.; MARGOLIS, H.S.; NATHANSON, C.M.; NGUYEN, V.C.; SUSANA, N.R.; VÁZQUEZ, S.; YOKSAN, S. Evaluation of diagnosis tests: dengue. **Nat. Rev. Microbiol.**, S30-8, 2010.

PESSANHA, J.E.M.; CAIAFFA, W.T.; KROON, E.G.; PROIETTI, F.A. Dengue em três distritos sanitários de Belo Horizonte, Brazil: inquérito soropidemiológico de base populacional, 2006 a 2007. **Rev. Panam. Salud Publica.** v. 27, n. 4, 2010.

PETERS, C.J. Emerging Viral Diseases. In: D.M. Knipe e P.M. Howley (Ed.) **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins. v. 1, p. 605-625, 2007.

PEYREFITTE, C.N.; PASTORINO, B.A.M.; BESSAUDE, M.; GRAVIER, P.; TOCK, F.; COUISSINIER-PARIS, P.; MARTIAL, J.; HUC-ANAIS, P.; CESAIRE, R.; GRANDADAM,

M.; TOLOU, H.J. Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003-2004. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 5, p. 757-761, 2005.

PIERSON, T.C. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Laboratory of viral diseases: program description, 2012. Disponível em: < <http://www.niaid.nih.gov> >, Acessado em 18/04/2013.

PROTEIN DATA BANK (PDB). Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/> Acessado em: 10/09/2014.

RAMIREZ, A.H.; MOROS, Z.; COMACH, G.; ZAMBRANO, J.; BRAVO, L.; PINTO, B.; VIELMA, S.; CARDIER, J.; LIPRANDI, F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 65, p. 247-53, 2009.

RAWLINSON, S.M.; PRYOR, M.J.; WRIGHT, P.J.; JANS, D.A. Dengue virus RNA polymerase NS5: a potential therapeutic target? **Current Drug Targets**, v. 7, p. 1623-1638, 2006.

REBÊLO, J.M.M.; COSTA, J.M.L.; SILVA, F.S.; PEREIRA, Y.N.O.; SILVA, J.M. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, vol.15, n.3, p. 477 – 486, 1999.

REGIS LN, ACIOLI RV, SILVEIRA-JR. JC, DE MELO-SANTOS MAV, DA CUNHA MCS, SOUZA F, BATISTA CAV, BARBOSA RMR, DE OLIVEIRA CMF, AYRES CFJ, MONTEIRO AMV, SOUZA WV. Characterization of the spatial and temporal dynamics of the dengue vector population established in urban areas of Fernando de Noronha, a Brazilian oceanic island. **Acta Tropica**, v. 137, p. 80–87, 2014.

RIBEIRO, A. F.; MARQUES, G. R. A. M.; VOLTOLINI, J. C. & CONDINO, M. L. F. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública**. v. 40, n. 4, p. 671-676, 2006.

RIBEIRO, P.C.; SOUSA, D.C.; ARAÚJO, T.M.E. Perfil clínico-epidemiológico dos casos suspeitos de dengue em um bairro da zona sul de Teresina, PI, Brasil. **Rev. Bras. Enferm.** v.61, n. 2, p. 227 - 232, 2008.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.M.; SALAS, R.A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; DE MESA, M.T.; NOGUEIRA, R.M.; DA ROSA, A.T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Viology*, v. 230, p. 244 – 251, 1997.

RIGAU-PÉREZ, J.G.; AYALA-LÓPEZ, A.; GARCÍA-RIVERA, E.J.; HUDSON, S.M.; VORNDAM, V.; REITER, P.; CANO, M.P.; CLARK, G.G. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 67, p. 355-362, 2002.

ROCCO, I.M.; BARBOSA, M.L.; KANOMATA, E.H. Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 40, n. 3, p. 151–4, 1998.

ROCCO, M.I.; KAVAKAMA, B.B.; SANTOS, C.L.S. First isolation of Dengue 3 in Brazil from a imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v; 43, n. 1, p. 55 – 57, 2001.

