

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE DOENÇAS INFECCIOSAS E TROPICAIS

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM PACIENTES
FEBRIS COM SUSPEITA DE DENGUE EM MATO GROSSO

LETÍCIA BORGES DA SILVA HEINEN

Cuiabá, MT, Brasil
2014

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM PACIENTES FEBRIS COM
SUSPEITA DE DENGUE EM MATO GROSSO**

MESTRANDA: LETÍCIA BORGES DA SILVA HEINEN
ORIENTADORA: RENATA DEZENGRINI SLHESSARENKO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Cuiabá, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de Doenças Infecciosas e Tropicais.

Cuiabá, MT, Brasil
2014

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

H468i Heinen, Letícia Borges da Silva.
Investigação molecular de flavivírus em pacientes febris com suspeita de dengue em Mato Grosso / Letícia Borges da Silva Heinen. – 2014
xiv, 83 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Renata Dezengrini Shessarenko.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Cuiabá, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Arbovírus. 2. Vírus dengue. 3. SLEV. 4. Vírus da encefalite de Saint Louis. 4. Mato Grosso. 5. RT-PCR. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Simone, meu porto seguro, pelo apoio e amor incondicional, por me ensinar que tudo é possível se tivermos determinação e acreditarmos em Deus. Ao meu pai, Luiz, exemplo de integridade e caráter, por me ensinar os valores da humildade e paciência. Não tenho palavras pra agradecer a vida maravilhosa e digna que me proporcionaram. A vocês dedico todo o meu amor, todo o meu saber e toda a minha vida. Sem vocês eu nada seria!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela realização desse sonho. Por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem e força para não desistir e proteção para me amparar.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Renata Dezengrini Shlessarenko, pela oportunidade, apoio e compreensão. Obrigado por ter acreditado em mim, pelo seu saber e competência e, por todos os ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, paciência e dedicação.

Aos meus irmãos, Cássio e Victor, pela tolerância, amor e por torcerem por mim. Ao irmão de coração, Ricardo, pela colaboração nos mapas, companheirismo e carinho. Vocês são anjos na minha vida. À Marianna pelo apoio mesmo à distância. Aos meus avós pelo carinho e exemplo, por me mostrarem o verdadeiro amor de família, vocês são especiais na minha vida. À toda minha família, primos, tios e afilhado pela alegria que me proporcionam quando estou ao lado de cada um. Por serem a família mais linda desse mundo. Amo vocês.

Às amigas de caminhada, Nayara, Otacília e Belgath, e aos queridos Fernanda e Breno. Vocês fizeram meus dias mais felizes. Obrigada pela parceria, apoio, por me ouvirem e ajudarem. Sem vocês esse sonho não teria sido o mesmo. Estarão sempre no meu coração.

À turma de mestrado do PPGCS, foi incrível compartilhar essa experiência com vocês. Em especial a amiga-irmã Thamires, meu porto-seguro, pela força e parceria incomparável.

À Regiane, nossa secretária e amiga, pelo carinho, força e conselhos. A todos os amigos que me fortaleceram e apoiaram de alguma forma. Um obrigado especial à Dani. Vocês são demais!

À bióloga Liliana, por todo o carinho e atenção direcionada a nós, e ao biólogo Fábio pelo auxílio nas análises dos dados da dissertação.

Ao prof. Dr. Cór Jésus Fontes, a prof. Dra. Rosane Hahn e aos demais professores do PPGCS pelo apoio e auxílio à realização desse estudo.

Ao MT-Laboratório, Prof. Marcelo A. M. Santos, Sumako K. Ueda, Ana Elisa Vininski e Prof. Dr. Francisco J. D. Souto pelas amostras biológicas fundamentais ao estudo.

À UFMT e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pela formação acadêmica e científica. Ao Laboratório de Virologia da FAMERP – São José do Rio Preto, à Fiocruz Amazônia e ao Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária/UFMT pela colaboração, fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro ao estudo.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM PACIENTES FEBRIS COM SUSPEITA DE DENGUE EM MATO GROSSO

Introdução: O gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, alberga arbovírus como os vírus dengue (DENV) e da febre amarela, que possuem importância médica e são envolvidos em epidemias de doença febril em áreas urbanas e rurais em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, atualmente, o DENV e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) são os dois flavivírus circulantes em áreas urbanas mais frequentes. Desde a introdução e emergência dos diferentes sorotipos de DENV a partir da década de 1980, extensas epidemias de febre do dengue vêm sendo relatadas por todo o país. O SLEV, anteriormente reconhecido apenas em ciclos enzoóticos e com pouca relevância médica no Brasil, tem sido implicado em casos de doença febril durante epidemia de dengue no sudeste do país. O objetivo deste estudo foi investigar a circulação de flavivírus em pacientes com doença febril aguda com suspeita de dengue em Mato Grosso (MT) em 2011 e 2012.

Material e Métodos: 604 amostras de soro obtidas entre outubro de 2011 e julho de 2012 de pacientes com doença febril aguda suspeita de dengue com até cinco dias do início dos sintomas em MT foram submetidas à multiplex semi-nested RT-PCR para a pesquisa de flavivírus, como os quatro sorotipos de DENV, SLEV, vírus da febre amarela, do Oeste do Nilo, Rocio, Bussuquara, Iguaçu e Ilhéus. Amostras positivas foram testadas pelo menos duas reações independentes de single-nested RT-PCR e submetidas a sequenciamento nucleotídico de região do gene da glicoproteína de envelope para análise filogenética.

Resultados: Dentre os 604 pacientes, 315 (52,2 %) foram positivos para DENV-4, 24 (4,0 %) para DENV-1, 3 (0,5 %) para SLEV, 1 (0,2 %) para DENV-2 e 1 (0,2 %) para DENV-3. Todas as amostras eram de pacientes oriundos de áreas urbanas de 17 municípios de MT. Entre as amostras positivas, 9 eram co-infecções entre DENV-1/DENV-4, 1 entre DENV-2/DENV-4, 2 por SLEV/DENV-4 e 1 entre SLEV/DENV-1/DENV-4. Os demais flavivírus pesquisados não foram detectados. Amostras negativas para flavivírus totalizaram 273/604 (45,20 %).

Discussão: A ocorrência das arboviroses na população geralmente é subestimada, devido a fatores como quadro clínico inespecífico, infecções inaparentes e ausência de diagnóstico diferencial. O DENV-4 foi introduzido no MT em 2012, responsável pela maior casuística nas cidades da Baixada Cuiabana. Co-infecções são frequentes quando há circulação hiperendêmica dos quatro sorotipos do DENV, situação já relatada no Brasil em Manaus e Rio de Janeiro em 2011. O SLEV foi detectado em pacientes de Cuiabá e Várzea Grande. Infecções por SLEV são primariamente inaparentes ou brandas. Em MT, espécies de *Culex* e outros vetores deste vírus são amplamente dispersas. Como humanos são hospedeiros finais e apresentam baixa viremia, sua ocorrência é provavelmente subestimada.

Conclusão: DENV-1 e DENV-4 foram os flavivírus identificados com maior frequência. Os quatro sorotipos do DENV foram detectados em Cuiabá e infecções esporádicas pelo SLEV foram identificadas em pacientes co-infectados com o DENV-4 ou o DENV-4/DENV-1 em Cuiabá e Várzea Grande, indicando que outros arbovírus podem circular silenciosamente durante epidemia de dengue em áreas urbanas em MT.

Palavras-chave: Arbovírus, vírus dengue, vírus da encefalite de Saint Louis, Mato Grosso, dengue, Saúde Pública, Investigação Epidemiológica, RT-PCR.

ABSTRACT

Master Thesis

MOLECULAR INVESTIGATION OF FLAVIVIRUSES IN FEBRILE PATIENTS SUSPECTED OF DENGUE IN MATO GROSSO

Introduction: The genus *Flavivirus*, *Flaviviridae* family, comprises arboviruses such as the medical important dengue virus (DENV) and yellow fever virus, involved in febrile illness epidemics in urban and rural areas of tropical and subtropical regions. In Brazil, DENV and Saint Louis encephalitis (SLEV) virus are currently the two most important flaviviruses circulating in urban areas. Since the introduction and emergence of different DENV serotypes in the 1980's, extensive dengue outbreaks have been reported throughout the country. SLEV, previously recognized only in enzootic cycles without medical relevance in Brazil, has been implicated to febrile illness etiology during dengue fever outbreaks in the Southeast region. The aim of this study was to investigate the circulation of flaviviruses in patients with acute febrile illness suspected of harboring dengue in Mato Grosso (MT) between 2011 and 2012.

Material and Methods: 604 serum samples obtained between October 2011 and July 2012 from patients with acute febrile illness suspected of dengue lasting less than 5 days in MT were subjected to multiplex semi-nested RT-PCR for flaviviruses, including all four serotypes of DENV, SLEV Yellow Fever, West Nile, Rocio, Bussuquara, Iguape and Ilheus viruses. Positive samples were tested at least twice in independent single-nested RT-PCR reactions and subjected to nucleotide sequencing of the envelope glycoprotein (E) gene region for phylogenetic analysis.

Results: Among 604 patients, 315 (52.2 %) were positive for DENV-4, 24 (4.0 %) for DENV-1, three (0.5 %) for SLEV, one (0.2 %) for DENV-2 and one (0.2 %) for DENV-3. All patients are residents in urban areas of 17 cities of MT. Among them, 9 were co-infections among DENV-1/DENV-4, 1 between DENV-2/DENV-4, two between SLEV/DENV-4 and one with SLEV/DENV-1/DENV-4. The other flaviviruses were not detected. Negative samples for flavivirus totaled 273/604 (45.20 %).

Discussion: The occurrence of arboviruses in the population generally is underestimated, probably due to unapparent infection or unspecific clinical presentation, associated to the absence of differential diagnosis. The DENV-4 serotype was introduced in MT in 2012, responsible for the largest number of cases in Cuiabá and Varzea Grande. Co-infections are common when hiperendemic circulation of all four serotypes of DENV is observed. This situation has already been reported in Brazil in Manaus and Rio de Janeiro cities in 2011. Three patients were positive for SLEV in Cuiaba and Várzea Grande. SLEV infections are primarily mild or unapparent. In MT, species of *Culex* and other vectors are widely dispersed. As humans are final hosts and, therefore, present low titer viremia, the occurrence of SLEV in the population is probably underestimated.

Conclusion: DENV-1 and DENV-4 were the most frequently flaviviruses identified. The four DENV serotypes were detected in Cuiaba and sporadic SLEV infections were identified in patients co-infected with DENV-4 or DENV-1/DENV-4 in Cuiaba and Várzea Grande, indicating that other arboviruses may circulate silently during dengue epidemics in urban areas of MT.