ROCHA, L.A.; TAUIL, P.L. Dengue in children: clinical and epidemiological characteristics, Manaus, State of Amazonas, 2006 and 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 42, p. 18-22, 2009.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; CORDEIRO, M.T.; BRAGA, C.; SOUZA, W.V.; MARQUES, E.T.; CUMMINGS, D.A. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 11, e935, 2011.

ROEHRIG, J.T.; ROEHRIG, J.T.; VOLPE, K.E.; SQUIRES, J.; HUNT, A.R.; DAVIS, B.S.; CHANG, G.J. Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 78, n. 5, p. 2648-2652, 2004.

ROMANOS, M. T. V. Febre amarela e dengue. In: SANTOS, N. S. O.; Wigg, M. D. Introdução à Virologia Humana. **Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A.** v. 1, p. 399-409, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3 ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press.** New York, 2001.

SAMUEL, P.P.; TYAGI, B.K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian J. Med. Res.** v. 123, p. 615-628, 2006.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, C.L.; BASTOS, M.A.; SALLUM, M.A.A.; ROCCO, I.M. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 45, p. 11-6, 2003.

SEA, V.R.F.; CRUZ, A.C.R.; GURGEL, R.Q.; NUNES, B.T.D.; SILVA, E.V.P.; DOLABELLA, S.S.; SANTOS, R.L.C. Underreporting of Dengue-4 in Brazil Due to Low Sensitivity of the NS1 Ag Test in Routine Control Programs. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 8, n. 5: e64056. doi:10.1371/journal.pone.0064056, 2013.

SCHMIDT, D.J.; PICKETT, B.E.; CAMACHO, D.; COMACH, G.; XHAJA, K.; LENNON, N.J.; RIZZOLO, K.; BOSCH, N.; BECERRA, A.; NOGUEIRA, M.L.; MONDINI, A.; da SILVA, E.V.; VASCONCELOS, P.F.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; SANTIAGO, G.A.; OCAZONEZ, R.; GEHRKE, L.; LEFKOWITZ, E.J.; BIRREN, B.W.; HENN, M.R.; BOSCH, I. A phylogenetic analysis using full-length viral genomes of South American dengue serotype 3 in consecutive Venezuelan outbreaks reveals a novel NS5 mutation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 2011-2019, 2011.

SILVA, F.G.; SILVA, S.J.S.; ROCCO, I.M.; SILVEIRA, V.R.; SUZUKI, A.; KATZ, G.; BISORDI, I. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue – São Paulo. **BEPA, Bol. epidemiol. paul.**, v.8, n.91, p. 14-26, 2011.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>>. Acessado em: 10/10/2014.

SHU, P.Y.; YANG, C.F.; KAO, J.F.; SU, C.L.; CHANG, S.F.; LIN, C.C.; YANG, W.C.; SHIH, H.; YANG, S.Y.; WU, P.F.; WU, H.S.; HUANG, J.H. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 16, p. 589-91, 2009.

SIMMONS, C.P.; FARRAR, J.J.; NGUYEN, V.; WILLS, B. Dengue. **N. Engl. J. Med.** v. 366, n. 15, p. 1423-1432, 2012.

SOARES, R.O.S.; CALIRI, A. Stereochemical features of the envelope protein Domain III of dengue virus reveals putative antigenic site in the five-fold symmetry axis. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 221-230, 2013.

SOUZA, R.P.; ROCCO, I.M.; MAEDA, A.Y.; SPENASSATTO, C.; BISORDI, I.; SUZUKI, A.; SILVEIRA, V.R.; SILVA, S.J.S.; AZEVEDO, R.M.; TOLENTINO, F.M.; ASSIS, J.C.; BASSI, M.G.; DAMBRÓS, B.P.; TUMIOTO, G.L.; GREGIANINI, T.S.; SOUZA, L.T.M.S.; TIMENETSKY, M.C.S.T.; SANTOS, C.L.S. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** v. 5, n. 12, p. 1–7, 2011.

STORCH, G. Diagnostic Virology. In: D.M.H. Knipe, Peter, M. (Ed.). **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins. v. 1, p. 566-604, 2007.

STROTTMANN, D.M.; SANTOS, C.N.D. **Neuroadaptação de vírus dengue em modelo murino: identificação de marcadores moleculares.** [tese]. Universidade Federal do Paraná, 2008.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.; BARRETO, F.; BARRETO, M.L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.1, p. S7-S18, 2009.

TEMPORÃO, J.G, PENNA, G.O.; CARMO, E.H.; COELHO, G.E.; AZEVEDO, R.S.S.A.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases.** v. 17, n. 5, p. 938-40, 2011.

TORRES, E.M. **Dengue.** Rio de janeiro, Fiocruz, p. 344, 2005.

TWIDDY, S.S.; FARRAR, J.J.; VIHN, C.N.; WILLS, B.; GOULD, E.A.; GRITSUN, T.; LLOYD, G.; HOLMES, E.C. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. **Virology**, v. 298, p. 63–72, 2002.

ULLMANN, L.S.; ARAÚJO JUNIOR, J.P. **Pesquisa de genomas virais em primata não humanos no novo mundo por metagenômica.** [tese]. Universidade Estadual Paulista, 2014.

UNI PROT. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic acids Res.** v. 42, D191-D198, 2014.

VAN DER SCHAAR, H.M.; VAN DER SCHAAR, H.M.; RUST, M.J.; WAARTS, B.L.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; KUHN, R.J.; WILSCHUT, J.; ZHUANG, X.; SMIT, J.M. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. **Journal of Virology**, v. 81, n. 21, p. 12019-12028, 2007.

VASCONCELOS, P.F.C. Yellow Fever. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, p. 275-293, 2003.

VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS, DA ROSA, J.F.S. Arboviroses. **VERONESI: Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 289-302, 2005.

VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S. Arboviruses Pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém, Instituto Evandro Chagas, p.72-99, 1998.

VILLABONA-ARENAS, C.J.; ZANOTTO, P.M. Evolutionary history of dengue virus type 4: insights into genotype phylodynamics. **Infect. Genet. Evol.** v. 11, p. 878-885, 2011.

VILAR, D.C.L.F. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos do Dengue Hemorrágico no Ceará, no período de 1994 a 2006 [**Dissertação de Mestrado**]. Fortaleza: Fundação Oswaldo Cruz; 2008.

VOLK, D.E.; LEE, Y.C.; LI, X.; THIVIYANATHAN, V.; GROMOWSKI, G.D.; LI, .; LAMB, A.R.; BEASLEY, D.W.; BARRETT, A.D.; GORENSTEIN, D.G. Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus. **Virology**, v. 20, n. 1, p. 147-54, 2007.

VORDNAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, New York: CAB International, 1997.

ZANOTTO, P.M.A.; GOULD, E.A.; GAO, G.F.; HARVEY, P.H.; HOLMES, E.C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, n. 2, p. 548-553, 1996.

ZELLER, H.; MARRAMA, L.; SUDRE, B.; VAN BORTEL, W.; WARNS-PETIT, E. Mosquito-borne disease surveillance by the European Centre for Disease Prevention and Control. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. 693 – 698, 2013.

ZHANG, C.; MAMMEN, M.P.; CHINNAWIROTPISAN, P.; KLUNGTHONG, C.; RODPRADIT, P.; MONKONGDEE, P.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANAROOJ, S.; HOLMES, E.C. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. **J. Virol.**, v. 79, p.15123-30, 2005.

ZYBERT, I.A.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; WILSCHUT, J.; SMIT, J.M. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virion. **Journal of Genetical Virology**, v. 89, p. 3047-3051, 2008.

WAHALA W.M.; KRAUS, A.A.; HAYMORE, L.B.; ACCAVITTI-LOPER, M.A.; DE SILVA, A.M. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III reactive antibody. **Virology**, v. 392, p. 103-113, 2009.

WANG, W.; CHAO, D.Y.; LIN, S.R.; KING, C.C.; CHANG, S.C. Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.** v. 36, p. 89-95, 2003.

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A.; WATOWICH, S.; GUBLER, D. J., WEAVER, S.C. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of Virology**. v. 74, n. 7, p. 3227, 2000.

WATTS, D.M.; PORTER, K.R.; PUTVATANA, P.; VASQUEZ, B.; CALAMPA, C.; HAYES, C.G.; HALSTEAD, S.B. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. **Lancet**. v. 354, p. 1431-4, 1999.