Keywords: Arboviruses, dengue virus, Saint Louis encephalitis virus, Mato Grosso, dengue, Public Health, Epidemiological Investigation, RT-PCR

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Flavivírus transmitidos por mosquitos que acometem humanos nas Américas.....	17
Tabela 2. Iniciadores utilizados para investigação molecular de arbovírus em pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em MT.....	38
Tabela 3. Características demográficas e epidemiológicas de pacientes com doença febril aguda com suspeita de dengue que demandaram os serviços de saúde em MT entre outubro de 2011 e julho de 2012.....	43
Tabela 4. Frequência de positividade para flavivírus em pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.....	48
Tabela 5. Características demográficas e epidemiológicas de pacientes com doença febril aguda positivos para os sorotipos do vírus da dengue 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.....	48
Tabela 6. Distribuição de pacientes com doença febril aguda positivos para os sorotipos do vírus da dengue 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) entre 2011 e 2012 em Mato Grosso segundo idade e etnia.....	49
Tabela 7. Distribuição de pacientes com doença febril aguda positivos para os sorotipos do vírus da dengue 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) entre 2011 e 2012 em Mato Grosso segundo município de residência.....	49
Tabela 8. Distribuição de pacientes com doença febril aguda positivos para os sorotipos do vírus da dengue 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) em relação à amostragem por município de residência entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.....	50
Tabela 9. Dados clínicos e epidemiológicos de pacientes com doença febril aguda com co-infecção entre os sorotipos do vírus da dengue (DENV) e/ou com o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.....	51
Tabela 10. Frequência dos principais sinais e sintomas clínicos entre pacientes com doença febril aguda negativos e positivos para o DENV entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.....	52
Tabela 11. Sequências de flavivírus incluídas na árvore filogenética da amostra de SLEV obtida de paciente com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de transmissão geral dos flavivírus, envolvendo vertebrados silvestres, mosquitos e ocasionalmente homem e/ou animais domésticos.....	16
Figura 2. Árvore filogenética de 15 cepas de 10 espécies de flavivírus transmitidos por mosquitos com base na sequência parcial do gene da proteína não-estrutural NS5, observando-se três complexos: febre amarela, dengue e encefalite japonesa.....	18
Figura 3. Morfologia das partículas virais dos membros da família <i>Flaviviridae</i>	19
Figura 4. Estrutura e organização genômica da fita simples de RNA de polaridade positiva dos <i>Flavivirus</i>	19
Figura 5. Ciclo replicativo dos <i>Flavivirus</i>	21
Figura 6. Patogenia da dengue: fatores virais e do hospedeiro contribuem para as manifestações clínicas, incluindo hemorragia grave, trombocitopenia, extravasamento de plasma e hepatomegalia.....	23
Figura 7. Ciclos de transmissão da febre amarela silvestre e urbana.....	25
Figura 8. Ciclos de transmissão do DENV.....	26
Figura 9. Ciclos de transmissão do WNV.....	26
Figura 10. Ciclo de transmissão do SLEV.....	27
Figura 11. Fluxograma das atividades da pesquisa de flavivírus em pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em MT.....	35
Figura 12. Distribuição dos pacientes com doença febril aguda suspeita de dengue de MT entre outubro de 2011 e julho de 2012 incluídos na pesquisa de arbovírus do gênero <i>Flavivirus</i>	44
Figura 13. Produtos de multiplex semi-nested PCR para região do gene NS5 do vírus da dengue (DENV) em pacientes com doença febril aguda em Mato Grosso.....	53
Figura 14. Produtos de multiplex semi-nested PCR para a região do gene NS5 do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) em pacientes com doença febril aguda em Mato Grosso....	54
Figura 15. Produtos de multiplex semi-nested PCR para a região do gene NS5 em pacientes com doença febril aguda co-infectados com os sorotipos do vírus da dengue (DENV) em Mato Grosso.....	55
Figura 16. Distribuição dos pacientes com doença febril aguda positivos para flavivírus por multiplex semi-nested RT-PCR que demandaram os serviços de saúde entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.....	56

Figura 17. Distribuição de pacientes amostrados e positivos para DENV em relação ao mês de coleta em Mato Grosso entre outubro de 2011 e julho de 2012.....	57
Figura 18. Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos amplicons do gene da proteína NS5 do soro de pacientes de Mato Grosso positivos para o DENV.....	60
Figura 19. Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos amplicons parciais dos genes NS5 e da glicoproteína E obtidas de pacientes positivos para o SLEV com as estirpes BeAn 246262 e BeAn259507, respectivamente.....	61
Figura 20. Produtos de Semi-nested RT-PCR para o gene da glicoproteína E do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV).....	62
Figura 21. Árvore filogenética de região do gene da glicoproteína E do SLEV BR/MT-CbaH364/2012, identificado neste estudo, e SLEV_BR/MT-CbaAr499/2013, identificado em estudo paralelo (números de acesso: KJ847419 e KJ801827, respectivamente), e amostras de referência de diferentes genótipos de SLEV depositadas no GenBank (NCBI), utilizando o método de <i>Neighbor-Joining</i> , modelo de distância de Tamura-Nei e <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas.....	63

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I.....	84
ANEXO II.....	86
ANEXO III.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
A	Anos
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
ADE	<i>Antibody Dependent Enhancement of infection</i>
AnchC	Âncora hidrofílica C-terminal
BSQV	Vírus Bussuquara
Cap	7-metilguanosina
cDNA	DNA complementar
CPCV	Vírus Cacipacoré
C-terminal	Carboxi terminal
DENV	Vírus Dengue
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DF	Febre da Dengue
DHF	Febre Hemorrágica da Dengue
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeo Trifosfato
DSS	Síndrome do Choque da Dengue
DTT	Dithiothreitol
ECP	Efeito Citopático
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
ELISA	Ensaio Imuno-Enzimático
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FAS/ FAU	Febre Amarela Silvestre/ Urbana
G	Gravidade
HCl	Ácido Clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	Inoculação em Cultivo Celular
IFA/IFI	Imunofluorescência/Imunofluorescência Indireta
IFN	Interferon
IgA/IgG/IgM	Imunoglobulinas A, G e M
IGUV	Vírus Iguape
IL	Interleucina
ILHV	Vírus Ilhéus
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Kilodalton
M	Molar

MAC-ELISA	ELISA de Captura de IgM
MAYV	Vírus Mayaro
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M-N-PCR	Multiplex Nested PCR
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
Nm	Nanômetros
NS	Proteína não estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OROV	Vírus Oropouche
Pb	Pares de Base
pH	Potencial Hidrogênico
Poli(A)	Poli adenilada
pr-M	Proteína precursora de membrana
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placas
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucléico
ROCV	Vírus Rocio
RT-PCR	Transcrição Reversa e reação em cadeia da polimerase
Seg	Segundos
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificações
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TGF	Fator de Transformação e Crescimento
TLR	Receptor do Tipo Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
U	Unidade
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
UTR	<i>Untranslated Region</i>
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da Febre Amarela

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Considerações Gerais.....	15
1.2 Família <i>Flaviviridae</i> , Gênero <i>Flavivirus</i>	16
1.2.1 Estrutura e genoma dos flavivírus.....	18
1.2.2 Ciclo replicativo intracelular dos flavivírus.....	19
1.2.3 Manifestações clínicas e patogenia das infecções por flavivírus de maior importância no Brasil em humanos.....	21
1.2.4 Ciclo de transmissão dos principais flavivírus transmitidos por mosquitos no Brasil....	25
1.2.5 Histórico e situação epidemiológica no Brasil dos arbovírus classificados no gênero <i>Flavivirus</i>	28
1.2.6 Diagnóstico laboratorial das infecções por flavivírus em humanos.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Caracterização do local de amostragem.....	35
4.2 Amostragem e procedimentos éticos.....	36
4.3 Extração de RNA viral das amostras de soro dos pacientes.....	36
4.4 Controles positivos.....	36
4.5 RT-PCR para detecção de flavivírus.....	37
4.6 Multiplex semi-nested PCR para espécies de flavivírus.....	37
4.7 Semi-nested single e/ou duplex-PCR para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e SLEV.....	39
4.8 Semi-nested RT-PCR para o gene de Envelope (E) de SLEV.....	39
4.9 Sequenciamento nucleotídico.....	40
4.10 Análise filogenética.....	41
4.11 Análise de dados.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1 Perfil epidemiológico dos pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 no estado de Mato Grosso.....	42
5.2 Caracterização dos casos positivos para flavivírus em Mato Grosso.....	45

5.3 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética.....	58
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÕES.....	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Arthropod-borne viruses (arbovírus) são em sua maioria zoonóticos com genoma RNA, transmitidos por artrópodes hematófagos. Alguns arbovírus são associados a surtos em humanos, constituindo-se em um problema de saúde pública. Estes agentes possuem ampla distribuição geográfica, predominando nos trópicos devido às condições ecológicas e climáticas favoráveis à proliferação dos vetores e à manutenção do ciclo epidemiológico (WEAVER & REISEN, 2010). A emergência e reemergência de arbovírus são fenômenos naturais relacionados à evolução das espécies e adaptação, porém, para que possam causar epidemias, é necessário um ambiente permissivo, com disponibilidade de vetores competentes e populações de hospedeiros susceptíveis (WEAVER & REISEN, 2010).

Arbovírus são mantidos na natureza por ciclos zoonóticos complexos, nos quais hospedeiros amplificadores são espécies de aves, primatas, roedores, marsupiais, morcegos ou outros animais silvestres que quando infectados podem apresentar uma viremia em títulos suficientemente elevados por longos períodos, favorecendo a transmissão a vetores e sua manutenção na natureza. Hospedeiros que não apresentam viremia suficientemente elevada são hospedeiros finais ou acidentais. O homem é hospedeiro acidental para a maioria dos arbovírus (Figura 1) (FIGUEIREDO, 2007; KADING et al., 2013).

No vetor hematófago, os vírions contraídos durante o repasto sanguíneo em hospedeiros virêmicos infectam células do intestino médio, atingindo a hemolinfa e, desta, as glândulas salivares, estabelecendo infecção persistente. Após um período de incubação extrínseco de oito a 14 dias, os mosquitos transmitem o arbovírus pela saliva durante a hematofagia em hospedeiros susceptíveis (COIMBRA et al., 1998; GUBLER et al., 2007). No hospedeiro vertebrado, o vírus atinge as células-alvo pela circulação sanguínea, causando infecções inaparentes, síndromes febris acompanhadas de exantema, artralgia, encefalite, síndrome icterohemorrágica, hemorrágica e/ou choque sistêmico (VASCONCELOS et al., 2005; FIGUEIREDO, 2007; BATISTA et al., 2012).

Durante períodos de seca desfavoráveis à proliferação de mosquitos ou na ausência de hospedeiros susceptíveis, a transmissão transovariana em vetores, se constitui em um mecanismo de manutenção para alguns flavivírus (SHOPE, 1994; GUBLER et al., 2007; ZEIDLER et al., 2008). A co-infecção por mais de um flavivírus em mosquitos pode interferir com a replicação de ambos os vírus, porém quando há superinfecção por um segundo arbovírus quatro horas ou mais após a primoinfecção, há supressão somente do segundo

agente (PEPIN et al., 2008; ZOU et al., 2009; PESSANHA et al., 2011).

O Brasil apresenta condições ideais para ocorrência das arboviroses, com mais de 1/3 de área tropical. No país, 210 espécies de arbovírus já foram identificadas, 40 patogênicas para humanos. Cerca de 95 % dos casos em humanos são atribuídos aos vírus da Dengue (DENV), febre amarela (YFV), Rocio (ROCV), Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV), pertencentes às famílias *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), e os dois últimos às famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) e *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*), respectivamente (VASCONCELOS et al., 1998; FIGUEIREDO, 2007; KADING et al., 2013). Dentre os flavivírus transmitidos por mosquitos, já foram relatados no Brasil o DENV, YFV, ROCV e os vírus Iguape (IGUV), Bussuquara (BSQV), Ilhéus (ILHV), Cacipacoré (CPCV) e da encefalite de Saint Louis (SLEV), além de indícios sorológicos em equinos e aves do Nilo Ocidental (WNV) (BALEOTTI et al., 2003; FIGUEIREDO, 2007; OMETTO et al., 2013).

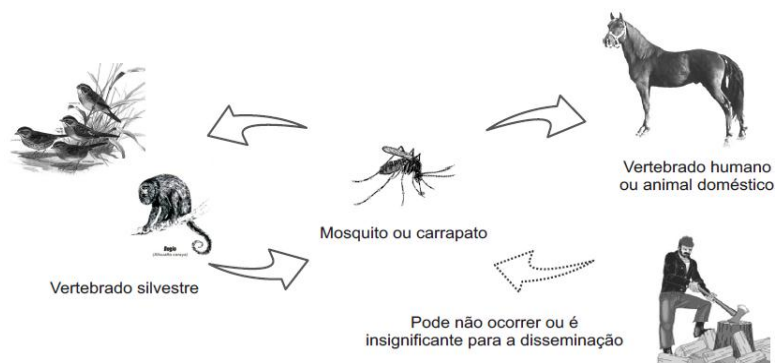


Figura 1. Ciclo de transmissão geral dos flavivírus, envolvendo vertebrados silvestres, mosquitos e ocasionalmente homem e/ou animais domésticos. Fonte: RIDPATH et al., 2012.