WEAVER, S.; VASILASKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Journal of infection, genetics and evolution**, v. 9, n. 4, p. 523-540, 2009.

WENGLER, G.; WENGLER, G. Cell-associated wets Flavivirus is covered with E-Pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. **Journal of Virology**, v. 63, n. 6, p. 2521-2526, 1989.

WENNING, P.; MAN, Y.; BAOCHANG, F.; YONGQIANG, D.; TAO, J.; HONGYUAN, D.; EDE, Q. Simultaneous infection with dengue 2 and 3 viruses in a Chinese patient return from Sri Lanka. **J. Clin. Virol.** v. 32, p. 194-8, 2005.

WESTAWAY, E.G.; MACKENZIE, J.M.; KENNEY, M.T. Ultrastructure of Kunjin virus – infected cells: colonization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. **J. Virol.** v. 71, n. 9, p. 6650-6661, 1997.

WOROBAY, M.; RAMBAUT, A.; HOLMES, E.C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. v. 96, n.13, p. 7352-7, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **WHO**; 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. **WHO**; 1997.

WU, H.C.; HUANG, L. Identification of serotype-specific epitope of dengue virus by phage displayed random peptide library. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 268, 1999.

WU, X.; HONG, H.; YUE, J.; WU, Y.; LI, X.; JIANG, L.; LI, L.; LI, Q.; GAO, G.; YANG, X. Inhibitory effect of small interfering RNA on dengue virus replication in mosquito cells. **Virology Journal**. v. 7, p. 270, 2010.

Apêndices

8. APÊNDICES

8.1 APÊNDICE I

Journal of Clinical Virology 58 (2013) 710–712

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Short Communication

Dengue-4 false negative results by Panbio® Dengue Early ELISA assay in Brazil

Tatiana Elias Colombo^{a,b}, Danila Vedovello^a, Carlos Shigueru Araki^a, Hugo Cogo-Moreira^c, Izalco Nuremberg Penha dos Santos^d, Andréia Francesli Negri Reis^d, Fabiana Rodrigues Costa^d, Lilian Elisa Arão Antônio Cruz^d, Liane Casagrande^d, Livia José Regatieri^d, Jurandir Ferreira Junior^d, Roberta Vieira de Moraes Bronzoni^e, Diane J. Schmidt^f, Maurício Lacerda Nogueira^{a,*}

^a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil
^b Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita e Filho" (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil
^c Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brazil
^d Prefeitura de São José do Rio Preto, Departamento de Vigilância em Saúde, São José do Rio Preto, SP, Brazil
^e Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop, Mato Grosso, Brazil
^f Department of Infectious Disease and Global Health, Cummings School of Veterinary Medicine, Tufts University, North Grafton, MA, USA

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 16 August 2013
 Received in revised form 28 September 2013
 Accepted 18 October 2013

Keywords:
 Dengue
 NS1 Ag rapid assay
 False negative results

ABSTRACT

Background: Dengue is a serious public health problem in numerous countries. The ability to rapidly diagnosis dengue is important for patient triage and management. Detection of dengue viral protein, NS1, represents a new approach to dengue diagnosis.

Objective: The present study aims to evaluate if there are false negative results using the NS1 Ag rapid assay (Panbio® Dengue Early ELISA) in two different epidemiological situations (epidemic and non-epidemic).

Study design: 220 serum samples from patients with clinical symptoms of classical dengue fever were tested by NS1 antigen capture ELISA and Multiplex-Nested-PCR.

Results: In samples collected in a non-epidemic period we found a 100% agreement of ELISA and RT-PCR in dengue negative samples and 85% agreement of ELISA and RT-PCR in dengue positive samples. But when we tested samples during an epidemic period (large DENV-4 outbreak) we found 15% false negative results ($p < 0.05$) in dengue negative samples.

Conclusions: Due to false negative results for DENV-4, the sole use of the Panbio® Dengue Early ELISA assay as a screening method for monitoring circulating dengue serotypes must be reevaluated.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

8.2 APÊNDICE II

Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo
55(4):1-xxxx, July-August, 2013
doi: 10.1590/S0036-46652013000400079

CASE REPORT

CO-INFECTION OF DENGUE VIRUS BY SEROTYPES 1 AND 4 IN PATIENT FROM MEDIUM SIZED CITY FROM BRAZIL

Tatiana Elias COLOMBO^{1,2}, Danila VEDOVELLO¹, Adriano MONDINI³, Andrea Francieli Negri REIS⁴, Amena Alcântara Ferraz CURY⁴,
Frank Helder de OLIVEIRA⁴, Lilian Elina Ario Antonio CRUZ⁴, Roberta Vieira de Moraes BRONZONI¹ & Maurício Lacerda NOGUEIRA¹

SUMMARY

The natural co-infection with dengue virus can occur in highly endemic areas where different serotypes have been observed for many years. We report one case of DENV-1/DENV-4 co-infection in human serum detected by molecular tests. Phylogenetic analysis of the sequences obtained indicated the presence of genotype V and II for DENV-1 and DENV-4, respectively.

KEYWORDS: Brazil; Dengue; Co-infection; *Flavivirus*.

Anexos

9. ANEXOS

9.1 ANEXO I



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8898 de 27/09/94

Parecer n.º 48980

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa CAAE n.º 02078812.8.0000.5415 sob a responsabilidade de *Maurício Lacenda Nogueira*, com o título "Detecção de Flavivírus e Hantavírus em amostras de pacientes de São José do Rio Preto" está de acordo com a resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 03 de julho de 2012.


Prof. Dr. Fernando Batigália
Presidente do CEP/FAMERP

9.2 ANEXO II

Secretaria Municipal de Saúde do Município de: São José do Rio Preto – SP Solicitação Teste sorológico de detecção da proteína NS1 (DENGUE) OBS: Coleta somente para pacientes com sintomas entre 1º e 3º dias	
Nome da Unidade:	CNES:
Nome do paciente:	
Data dos 1º sintomas:	Coleta / / Hora:
Pront. Nº:	
CNS:	SINAN:
Data de Nascimento: / /	Vacina F. Amarela: () Sim () Não
Sexo: () M () F	Gestante: () Sim () Não
Endereço:	
Nº:	Bairro:
Município de Residência:	Estado:
_____ Assinatura e carimbo do profissional solicitante O EXAME SÓ SERÁ REALIZADO SE A SOLICITAÇÃO ESTIVER COMPLETAMENTE PREENCHIDA E LEGÍVEL	
Instituto Adolfo Lutz	Recebimento no IAL: / /
Rua: Alberto Sufredini Bertoni, 2325	Hora: _____ Funcionário: _____

9.3 ANEXO III

Sequências de DENV-1 e DENV-4 utilizadas para a análise filogenética, incluindo sorotipo e genótipo, origem, ano de isolamento e números de acesso ao *GenBank*.

Sorotipo e Genótipo	Número de acesso <i>GenBank</i>	Origem	Ano
Sorotipo 1			
Genótipo I	AB074760.1	Japão	2001
Genótipo I	AF180817.1	USA	1999
Genótipo I	JN054255.1	Sri Lanka	2010
Genótipo I	GQ398255.1	Singapura	2008
Genótipo I	DQ193572.1	Fujian/China	2004
Genótipo II	FJ196841.1	Guangzhou/China	2003
Genótipo II	FJ196842.1	Guangzhou/China	2003
Genótipo II	EF440432.1	Austrália	2000
Genótipo II	EF025110.1	China	2006
Genótipo III	AB074761.1	Japão	2002
Genótipo III	DQ285561.1	Seychelles/ França	2004
Genótipo IV	U88535.1	República de Nauru	1997
Genótipo IV	M23027.1	República de Nauru	1994
Genótipo V	FJ850087.1	Brasil	2006
Genótipo V	AF226685.2	Rio de Janeiro/Brasil	2000
Genótipo V	AF513110.1	Curitiba/Brasil	2002
Genótipo V	FJ850075.1	Brasil	2002
Genótipo V	FJ850090.1	Brasil	2007
Genótipo V	FJ850084.1	Brasil	2005
Genótipo V	JX502769.1	Brasil	2009
Genótipo V	FJ850070.1	Brasil	2000
Genótipo V	FJ850071.1	Brasil	2000
Genótipo V	AB519681.1	Brasília/Brasil	2002