1.2 Família *Flaviviridae*, Gênero *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, inclui mais de 53 espécies de vírus transmitidas por mosquitos, carrapatos e alguns zoonóticos com vetor desconhecido (GUBLER et al., 2007; ICTV, 2012). Os flavivírus transmitidos por mosquitos são agrupados de acordo com a apresentação clínica e ecologia. Aqueles que causam encefalites possuem aves como hospedeiros vertebrados e espécies de *Culex* como vetores, são classificados no complexo da Encefalite Japonesa. Outros grupos compreendem o do YFV e o do DENV, que são viscerotrópicos e podem causar febres hemorrágicas, possuem primatas como hospedeiros vertebrados e espécies de *Aedes* como vetores (Tabela 1). Os flavivírus são ainda subdivididos em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos, ou em *clusters* e genótipos por filogenia (Figura 2) (BALEOTTI et al., 2003; GUBLER et al., 2007; KUHN, 2007).

Tabela 1. Flavivírus transmitidos por mosquitos que acometem humanos nas Américas. Fonte: ICTV, 2012.

Grupo	Espécie (sigla)	Vetor (es)	Hospedeiros e reservatórios	Distribuição geográfica
Vírus Aroa	Vírus Aroa (AROAV)	Desconhecido	Humanos, roedores	Venezuela
	Vírus Bussuquara (BSQV)	<i>Culex</i> spp.	Humanos, roedores	Amazônia, Panamá e Colômbia
Vírus Dengue	Vírus dengue (DENV-1,2,3,4)	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i>	Humanos, primatas	Mundial
Vírus da Encefalite Japonesa	Vírus da encefalite de St. Louis (SLEV)	<i>Culex</i> spp., <i>Sabethes belisarioi</i>	Humanos e aves	América
	Vírus Cacipacoré (CPCV)	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles</i> spp e <i>Culex</i> spp	Humanos	Brasil
	Vírus do Nilo Ocidental (WNV)	<i>Culex</i> spp.	Humanos, répteis, aves mamíferos	Mundial
Vírus Ntaya	Vírus Ilhéus (ILHV)	<i>Culex</i> , <i>Sabethes</i> , <i>Haemagogus</i> e <i>Psorophora</i> spp.	Humanos, aves	América Central e do Sul
	Vírus Rocio (ROCV)	<i>Psorophora ferox</i> , <i>Aedes scapularis</i>	Humanos, aves, roedores	Brasil
Vírus da Febre amarela	Vírus da Febre amarela (YFV)	<i>Aedes</i> , <i>Sabethes</i> e <i>Haemagogus</i> spp.	Humanos e primatas	África e América do Sul

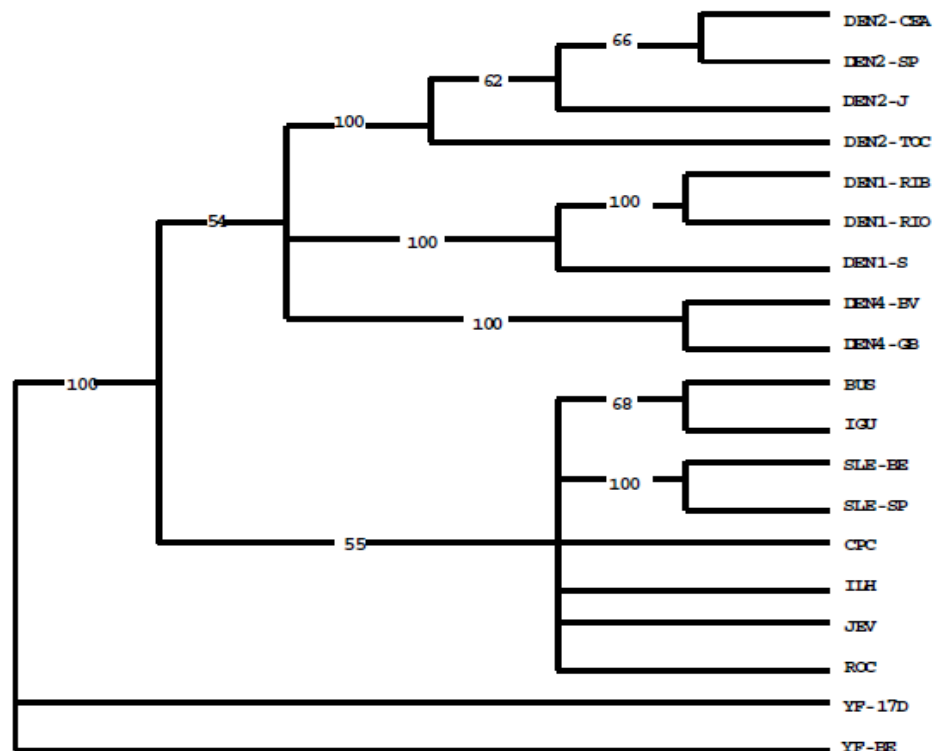


Figura 2. Árvore filogenética de 15 cepas de 10 espécies de flavivírus transmitidos por mosquitos com base na sequência parcial do gene da proteína não-estrutural NS5, observando-se três complexos: febre amarela, dengue e encefalite japonesa. Fonte: BALEOTTI et al., 2003.

1.2.1 Estrutura e genoma dos flavivírus

Os flavivírus possuem partículas virais esféricas, envelopadas e aproximadamente 50 nm de diâmetro, onde estão inseridas 180 cópias das glicoproteínas de membrana (M) e envelope (E), capsídeo icosaédrico (T=3) formado pela proteína do capsídeo (C) e genoma composto por uma fita única e linear de RNA polaridade positiva de 10 a 12.3 Kb, que contém na região 5' 7-metilguanossina (cap) (Figura 3). Seu genoma possui uma única fase aberta de leitura (ORF) e em ambas extremidades regiões não traduzidas (UTR). O genoma possui 10 genes, três codificam proteínas estruturais (C, M e E), localizados no terço proximal da extremidade 5', e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), localizados nos dois terços próximos da extremidade 3' (KUHN, 2007; LINDENBACH et al., 2007; MARTINS et al., 2012; RIDPATH et al., 2012).

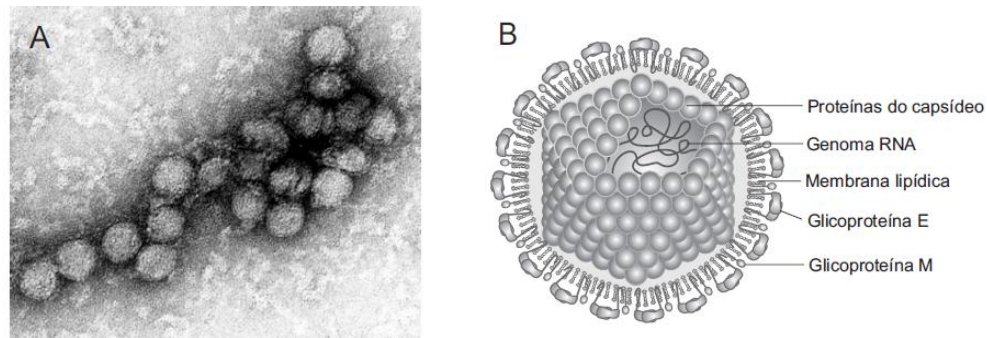


Figura 3. Morfologia das partículas virais dos membros da família *Flaviviridae*. A) Foto de microscopia eletrônica de partícula viral de WNV; B) Ilustração esquemática de uma partícula viral indicando seus componentes. Fonte: RIDPATH et al., 2012.

Gênero *Flavivirus*

11 Kb, 5' UTR cap

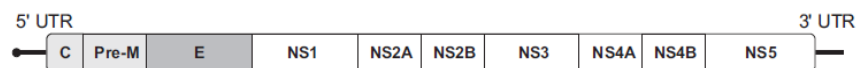


Figura 4. Estrutura e organização genômica da fita simples de RNA de polaridade positiva dos *Flavivirus*. Fonte: RIDPATH et al., 2012.

1.2.2 Ciclo replicativo intracelular dos flavivírus

Flavivirus possuem hospedeiros diversos e multiplicam-se em células dendríticas, endoteliais, monócitos/macrófagos, linfócitos B e T, hepatócitos e/ou neurônios (ANDERSON, 2003; LINDENBACH et al., 2007). Vários receptores são associados à adsorção; o DENV utiliza o DC-SIGN (CD209), uma Lectina tipo C, em células dendríticas (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; TASSANEETRITHEP et al., 2003) outros receptores de flavivírus incluem a $\alpha\beta 3$ integrina, GRF78 (BiP), CD14 e glicosaminoglicanas como o heparan sulfato (CHEN et al., 1997; KROSCHEWSKI et al., 2003). A opsonização dos vírions por imunoglobulinas sub ou não-neutralizantes, resultantes de infecções prévias com outros sorotipos do DENV, facilita a infecção de macrófagos e células dendríticas através de receptores para a porção Fc, por *antibody dependent enhancement of infection* (ADE) (BARBA-SPAETH et al., 2005).

A glicoproteína E (Envelope) é responsável pela adsorção e fusão do envelope à membrana celular, constituindo-se no maior indutor de anticorpos neutralizantes (KUHN, 2007; LINDENBACH et al., 2007). O ciclo replicativo ocorre no citoplasma da célula hospedeira (Figura 5), após adsorção e penetração dos vírus por endocitose mediada por clatrina. A fusão do envelope lipídico com a membrana endocítica é mediada pelos dímeros da glicoproteína E, que possuem um peptídeo de fusão. Este é exposto após a trimerização da

E, induzida pelo pH ácido endossomal, promovendo a liberação do nucleocapsídeo (LINDENBACH et al., 2007; RIDPATH et al., 2012). As proteínas do capsídeo se dissociam do genoma, desnudando-o (LINDENBACH et al., 2007; RIDPATH et al., 2012).

A tradução do RNA genômico pelos ribossomos após o reconhecimento do cap origina uma poliproteína, que é clivada por proteases celulares e virais em pelo menos dez proteínas virais (MUKHOPADHYAY et al., 2005; LINDENBACH et al., 2007). As proteínas não-estruturais (NS) formam o complexo RNA replicase. A NS1 (46 KDa) possui função incerta, porém mutações nessa proteína diminuem a replicação do genoma. A NS2A (22 KDa) direciona o complexo replicase para as membranas (KUHN, 2007; LINDENBACH et al., 2007). A NS2B (14 KDa) atua como um cofator para a serino-protease NS3 (70 KDa), resultando na proteólise da poliproteína NS. A NS3 também é helicase e trifosfatase nucleosídica, desfosforilando a região terminal 5' do genoma para adição do cap (LINDENBACH et al., 2007). A NS4A (16 KDa) está envolvida na replicação do RNA, podendo recrutar NS1 e outras proteínas, e a NS4B (27 KDa) tem função desconhecida (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH et al., 2007). A NS5 (103 KDa), altamente conservada entre os flavivírus, é a RNA polimerase dependente de RNA na região carboxi-terminal e metiltransferase na porção amino-terminal, metilando a estrutura 5' cap (CHAMBERS et al., 1990; KOONIN, 1993).

A replicação do RNA inicia com a síntese de uma cópia de RNA antígenômica (polaridade negativa) que serve de molde para fitas de polaridade positiva. Essas cópias servirão para mais etapas de tradução e serão encapsidadas na progênie (KUHN, 2007; RIDPATH et al., 2012). A morfogênese ocorre na região perinuclear e proteínas estruturais são translocadas ao lúmen do retículo endoplasmático (RE). Homodímeros da proteína C (11 KDa) envolvem o genoma, uma região hidrofóbica interna se associa à membrana do RE e uma âncora hidrofílica C-terminal (AnchC), servindo como peptídeo sinal para a translocação da proteína precursora de membrana (pr-M). Esta contém um domínio transmembrana na porção carboxi-terminal, responsável pela sinalização para inserção da glicoproteína E na membrana do RE, mediando a interação entre nucleocapsídeo e envelope viral (LOBIGS, 1993; LO et al., 2003; KIERMAYR et al., 2004). A encapsidação do genoma sinaliza o início do brotamento das partículas no RE. Partículas virais e subvirais não-infecciosas imaturas são transportadas pela rede trans-Golgi (TGN) em vesículas. A proteína M, formada a partir da pr-M (26 KDa), se associa à glicoproteína E (53 KDa) formando heterodímeros, impedindo a alteração conformacional prematura da glicoproteína E, que levaria à exposição do peptídeo de fusão pelo pH baixo nas vesículas do Golgi (GUIRAKHOO et al., 1991; GUIRAKHOO et

al., 1992; MUKHOPADHYAY et al., 2005). Após a clivagem da pr-M por furinas e proteases celulares, a proteína M permanece associada à partícula vírica, que é liberada da célula hospedeira por exocitose (CHAMBERS et al., 1990; STADLER et al., 1997; ELSHUBER et al., 2003; RIDPATH et al., 2012).

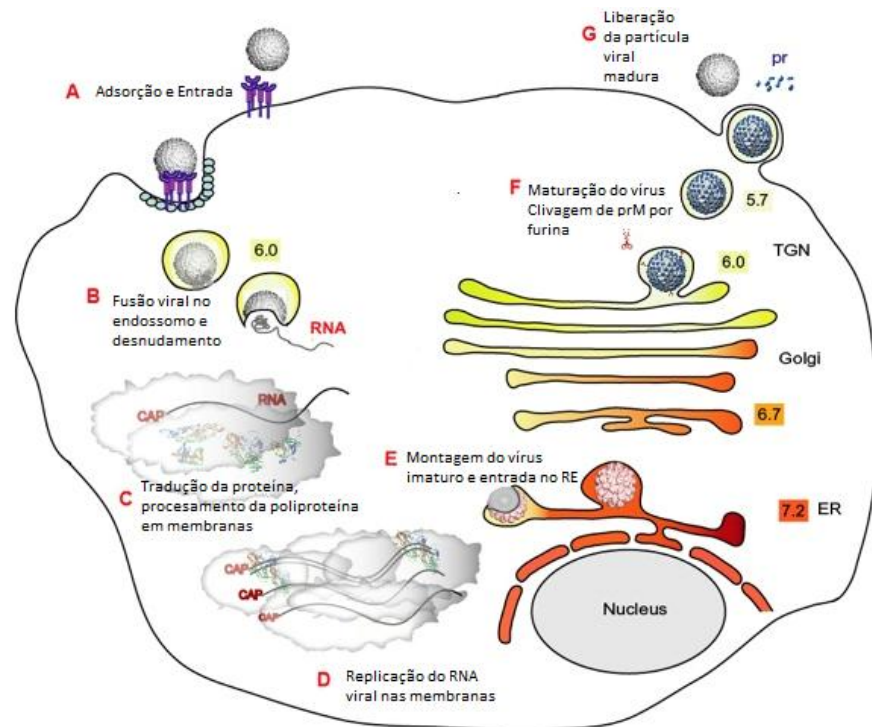


Figura 5. Ciclo replicativo dos *Flavivirus*. A) adsorção; B) penetração por endocitose e desnudamento; C) tradução da poliproteína; D) replicação do RNA viral; E) formação dos vírions imaturos e brotamento no retículo endoplasmático; F) maturação dos vírions e transporte até a membrana plasmática; G) exocitose. Fonte: Adaptado de KUHN, 2013.

1.2.3 Manifestações clínicas e patogenia das infecções por flavivírus de maior importância no Brasil em humanos

Os flavivírus produzem manifestações clínicas variáveis, desde infecções assintomáticas, doença febril aguda, hemorrágica ou icterohemorrágica, encefalite, miocardite e/ou choque, podendo evoluir a óbito (KUHN, 2007).

Após a inoculação pelo mosquito, YFV é carregado pela circulação linfática até os linfonodos regionais onde se replicam e então são carregados para circulação sanguínea e, por viremia, são disseminados para o fígado, baço, coração e rins. As lesões ocorrem como consequência direta da replicação viral ou secundariamente pela resposta imune do hospedeiro (SANTOS et al., 2008; QUARESMA et al., 2013). A resposta imune celular em infecções por YFV envolve células T CD8+, T CD4+, polimorfonucleares, NK e macrófagos.

Em casos fatais há níveis elevados de citocinas como TNF- α , IFN- γ e TGF- β (QUARESMA et al., 2013). Após um período de incubação de três a sete dias, três fases clínicas são descritas em humanos; a inicial cursa com febre abrupta, cefaleia, mal-estar, fotofobia, dor nas costas, mialgia, irritabilidade, agitação, náusea e vômitos, que perduram por três a cinco dias, fase em que há viremia, podendo ser fonte de infecção para mosquitos. Esta fase pode ser seguida por uma fase de remissão de 12 horas a dois dias. Alguns pacientes evoluem para a terceira fase, com icterícia, anúria oligúria e disfunção de múltiplos órgãos, instabilidade cardiovascular, febre hemorrágica, hematêmese, melena, petéquias, equimoses, trombocitopenia, tempo de coagulação e protrombina prolongados e redução nos níveis de fatores de coagulação, com mortalidade entre 20 e 50 % (SERIÉ et al., 1968; MONATH, 1988; VASCONCELOS et al., 1998; QUARESMA et al., 2013).

A dengue é a arbovirose mais frequente no mundo, constituindo-se em importante causa de morbidade e mortalidade (SAMUEL & TYAGI, 2006). Após a picada do vetor, há um período de incubação de dois a 14 dias, em média quatro a sete dias. O vírus é encontrado na circulação sanguínea entre o primeiro e o sexto dia de início das manifestações clínicas (SANTOS et al., 2008). Células dendríticas, monócitos e macrófagos são infectadas pelo DENV. A infecção induz a ativação e migração destas células aos linfonodos, de onde o vírus se dissemina por viremia e infecta outras células susceptíveis, promovendo a síntese de citocinas, quimiocinas, ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, liberação de Interferon γ (IFN- γ) e diminuição na liberação de células sanguíneas pela medula óssea (AGUIRRE et al., 2012; PHAM et al., 2012).

A gravidade da doença pode ser correlacionada ao sorotipo e ao isolado do vírus. DENV-2 e DENV-3 têm sido associados às doenças hemorrágicas e maiores índices de mortalidade (WAN et al., 2013), observando-se viremia em títulos mais elevados, o que influencia os níveis de IFN- γ , transaminases hepáticas e o grau de trombocitopenia. Estudos realizados com células endoteliais, hepáticas, macrófagos e mastócitos demonstram que a infecção pelo DENV promove a liberação de Interleucina-8 (IL-8), RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β . Níveis elevados de IL-8 são correlacionados à patogenia da febre hemorrágica e à efusão pleural (KUHN, 2007). A IL-6 é envolvida com hipertermia e liberação de proteínas de fase aguda no fígado. Os monócitos e macrófagos infectados produzem óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), aumentando a permeabilidade vascular e o desenvolvimento dos distúrbios hemorrágicos (CLYDE et al., 2006). Na fase inicial da febre hemorrágica, há redução nos níveis dos fatores de coagulação II, V, VII, VIII, IX, X e XI e fibrinogênio, caracterizando a coagulopatia. Há deposição de imunocomplexos na vasculatura e ativação

das vias do sistema complemento, contribuindo para a hemorragia, por aumentar o processo inflamatório e a permeabilidade vascular (Figura 6) (KUHN, 2007).

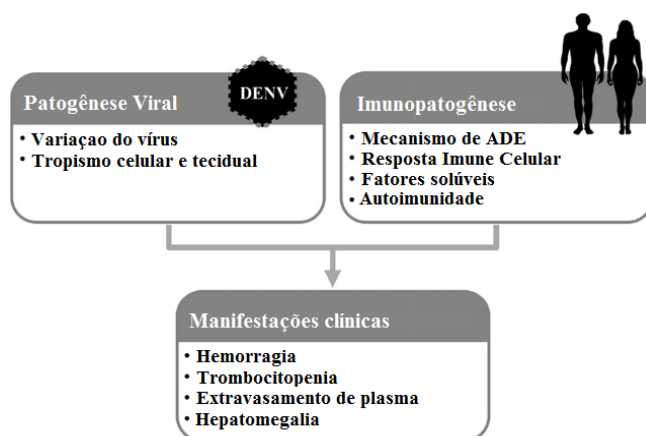


Figura 6. Patogenia da dengue: fatores virais e do hospedeiro contribuem para as manifestações clínicas, incluindo hemorragia grave, trombocitopenia, extravasamento de plasma e hepatomegalia. Fonte: Adaptado de WAN et al., 2013.

Clinicamente, a infecção pelo DENV pode ser inaparente, caracterizada por doença febril indiferenciada, a febre da dengue (DF), e febre hemorrágica da dengue (DHF) acompanhada ou não de síndrome do choque da dengue (DSS) (VASCONCELOS et al., 1998; GUBLER, 2002). Atualmente as novas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) classificam a doença como dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave, além de formas atípicas da doença. Somente 1,6% dos pacientes não se enquadram nas novas diretrizes e, anteriormente 13,7% dos casos de dengue não se enquadravam na classificação DF/DHF/DSS (WAN et al., 2013).

Indivíduos com idade inferior a 15 anos costumam apresentar doença febril indiferenciada com erupção cutânea maculopapular ou infecções assintomáticas (BURKE et al., 1988; GIBBONS & VAUGHN, 2002). A DF é mais comum entre adolescentes e adultos (SHARP et al., 1995), possui início repentino, com hipertermia, cefaleia, mialgia, artralgia, náuseas, dor retroorbital, dor abdominal, vômitos, exantema, *rash* cutâneo macular ou maculopapular, petéquias, epistaxe, menorragia, tosse e/ou hiperestesia cutânea (WATERMAN & GUBLER, 1989; RIGAU-PÉREZ et al., 1997). A DHF é caracterizada pelo aumento da permeabilidade capilar e alterações hemostáticas, cursando com trombocitopenia e petéquias pela fragilidade capilar, hemorragias, hepatomegalia, hepatite fulminante, encefalopatia hepática, efusões e/ou cardiomiopatia, podendo culminar em falência múltipla de órgãos (GIBBONS & VAUGHN, 2002; CLYDE et al., 2006; KUHN, 2007). A DSS

ocorre devido ao intenso extravasamento de plasma e tratamento inadequado, causando hipovolemia. Sintomas incluem persistência da dor abdominal, vômitos, alterações no nível de consciência, hipotermia e trombocitopenia (GIBBONS & VAUGHN, 2002; KUHN, 2007).