Genótipo V	FJ850081.1	Brasil	2004
Genótipo V	HM043709.1	Brasil	2009
Genótipo V	JN086990.1	Brasil	2010
Genótipo V	JN086991.1	Brasil	2010

Sorotipo 4

Genótipo I	FJ196850.1	Guangzhou/China	1990
Genótipo I	AF289029.1	Guangzhou/China	2000
Genótipo I	AF177542.1	Mindanao/Filipinas	1995
Genótipo I	GQ868594.1	Filipinas	1956
Genótipo II	EU854295.1	Porto Rico	1986
Genótipo II	GQ868582.1	Santander/Colômbia	2001
Genótipo II	AH011968.1	Costa Rica	1996
Genótipo II	JN559741.2	Boa Vista/Brasil	2010
Genótipo II	JN983813.1	Boa Vista/Brasil	2010
Genótipo II	HQ822126.1	Roraima/Brasil	2010
Genótipo II	HQ822125.1	Roraima/Brasil	2010
Genótipo II	JN092557.1	Brasil	2011
Genótipo II	JN712226.1	SJRP/Brasil	2011
Genótipo II	JN712225.1	SJRP/Brasil	2011
Genótipo II	JQ513335.1	Belém/Brasil	2011
Genótipo II	JN092556.1	Brasil	2011
Genótipo II	JN092555.1	Brasil	2011
Genótipo II	JN092556.1	Brasil	2011
Genótipo II	JQ513333.1	Boa Vista/ Brasil	2010
Genótipo II	JQ513340.1	Boa Vista/ Brasil	2010
Genótipo II	AY152252.1	San Juan/ Porto Rico	1987
Genótipo II	AY152084.1	San Juan/ Porto Rico	1994

Genótipo II	AY152056.1	San Juan/ Porto Rico	1998
Genótipo II	AY152196.1	San Juan/ Porto Rico	1992
Genótipo II	AY152336.1	San Juan/ Porto Rico	1982
Genótipo II	AY152360.1	Dominica	1981
Genótipo III	HQ875339.1	Singapura	2008
Genótipo III	GQ398256.1	Singapura	2005
Genótipo III	AY618993.1	Bangkok /Tailândia	2000

9.4 ANEXO IV

DENV-4 de diferentes localidades selecionadas para análise filogenética (gene do envelope) das sequências geradas no presente estudo, provenientes do *GenBank*.

<i>Sequence name</i>	Nº acesso <i>GenBank</i>	Ano	Origem	Genótipo
<i>Dengue virus 4 isolate Br 246RR/10, complete genome</i>	JN983813	2010	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H779652, complete genome</i>	JQ513339.1	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H779228, complete genome</i>	JQ513338.1	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H780571, complete genome</i>	JQ513344.1	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H780563, complete genome</i>	JQ513343.1	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H774846, complete genome</i>	JQ513333	2010	Boa Vista - RR	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H775222, complete genome</i>	JQ513334	2010	Santarém - PA	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H778887, complete genome</i>	JQ513337	2011	Belém - PA	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H778504, complete genome</i>	JQ513336	2011	Belém - PA	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H780120, complete genome</i>	JQ513341	2010	Boa Vista - RR	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H772852, complete genome</i>	JQ513331	2010	Boa Vista - RR	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H773583, complete genome</i>	JQ513332.1	2010	Boa Vista - RR	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/CO/BID-V3412/2005, complete genome</i>	GQ868585	2005	Colômbia	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain SPH318527 envelope glycoprotein gene, partial cds</i>	JN848499	2011	São Paulo - SP	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain SPH319325 envelope glycoprotein gene, partial cds</i>	JN848498	2011	São Paulo - SP	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/VE/BID-V1153/2007, complete genome</i>	GQ868642	2007	Venezuela	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/VE/BID-V1156/2007, complete genome</i>	GQ868645	2007	Venezuela	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate 29056_2005 envelope glycoprotein gene, partial cds</i>	GQ139590	2005	Venezuela	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate 24082_2004 envelope glycoprotein gene, partial cds</i>	GQ139588	2004	Venezuela	Genótipo II
<i>Dengue virus type 4 Puerto Rico 1986 polyprotein gene, partial cds</i>	U18436	1986	Porto Rico	Genótipo II
<i>Dengue virus type 4 Tahiti 1979 polyprotein gene, partial cds</i>	U18438	1979	Tahiti	Genótipo II
<i>Dengue virus type 4 Brazil 1982 polyprotein gene, partial cds</i>	U18425	1982	Brasil	Genótipo II
<i>Dengue virus type 4 New Caledonia 1984 polyprotein gene, partial cds</i>	U18432	1984	Nova Caledônia	Genótipo II
<i>Dengue virus type 4 El Salvador 1983 polyprotein gene, partial cds</i>	U18426	1983	El Salvador	Genótipo II