Infecções pelo WNV são assintomáticas (80 %) ou caracterizadas por doença febril branda (20 %), podendo evoluir a meningoencefalite em menos de 1 % dos casos (FILETTE et al., 2012). Após a inoculação por mosquitos, que se infectam em aves, o WNV infecta queratinócitos e células de langerhans, que migram aos linfonodos produzindo viremia primária em circulação linfática, atinge o sistema reticuloendotelial e produz viremia secundária, disseminando-se a outros órgãos através da corrente sanguínea (LIM et al., 2011; FILETTE et al., 2012). Hospedeiros amplificadores com viremia por até cinco dias são capazes de servir de fonte de infecção a vetores; humanos e equinos são hospedeiros finais, isto é, não geram viremia por tempo e carga viral suficientes para servirem de fonte de infecção aos vetores (CASTILLO-OLIVARES & WOOD, 2004). Dependendo do nível da viremia e da liberação de TNF- α , o WNV pode induzir aumento da permeabilidade e ultrapassar a barreira hematoencefálica, infectando o sistema nervoso central (CASTILLO-OLIVARES & WOOD, 2004; GUBLER et al., 2007). O período de incubação varia de dois a 14 dias e, clinicamente, a infecção é caracterizada por hipertermia, cefaleia, mialgia, vômito, diarreia, anorexia, *rash* cutâneo e linfadenopatia generalizada, além de faringite, hepatite, pancreatite, miocardite e disritmia cardíaca. A forma neurológica produz alteração do *status* mental, fadiga, rigidez cervical, tremores e ataxia, resultando em meningite asséptica, encefalite e paralisia, principalmente em idosos, e sequelas permanentes em 50% dos casos (GUBLER et al., 2007; LOBO, 2012).

A infecção pelo SLEV possui um período de incubação de quatro a 21 dias e menos de 1 % das infecções são sintomáticas e brandas, caracterizadas por hipertermia, calafrios, cefaleia, náusea, anorexia, mialgia, vertigem, mal-estar, faringite e tosse, podendo evoluir para resolução ou até encefalite ou meningite asséptica, acompanhadas por rigidez cervical, desorientação, tremores, ataxia, coma e mortalidade elevada em um a quatro dias, principalmente em idosos (TSAI & MITCHELL, 1988; VASCONCELOS et al., 1998).

O ILHV possui um período de incubação médio de sete a 14 dias, causando infecções inaparentes ou casos esporádicos de doença febril aguda por três a cinco dias, que pode evoluir a encefalite branda (PINHEIRO et al., 1986; VASCONCELOS et al., 1998; AZEVEDO et al., 2010). O ROCV foi identificado em 1975-78 em epidemia de doença febril e encefalite no vale do Ribeira e baixada Santista em São Paulo, com 925 casos e 92 óbitos,

após período de incubação de sete a 14 dias (IVERSSON, 1980; COIMBRA et al., 1998). Existe somente um relato de doença febril e artralgia por quatro dias causada por BSQV (PINHEIRO, 1981; FIGUEIREDO, 2000). Relatos de infecção humana pelo IGUV são desconhecidos (FIGUEIREDO, 2000) e pelo CPCV há um caso em área rural de Porto Velho, Rondônia (BATISTA et al., 2011).

1.2.4 Ciclo de transmissão dos principais flavivírus transmitidos por mosquitos no Brasil

A febre amarela urbana é frequente na África. No ciclo silvestre, o YFV é transmitido entre primatas não-humanos por *Aedes africanus* e *Ae. furcifer* na África, e principalmente por *Haemagogus janthinomys*, *Ha. albomaculatus*, *Ha. leucocelaenus*, e *Sabethes chloropterus* na América do Sul. Neste ciclo, mosquitos são vetores e reservatórios, permanecendo infectados por toda vida, ao contrário dos primatas e humanos, que evoluem para a remissão e imunidade ou ao óbito. Um ciclo intermediário em comunidades africanas próximas a áreas silvestres, envolve primatas, humanos e *Ae. simpsoni* como principal vetor (Figura 7) (VASCONCELOS et al., 2005; QUARESMA et al., 2013).

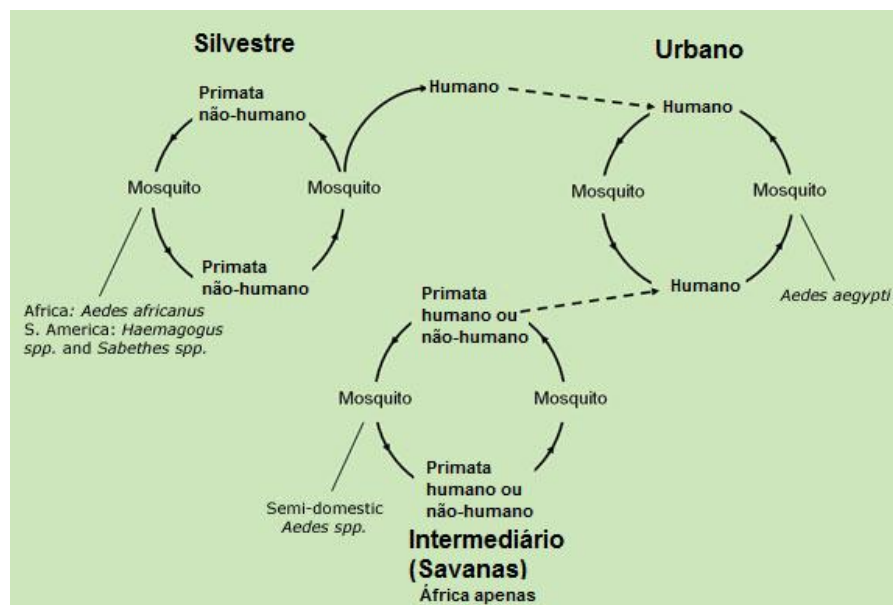


Figura 7. Ciclos de transmissão da febre amarela silvestre e urbana. Fonte: Adaptado de CDC, 2011.

O DENV é mantido na natureza em dois ciclos de transmissão. O ciclo selvagem relatado no oeste da África e Malásia peninsular envolve primatas como hospedeiros e *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* e *Ae. niveus* como vetores. O ciclo urbano possui *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* como vetores, seres humanos como amplificadores, ocorrendo nos trópicos e subtropicais. Há uma zona de emergência em áreas rurais da África, onde populações humanas

entram em contato com os ciclos selvagens e transmitem o DENV para áreas urbanas (Figura 8) (WEAVER & REISEN, 2010; VASILAKIS et al., 2011).

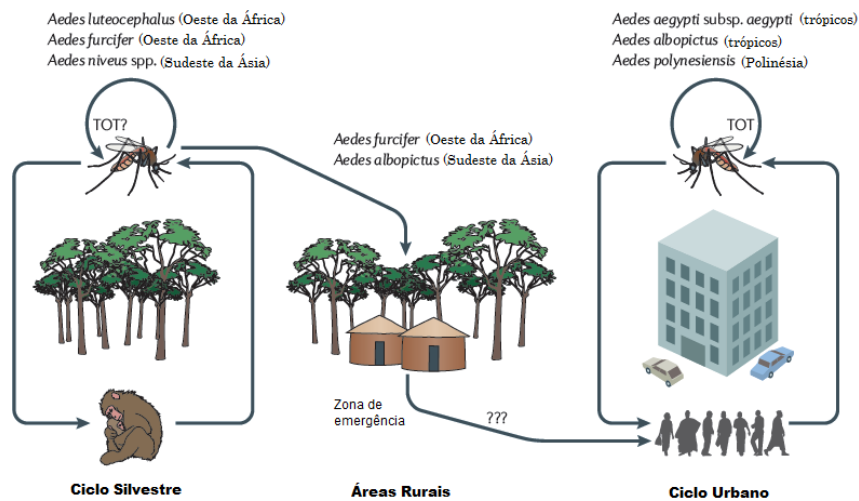


Figura 8. Ciclos de transmissão do DENV. Fonte: Adaptado de VASILAKIS et al., 2011.

O ciclo de transmissão do WNV envolve aves selvagens, muitas migratórias, como amplificadoras e mosquitos *Culex* vetores. *Cx. pipiens pipiens* é o principal, porém *Cx. tarsalis*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius* e *Cx. pipiens quinquefasciatus* também são importantes, além de outras espécies de mosquitos, dependendo da área geográfica (Figura 9) (GUBLER et al., 2007). Aves podem adoecer quando infectadas, observando-se mortandade, humanos e equinos são hospedeiros acidentais finais (FIGUEIREDO, 2000; GOULD & SOLOMON, 2008). Outras formas de transmissão entre humanos incluem transplantes de órgãos, transfusões sanguíneas, diálise, via transplacentária, via percutânea, aerossóis e por aleitamento materno (GUBLER et al., 2007; GOULD & SOLOMON, 2008).

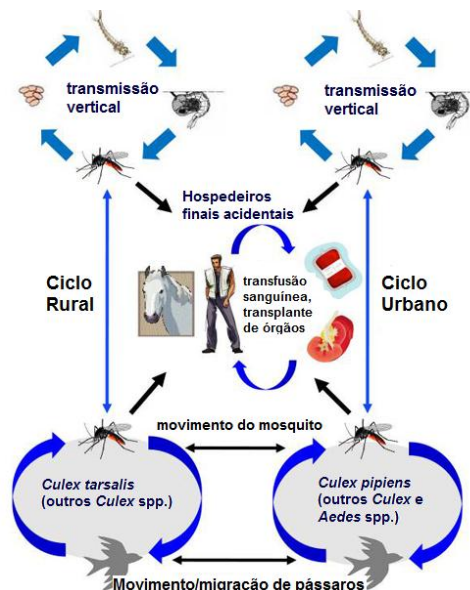


Figura 9. Ciclos de transmissão de WNV. Fonte: Adaptado de PFEFFER & DOBLER, 2010.

O SLEV é mantido na natureza por ciclos envolvendo aves selvagens (*Passeriformes* e *Columbiformes*, principalmente) amplificadoras e espécies de *Culex* como vetores (Figura 10). Um ciclo urbano entre aves como pardais e pombas, e vetores *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, pode levar à infecção acidental de humanos e animais domésticos, que são hospedeiros finais (DAY, 2001). Em zonas rurais ocidentais, é relatado o ciclo entre aves silvestres, *Cx. tarsalis* e *Cx. nigripalpus*. No Brasil, o SLEV ocorre em aves da família *Formicariidae* e mosquitos *Cx. declarator* e *Cx. coronator*, sendo estes potenciais vetores na Bacia Amazônica, além de outros dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* e *Sabethes*. Ciclos secundários em áreas silvestres envolvendo outros animais, como roedores, marsupiais e primatas não humanos, podem ocorrer (VASCONCELOS et al., 1991; CDC; 2010; RODRIGUES et al., 2010b).

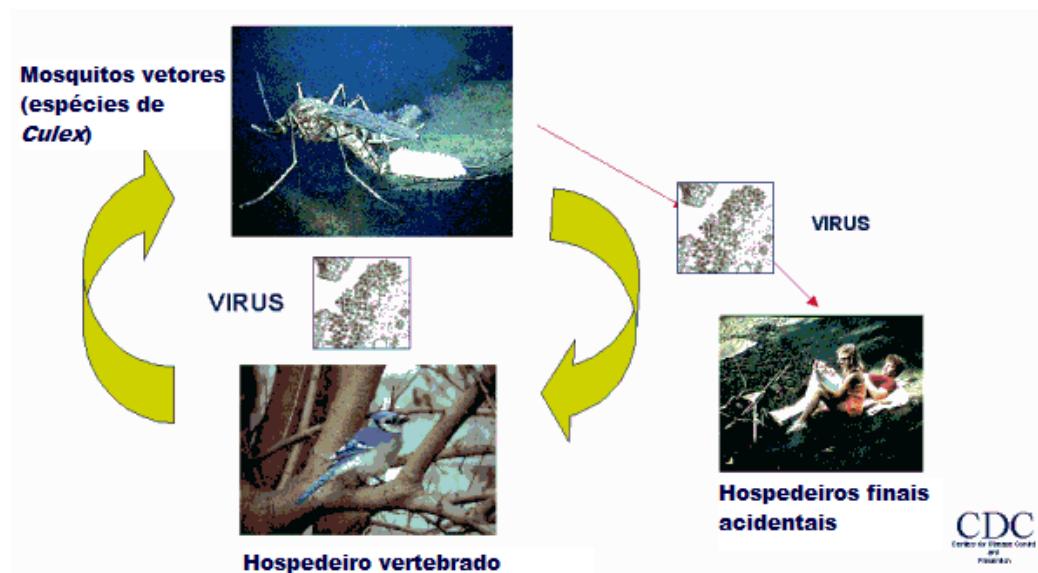


Figura 10. Ciclo de transmissão do SLEV. Fonte: Adaptado de ANDERSON, 2007.

O ROCV foi isolado de *Psorophora ferox* e estudos ecológicos posteriores sugeriram que de acordo com as características biológicas da espécie de *Ae. Scapularis* este pode ter sido o vetor de ROCV em epidemia em SP. sugerindo-se que esses podem ser vetores, além de *Culex* spp. Aves selvagens, incluindo migratórias, e morcegos seriam reservatórios e humanos hospedeiros finais (COIMBRA et al., 1998; FIGUEIREDO, 2000; GOULD & SOLOMON, 2008). O ILHV é mantido na natureza por um ciclo selvagem onde *Ps. ferox* é o principal vetor, e outras espécies de *Psorophora* e *Ae. serratus* com função secundária. Aves selvagens de uma grande variedade de famílias, morcegos e macacos sentinelas foram descritos como hospedeiros (VASCONCELOS et al., 1998; FIGUEIREDO, 2000). O ciclo de transmissão do IGUV é pouco conhecido, aves migratórias podem ser reservatórios, roedores e marsupiais

hospedeiros vertebrados. O vírus já foi isolado de camundongos sentinelas em área florestal e em *Anopheles cruzii* (COIMBRA et al., 1998; BOCATO-CHAMELET et al., 2001). O BSQV possui como vetores primários mosquitos *Culex* e hospedeiro vertebrado ainda desconhecido, porém há relatos em roedores sentinelas e um caso em humano (FIGUEIREDO, 2000; GOULD & SOLOMON, 2008). O CPCV possui ciclo de transmissão desconhecido, aves e humanos podem ser hospedeiros e já foi identificado em *Ae. aegypti* (BALEOTTI et al., 2003; FIGUEIREDO, 2010).

1.2.5 Histórico e situação epidemiológica no Brasil dos arbovírus classificados no gênero *Flavivirus*

O YFV foi o primeiro flavivírus relatado em humanos em 1648 na Península de Yucatan, México, porém há relatos de que o vírus poderia circular no Caribe desde 1498 (GUBLER et al., 2007; KUHN, 2007). YFV causou epidemias nos séculos XVII e XX na Europa e, em 1900, Walter Reed demonstrou que este agente estaria presente no sangue dos pacientes e era transmitido por *Ae. aegypti*. Em 1927, o protótipo do YFV (cepa Asibi) foi isolado de um paciente na Nigéria (KARABATSOS, 1985). Cerca de 200 mil casos e 30 mil mortes por YFV ocorrem por ano nas regiões tropicais da África e América do Sul (QUARESMA et al., 2013). O YFV foi introduzido no Brasil entre 1850 e 1909, causando surtos no litoral e tornando-se um problema de saúde pública. A vacinação iniciada em 1937 contribuiu para a erradicação da febre amarela urbana (FAU) em 1942 (FIGUEIREDO, 2000). O ciclo silvestre, relatado desde 1936, é responsável por casos esporádicos de febre amarela silvestre (FAS) na Amazônia e Planalto Central (FIGUEIREDO, 2000). Em 2000 dois casos autóctones foram identificados em Minas Gerais, em 2008 dois fatais em humanos e quatro em macacos em Ribeirão Preto, SP (MORENO et al., 2011). Entre 2008-2009 mais de 2000 óbitos em macacos no Rio Grande do Sul e 21 casos humanos foram relatados (DE ALMEIDA et al., 2012).

Epidemias de DENV são descritas desde o final do século XVIII, na Indonésia, Egito e Pensilvânia e, no século XIX, nas Américas, Ásia e Oceania (GUBLER et al., 2007). A primeira cepa do vírus isolada por Kimura e Hotta em 1943 e 1944, foi denominada Mochizuki. Em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram as cepas Havaí e Nova Guiné, esta com características antigênicas diferentes. Mochizuki e Havaí foram denominadas DENV-1 e a cepa de Nova Guiné DENV-2. Em uma epidemia de DHF no Sudeste Asiático em 1956, foram isolados os sorotipos DENV-3 e DENV-4 (MARTINEZ-TORRES, 1990; BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Um quinto sorotipo foi descrito na Malásia (VASILAKIS, 2013).

As primeiras evidências de introdução do DENV no Brasil ocorreram em 1916 em São Paulo (MEIRA, 1916; ROCCO et al., 2012) e 1923 em Niterói, Rio de Janeiro (PEDRO, 1923; ROCCO et al., 2012). Entre 1923 e 1981 houve ausência de relatos no Brasil, provavelmente devido à erradicação do *Ae. aegypti*. A circulação do DENV-1 e DENV-4 foi identificada em 1981/82 em epidemia em Boa Vista, Roraima (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1982; FIGUEIREDO, 2000; ROCCO et al., 2012). Entre 1986 e 1990, o DENV-1 foi isolado no Rio de Janeiro (SCHATZMAYR et al., 1986), e depois em São Paulo, Minas Gerais, Alagoas e Ceará. O DENV-2 foi isolado pela primeira vez em 1989 em Belém, Pará, de um paciente febril vindo da Angola, porém o primeiro caso autóctone ocorreu no Rio de Janeiro, em 1990 (NOGUEIRA et al., 1990). Epidemias por DENV-1 e/ou DENV-2 passaram a ocorrer no Brasil, quando foram observados os primeiros relatos de DHF (VASCONCELOS et al., 1998; FIGUEIREDO, 2000). O primeiro caso autóctone de DENV-3 foi descrito em 2000 no Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 2001) e, epidemias ocorreram entre 2000-2010 (ARAÚJO et al., 2012). Em 2008, foi detectada a reintrodução do DENV-4 em pacientes de Manaus sem histórico de viagem recente (FIGUEIREDO et al., 2008). Em seguida casos foram relatados em Roraima, 2010, e em vários estados do Brasil nos anos seguintes (SOUZA et al., 2011).

O WNV foi identificado em uma paciente com quadro febril na província de West Nile, Uganda, 1937 (SMITHBURN et al., 1940). Nas décadas seguintes disseminou-se para regiões da África, no Oriente Médio, Europa Mediterrânea, Índia, em algumas regiões da Ásia e Austrália. Surtos importantes ocorreram em Israel entre 1951-1954 e 1957 e na África do Sul em 1974. Em meados de 1990, uma grande epidemia com casos de encefalite ocorreu no vale do Danúbio e em áreas de Bucareste, Romênia (TSAI et al., 1998). Em 1999, ocorreu a introdução em Nova Iorque, EUA, observando-se grande mortalidade de pássaros e doença em 67 pessoas, das quais 21 evoluíram a óbito. A partir de então, o WNV foi identificado no Canadá, México e América Central (GOULD & SOLOMON, 2008; KRAMER et al., 2008). Na América do Sul os primeiros relatos da circulação de WNV vieram de evidências sorológicas em equinos na Colômbia em 2005 e isolamento viral a partir de equinos com encefalite em 2006 na Argentina. No Brasil, evidências sorológicas foram reportadas em equinos no Pantanal, de Mato Grosso do Sul (MS) em 2009, bem como em aves e equinos entre a Amazônia e Pantanal entre 2008-2010. Acredita-se que a introdução do WNV na América do Sul provavelmente ocorreu através de aves migratórias provenientes do hemisfério Norte (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011; RIDPATH et al., 2012; OMETTO et al., 2013).

O SLEV foi isolado de encéfalo humano em Saint Louis, EUA, em 1933 (KARABATSOS, 1985). Em 1975-1976 causou grande epidemia no Mississipi, EUA (POWELL & BLAKEY, 1982). O primeiro isolado no Brasil foi obtido de um pool de *Sabethes belisarioi* capturados na rodovia Bélem-Brasília, no Pará em 1960 (TRAVASSOS et al., 1980). Posteriormente, foi isolado de animais sentinelas, roedores e pássaros no Sudeste (LOPES et al., 1979). Durante trinta anos, somente três casos humanos foram relatados no país, dois na região Norte na década de 70 e um em São Paulo em 2004 (ROCCO et al., 2005; SANTOS et al., 2006). Em São José do Rio Preto, SP, em 2006, foram relatados seis pacientes infectados e um caso de co-infecção entre SLEV e DENV-3 (MONDINI et al., 2007a, MONDINI et al., 2007b). Prevalência de anticorpos vem sendo relatada em equinos na Bacia Amazônica e no Pantanal, MS (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010a; PAUVOLID-CÔRREA et al., 2014), além de isolamento em artrópodes e aves na Amazônia brasileira e humanos no Pará (RODRIGUES et al., 2010b). Recentemente, SLEV foi isolado do cérebro de um cavalo com encefalite em Minas Gerais (ROSA et al., 2013).

O ROCV foi identificado em casos fatais de encefalite no único surto relatado entre 1975-77 no Vale do Ribeira, São Paulo (LOPES et al., 1978; KARABATSOS, 1985). Entre 1983 e 1987, IgM foi detectada em dois pescadores e duas crianças da região rural de Iguape (IVERSSON & TIRIBA, 1997). Em 1995, foram identificados anticorpos em humanos na Bahia, em 2004 em aves no sul do país e em 2009 em equinos do Pantanal, MS (STRAATMANN et al., 1997; FIGUEIREDO, 2007; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014). O ILHV foi isolado em 1944 em Ilhéus, Bahia, em *pool* de mosquitos *Aedes* e *Psorophora* (KARABATSOS, 1985). Desde então, ILHV foi isolado de espécies de *Culex*, *Sabethes*, *Haemagogus* e *Trichoprosopon*, de pacientes febris e animais como aves e morcegos (VASCONCELOS et al., 1998; VENEGAS et al., 2012). No Pantanal de MS, ILHV foi isolado de *Ae. scapularis* e anticorpos neutralizantes foram detectados em 78 equinos (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2013, 2014). O IGUV foi isolado em 1979 de camundongo sentinela em área silvestre no Sudeste do Brasil, porém não foi detectado em humanos (FIGUEIREDO, 2000). O BSQV foi isolado de macaco sentinela (*Alouatta beelzebul*) em Belém, Pará, em 1956 e desde então foi descrito somente um caso em humanos (PINHEIRO, 1981; GOMES & CAUSEY, 1962; FIGUEIREDO, 2000). O CPCV foi isolado de ave em 1977 na Amazônia brasileira, Pará, em *Ae. aegypti* em 2010 e detectado em paciente de área rural de Rondônia em 2011 (FIGUEIREDO, 2000, FIGUEIREDO, 2010; BATISTA et al., 2011). Anticorpos neutralizantes foram detectados em equinos no Pantanal, MS, em 2009-

2010 (FIGUEIREDO, 2010; BATISTA et al., 2011; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014).