<i>Dengue virus type 4 Mexico 1984 polyprotein gene, partial cds</i>	U18431	1984	México	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/US/BID_V860/994, complete genome</i>	FJ226067	1994	Porto Rico	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/VE/BID_V2172/1999, complete genome</i>	FJ639744	1999	Venezuela	Genótipo II
<i>Dengue virus type 4 Indonesia 1973 polyprotein gene, partial cds.</i>	U18428.1	1973	Indonésia	Genótipo II
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0017_97, complete genome</i>	AY618989	1997	Tailândia	Genótipo III
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0476_97, complete genome</i>	AY618988	2004	Tailândia	Genótipo III
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0087_77, complete genome</i>	AY618991	1977	Tailândia	Genótipo I
<i>Dengue virus 4 gene for polyprotein, partial cds, strain: H241</i>	AB609591.1	1956	Filipinas	Genótipo I
<i>Dengue virus type 4 isolate Thailand 1985 envelope protein gene, partial cds</i>	AY780644	1985	Tailândia	Genótipo I
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0348_91, complete genome</i>	AY618990	1991	Tailândia	Genótipo I
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0485_01, complete genome</i>	AY618992	2001	Tailândia	Genótipo I
<i>Dengue virus 4 strain D4/Vietnam/1009aTw envelope glycoprotein gene, partial cds</i>	JF967791	2010	Vietnam	Genótipo I

9.5 ANEXO V

DENV-4 de diferentes localidades selecionadas para análise filogenética (genoma completo) das sequências geradas no presente estudo, provenientes do *GenBank*.

<i>Sequence name</i>	Nº acesso <i>GenBank</i>	Ano	Origem	Genótipo
<i>Dengue virus 4 isolate Br 246RR/10, complete genome</i>	JN983813	2010	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H773583, complete genome</i>	JQ513332	2010	Boa Vista - RR	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H779652, complete genome</i>	JQ513339	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H780571, complete genome</i>	JQ513344	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H779228, complete genome</i>	JQ513338	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H780563, complete genome</i>	JQ513343	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 strain H780556, complete genome</i>	JQ513342	2011	Manaus - AM	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/VE/BID-V1155/2007, complete genome</i>	GQ868644	2007	Venezuela	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/CO/BID-V3412/2005, complete genome</i>	GQ868585	2005	Colômbia	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/VE/BID-V2172/1999, complete genome</i>	FJ639744	1999	Venezuela	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/VE/BID-V2501/2008, complete genome</i>	FJ882592	2008	Venezuela	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/US/BID-V2429/1994, complete genome</i>	GQ199878	1994	Porto Rico	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/US/BID-V860/1994, complete genome</i>	FJ226067	1994	Porto Rico	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/US/BID-V2431/1995, complete genome</i>	GQ199880	1995	Porto Rico	Genótipo II
<i>Dengue virus 4 isolate DENV-4/US/BID-V2430/1994, complete genome</i>	GQ199879	1994	Porto Rico	Genótipo II
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0087_77, complete genome</i>	AY618991	1977	Tailândia	Genótipo I
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0348_91, complete genome</i>	AY618990	1991	Tailândia	Genótipo I
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0485_01, complete genome</i>	AY618992	2001	Tailândia	Genótipo I
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0017_97, complete genome</i>	AY618989	1997	Tailândia	Genótipo III
<i>Dengue virus type 4 strain ThD4_0476_97, complete genome</i>	AY618988	2004	Tailândia	Genótipo III