1.2.6 Diagnóstico laboratorial das infecções por flavivírus em humanos

A Inoculação em Cultivo Celular (ICC) ou animais é amplamente utilizada para o diagnóstico laboratorial de arboviroses, podendo ser realizada em camundongos recém-nascidos, ovos embrionados ou linhagens celulares (DE PAULA & FONSECA, 2004; FLORES & CARGNELUTTI, 2012). Dentre as linhagens sensíveis aos arbovírus cita-se a LLC-MK2 (rim de macaco *Rhesus*), AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*), Vero (rim de *Cercopithecus aethiops*), BHK-21 (rim de hamster neonato) e C6/36 (*Ae. albopictus*), sendo esta a mais usada para flavivírus (DE PAULA & FONSECA, 2004). O ICC permite a obtenção do vírus infectante para estudos posteriores (DE PAULA & FONSECA, 2004; FELIX et al., 2012). A identificação de flavivírus pelo efeito citopático (ECP) é confirmada pela detecção de antígenos ou ácidos nucleicos. A Imunofluorescência Indireta (IFI), pelo emprego de anticorpos policlonais anti-flavivírus ou monoclonais específicos para a espécie, seguidos de anti-IgG é preconizada para este fim no Brasil pelo Ministério da Saúde para identificação dos sorotipos do DENV e YFV (STORCH, 2007; SANTOS & BENATI, 2008).

O ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) indireto para IgG contra o DENV, WNV, YFV e outros flavivírus pode ser utilizado para a diferenciação entre infecções primárias e secundárias e em estudos epidemiológicos (NIEDRIG et al., 1999; MALAN et al., 2003). Estudos demonstram alta de sensibilidade, porém a especificidade é comprometida por reações cruzadas entre os flavivírus, principalmente os pertencentes ao complexo da Encefalite Japonesa, como WNV e SLEV (MALAN et al., 2003; DE PAULA & FONSECA, 2004; SILVA, 2010). O MAC-ELISA (captura) para IgM é utilizado no diagnóstico laboratorial de rotina para dengue e outras infecções por flavivírus. Limitações incluem reatividade cruzada entre flavivírus e a não diferenciação entre os sorotipos de DENV (OLIVEIRA et al., 2011).

Flavivírus secretam a proteína NS1 entre um e nove dias pós-infecção, geralmente utilizada como marcador precoce de infecção pelos sorotipos do DENV através de MAC-ELISA (*PlateliaTM Dengue NS1 AG test kit*, BIO-RAD) (KUMARASAMY et al., 2007; SILVA et al., 2011). Esta metodologia possui alta especificidade e sensibilidade de 52 a 66%. A sensibilidade de kits NS1 para amostras contendo DENV-2 e DENV-3 é diminuída na América Latina e Ásia. A variação na sensibilidade se deve à variações nos níveis da secreção de NS1 no soro de acordo com o sorotipo do DENV e ao *status* imune do paciente devido a infecções prévias (FELIX et al., 2012). Além do DENV e YFV, há kits de ELISA para a NS1

do WNV para o diagnóstico precoce de infecção em áreas endêmicas (SAXENA et al., 2013).

O Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRNT) com células BHK-21, Vero e LLC-MK2 é padrão ouro para determinar níveis de anticorpos neutralizantes e a imunogenicidade de vacinas contra o DENV, YFV, ILHV, ROCV e CPCV (KUNO, 2003; ROEHRIG et al., 2008; THOMAS et al., 2009; SIMÕES, 2011; MAEDA & MAEDA, 2013).

A Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) detecta quantidades mínimas do genoma viral em diferentes amostras clínicas, inclusive em mosquitos (DE PAULA & FONSECA, 2004; SANTOS & BENATI, 2008). Os métodos de Multiplex nested RT-PCR permitem a detecção de várias espécies virais na amostra ao mesmo tempo, bem como co-infecções, com maior sensibilidade e especificidade (ELNIFRO et al., 2000; TERZIAN, 2008). Estes ensaios utilizam iniciadores universais para os gêneros, seguidos de iniciadores espécie-específicos (LANCIOTTI et al., 1992; KUNO et al., 1998; BRONZONI et al., 2005). O protocolo para os sorotipos do DENV de Lanciotti et al. (1992) é preconizado pelo Ministério da Saúde e baseia-se em RT-PCR com iniciadores D1 e D2, seguida de multiplex semi-nested PCR com iniciadores sorotipo-específicos (TS1, TS2, TS3 e TS4). Outro protocolo com primers gênero e espécie-específicos em multiplex semi-nested RT-PCR para 11 espécies de flavivírus brasileiros é aplicado em estudos epidemiológicos (BRONZONI et al., 2005).

A RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) quantifica a carga viral e permite o acompanhamento da amplificação pela detecção de um composto fluorescente intercalante ou sondas sequência-específicas (*molecular beacons*, Scorpion, Sunrise, TaqMan®, Syber Green e sondas de hibridização FRET). Para flavivírus, utiliza-se protocolos com TaqMan® ou SYBR green e região do gene da NS5 do DENV, YFV, JEV, WNV e SLEV. Para amostras infectadas com o DENV, permite a rápida detecção, sorotipagem e quantificação da carga viral (KONG et al., 2006; CHAO et al., 2007; CONCEIÇÃO et al., 2010; OLIVEIRA, 2010).

O sequenciamento nucleotídico é utilizado para confirmar os resultados da RT-PCR, em estudos filogenéticos e de genotipagem, bem como permite a detecção de novas espécies de flavivírus. É possível analisar as sequências de acordo com as variáveis biológicas do vírus, tais como localização geográfica, hospedeiros, virulência, tropismo, entre outros. Estas informações permitem compreender a origem, ancestralidade e a relação entre os flavivírus circulantes, além de auxiliar na adoção de medidas de controle para a emergência e reemergência destes arbovírus (HOLMES, 1998; TERZIAN, 2008). Estudos de epidemiologia molecular e evolução dos flavivírus se baseiam na análise das sequências do gene da NS5 e das proteínas de envelope (BALEOTTI et al., 2003).

2 JUSTIFICATIVA

No estado de Mato Grosso (MT), o número de casos de dengue costuma ser elevado todos os anos, principalmente durante a estação chuvosa. Contudo, estudos sobre os sorotipos circulantes, bem como sobre a circulação de outros flavivírus que cursam com doença febril aguda clinicamente semelhante a dengue são escassos.

O MT possui clima tropical e ecossistema variado, com Amazônia ao norte, Pantanal ao sul e Cerrado no restante do estado. Neste ecossistema diverso, há grande diversidade de espécies de artrópodes hematófagos, vetores de arbovírus, bem como de hospedeiros amplificadores desses vírus zoonóticos, distribuídos em áreas rurais, urbanas e silvestres. O estado recebe anualmente grande número de visitantes devido ao turismo ecológico e ao desenvolvimento comercial. Além disso, o MT se encontra na rota de aves migratórias suspeitas de envolvimento na disseminação de alguns arbovírus provenientes da Amazônia e do hemisfério Norte. Há diversos relatos da circulação de outros flavivírus além do DENV em estados vizinhos. Estes fatores, aliados às condições climáticas, que propiciam a proliferação de vetores, e de saneamento, muitas vezes aquém da recomendada, bem como à densidade populacional encontrada em MT, são condições favoráveis à introdução e transmissão de arbovírus.

Métodos de diagnóstico empregados no soro do paciente com suspeita de dengue entre um e cinco dias do início da doença incluem a ICC e a IFA, bem como a detecção de NS1 dos sorotipos do DENV e por ELISA na fase inicial da doença. ELISA de captura para detecção de IgM e IgG também são utilizados. Desta forma, a utilização de métodos moleculares diferenciais, sensíveis e específicos, pode contribuir para o diagnóstico das infecções por flavivírus em pacientes com síndrome febril aguda no estado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar por técnicas moleculares a circulação de flavivírus em pacientes febris com suspeita de dengue em Mato Grosso entre os anos de 2011 e 2012.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar o(s) sorotipo(s) mais frequentes de DENV circulantes no estado;
- Identificar a possível circulação de outros flavivírus além do DENV em Mato Grosso;
- Associar a positividade para flavivírus com possíveis fatores de risco apresentados pelos pacientes com doença febril aguda.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, observacional do tipo transversal, amostras de soro de pacientes com doença febril aguda foram submetidas a multiplex semi-nested RT-PCR para região do gene NS5 de onze espécies de flavivírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV, SLEV, ILHV, BSQV, ROCV, IGUV e WNV). Amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico. Amostras positivas para o SLEV foram submetidas a semi-nested RT-PCR para região do gene da glicoproteína de envelope e análise filogenética. Os dados obtidos e possíveis fatores de risco foram analisados estatisticamente (Figura 11).

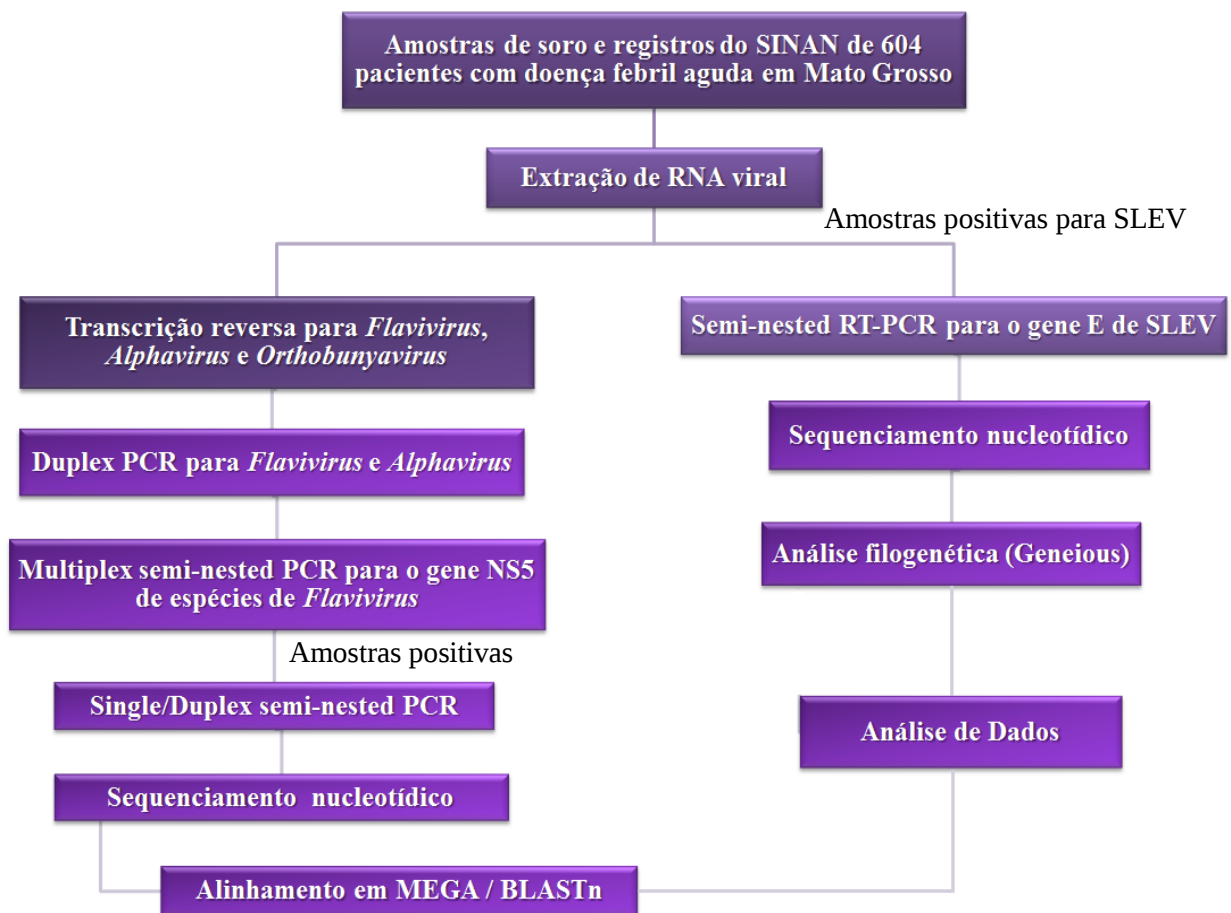


Figura 11. Fluxograma das atividades da pesquisa de flavivírus em pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em MT.

4.1 Caracterização do local de amostragem

O MT localiza-se na região Centro Oeste, representando 10 % do território brasileiro, distribuídos em Amazônia ao norte (53,6 %), Pantanal ao sul (6,8 %) e Cerrado (39,6 %).

Apresenta 3.035.122 habitantes em 903.366,192 km² de extensão. Possui fronteira com o Amazonas e Pará ao norte, Tocantins e Goiás ao leste, Mato Grosso do Sul ao sul e Rondônia e Bolívia à oeste (EMBRAPA, 2006; IBGE, 2010). O estado apresenta clima tropical, com duas épocas bem definidas: o período chuvoso, que compreende os meses de outubro a abril, e o período de seca, entre maio e setembro (EMBRAPA, 2006).

4.2 Amostragem e procedimentos éticos

Neste estudo observacional do tipo transversal, foram analisadas 604 amostras de soro de pacientes com doença febril aguda e início do quadro clínico por período inferior a cinco dias com suspeita de dengue. A coleta das amostras e o registro dos pacientes no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) foram realizados em Unidades Básicas de Saúde, hospitais e Prontos Socorros de municípios interligados à Secretaria Estadual de Saúde de MT entre outubro de 2011 e julho de 2012. Em seguida, as amostras foram enviadas em botijão criogênico com nitrogênio líquido (-196 °C) ao Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso (MT-Laboratório). Neste, as amostras de soro foram submetidas à ICC e IFI para identificação dos quatro sorotipos do DENV e do YFV. Alíquotas foram separadas e transportadas em nitrogênio líquido ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso (LV/FM/UFMT), onde foram armazenadas a -80°C.

Em conjunto com as alíquotas de soro dos pacientes, foram obtidas cópias dos registros do SINAN contendo dados como sexo, idade, ocupação, etnia, município de residência, sinais e sintomas, histórico de arboviroses e de visita a áreas de risco (Anexos I e II). Os procedimentos que envolvem pacientes e amostras clínicas humanas foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Hospital Universitário Júlio Müller, FM/UFMT, protocolo 100/2011 (Anexo III).

4.3 Extração de RNA viral das amostras de soro dos pacientes

A extração de RNA foi realizada em 140 µL de soro do paciente, utilizando-se o *QIAamp Viral RNA mini Kit* (QIAGEN Inc., USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA viral foi eluído em 60 µL e submetido à transcrição reversa para a síntese de DNA complementar (cDNA) e armazenamento.

4.4 Controles Positivos

RNA de cepas de DENV-1 (estirpe Mochizuki), DENV-2 (estirpe SpH 125367), DENV-3 (estirpe RPDen06/41), DENV-4 (estirpe Boa Vista), SLEV (estirpe BeH 355964),

YFV (estirpe 17DD) e ILHV (estirpe BeH 7445), gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Roberta Vieira Morais Bronzoni, UFMT Sinop foram utilizados como controle interno das reações.

4.5 RT-PCR para detecção de flavivírus

A síntese de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa (RT; *Superscript III*; *Invitrogen*). Para isso foram utilizados 9,1 µL de RNA viral, 4 µL de tampão 5x (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,6 µL de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs; 2,5 mM), 1,4 µL de dithiothreitol (DTT; 0,1 M), 1 µL dos iniciadores FG2 (15 µM) para flavivírus, cM3W (100 µM) para alfavírus e BUN-S (30 µM) para buniavírus (Tabela 2), 20 U de inibidor de RNase (*RNase OUT* – *Invitrogen*), 100 U da enzima transcriptase reversa (RT) em 20 µL de volume. A mistura de reagentes foi submetida a síntese de cDNA através de incubação a 50°C por 50 min e 70°C por 15 min. Iniciadores para alfavírus e buniavírus para a construção de cDNA foram incluídos para a investigação de outros arbovírus em estudos paralelos.

O cDNA foi submetido à reação de duplex-PCR para região de 958 pb do gene NS5 dos flavivírus e 433 pb do gene nsP1 de alfavírus. Para isso, foram utilizados 8 µL de cDNA, 5 µL de tampão de PCR 10x (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL dos iniciadores FG1 (15 µM) e M2W (50 µM) (Tabela 2), 1 U de DNA polimerase (5 U/µL; Taq DNA polimerase, *Invitrogen*) e água ultrapura para 50 µL de reação. A mistura de reagentes foi então submetida a um ciclo inicial de 94°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 2 min, e extensão final de 72°C por 5 min (BRONZONI et al., 2005). Nestas reações foram também incluídos controles positivos (cDNA de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, SLEV, YFV e/ou ILHV) e *No-template*.

4.6 Multiplex semi-nested PCR para espécies de flavivírus

Nestas reações, são identificadas espécies de *Flavivirus* de acordo com o tamanho do fragmento amplificado em duas reações de multiplex semi-nested PCR; a primeira, flavivírus 1, com primers para DENV-1, DENV-2, DENV-3, YFV e SLEV e a segunda, flavivírus 2, para DENV-4, BSQV, WNV, ILHV, IGUV e ROCV (Tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores utilizados para investigação molecular de arbovírus em pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em MT.**Iniciadores espécie-específicos para *Flavivirus*¹**

Alvo	Iniciador	Sequência	Posição no genoma	Amplicon (pb) ¹	Referência
Gênero <i>Flavivirus</i>	FG1 (+)	5'-TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT-3'	8270–8297	958	FULOP et al., 1993
	FG2 (-)	5'-GTGTCCCATCCTGCTGTGTGCATCAGCATACA-3'	9228–9258		
DENV-1	nDEN1 (-)	5'-CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC-3'	8653–8673	472	BRONZONI et al., 2005
DENV-2	nDEN2 (-)	5'-GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC-3'	8488–8516	316	
DENV-3	nDEN3 (-)	5'-CCCATTGGTTCTCCTCTGTG-3'	8800–8819	628	
DENV-4	nDEN4 (-)	5'-GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC-3'	8394–8415	222	
YFV	nYFV (-)	5'-TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT-3'	8502-8523	253	
SLEV	nSLEV (-)	5'-ATTCTTCTCTCAATCTCCGT-3'	8483-8502	232	
WNV	nWNV (-)	5'-TGGTGTCTGAGTTGAGCAGGG-3'	8489-8509	195	
ILHV	nILHV (-)	5'-TCCACCGCTGATCTGAGCCCGTGA-3'	8721–8744	474	
ROCV	nROCV (-)	5'-TCACTCTTCAGCCTTTCG-3'	8483–8500	230	
IGUV	nIGUV (-)	5'-CCACGAACCAACTTGAAG-3'	8507–8524	254	
BSQV	nBSQV (-)	5'-AAGTGACACCTGTTTCAGGGTA-3'	8638–8658	388	
Iniciadores específicos para o gene de Envelope de SLEV					
	F880 (+)	5'-CGATTGGATGGATGCTAGGTAG-3'	880-901	477	KRAMER & CHANDLER, 2001
	B2586 (-)	5'-CAGTTGGAGTCAGAGGGAAATACTT-3'	2586-2562		
	B1357 (-)	5'-GCAACCTCATACTTGATGTTTTCTC-3'	1357-1381		
Iniciadores utilizados como parte da preparação das amostras para estudos paralelos e futuros					
Gênero	M2W (+) ²	5'-YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW-3'	164–186	433	PFEFFER et al., 1997
<i>Alphavirus</i>	cM3W (-) ²	5'-ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC-3'	568–597	754-1080	MORELI et al., 2002
Gênero	BUN-S ³	5'- AGTAGTGTGCTCCAC-3'	S Extr 5'		
<i>Orthobunyavirus</i>					

¹Iniciadores utilizados em multiplex Semi-nested PCR com o primer *forward* FG1. ² Utilizados apenas na duplex RT-PCR. A investigação de alfavírus foi realizada em estudo em paralelo. ³ Utilizado apenas para construção de cDNA com objetivo de pesquisar buniavírus em estudos futuros.

Para isso, foram utilizados 2 µL dos produtos de duplex-RT-PCR, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (10mM), 0,5 µL de iniciador senso FG1 (15 µM) e de cada reverso (a 15µM; DENV-1, DENV-2, DENV-3, YFV e SLEV na reação flavivirus 1 e DENV-4, WNV, ILHV, IGUV, BSQV e ROCV na reação flavivírus 2) 0,5 U de DNA polimerase (5 U/µL; *Taq DNA polimerase; Invitrogen*) e água ultrapura para 25 µL de volume. A reação foi submetida a um ciclo inicial de 94 °C por 1 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, e extensão final de 72 °C por 5 min (BRONZONI et al., 2005). Foram incluídos controles positivos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, YFV ou SLEV) e *No-template*.

Alíquotas de 12 µL dos produtos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE; Tris base 2 M, Acido acético glacial e EDTA dissódico 0,5 M; pH 8,3), corados com *Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology)* e visualizados em fotodocumentador *Gel Doc XR+ (Bio-Rad)* com auxílio do programa *Image Lab (Bio-Rad)*.

4.7 Semi-nested single e/ou duplex-PCR para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e SLEV

Reações de *single* PCR somente com os iniciador senso FG1 e o reverso correspondente ao vírus identificado, ou ainda duplex-PCR para co-infecções pelo DENV, foram realizadas para confirmar a espécie identificada conforme condições de PCR descrita no item 4.6. Amostras positivas para as co-infecções foram adicionalmente submetidas à duplex RT-PCR a partir do RNA viral.

4.8 Semi-nested RT-PCR para o gene de Envelope (E) de SLEV

Para a análise filogenética das amostras positivas para SLEV, a região do gene de Envelope foi amplificada, sequenciada (477 pb) e comparada com seqüências de SLEV depositadas no GenBank. A transcrição reversa foi realizada com 10 µL de RNA, 4 µL de tampão 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,4 µL de DTT (0,1 M), 2 µL de mix de dNTPs (2,5 mM), 1 µL do iniciador B2586 (15µM) (Tabela 2), 15 U de inibidor de RNase, 100 U de RT (*Superscript III Invitrogen*) e água para 20 µL. A solução foi incubada a 50 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. RNA de controle positivo de SLEV foi incluído nas reações.

Em seguida, 8 µL do cDNA, 5 µL de tampão 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µL de MgCl₂ a 50 mM, 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL dos iniciadores B2586 e F880

(15 μ M; Tabela 2), 1 U de DNA polimerase e água ultrapura para 50 μ L de volume foram submetidos a 30 ciclos de 92 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, e um ciclo final de 72 °C por 7 min. A reação de semi-nested PCR foi realizada com 4 μ L de DNA resultante da PCR, 1 μ L dos iniciadores B1357 e F880 (15 μ M; Tabela 2) e demais reagentes descritos na reação anterior, bem como condições de ciclagem e eletroforese. As condições de termociclagem foram as mesmas utilizadas na etapa anterior. Posteriormente, 8 μ L das reações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose.

4.9 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico dos produtos obtidos nas reações de single PCR foi realizado no laboratório de Biologia Molecular na Faculdade de Medicina Veterinária da UFMT e na Fiocruz Amazônia para confirmar as espécies de arbovírus encontradas e para a análise filogenética das amostras positivas para SLEV.

Produtos obtidos nas reações de single PCR em quadruplicata foram purificados com o kit *Performa DTR Gel Filtration Cartridges* (Edge Biologicals) de acordo com especificações do fabricante. O DNA purificado foi quantificado no *ImageLab* (BioRad) após eletroforese em gel de agarose (1,5 %) utilizando-se como referência para comparação da intensidade das bandas nas amostras o marcador de peso molecular 1 Kb (*Thermo Scientific*) com concentrações conhecidas de DNA. A concentração foi expressa em ng/ μ L.

O DNA purificado e quantificado foi utilizado na reação de PCR com nucleotídeos marcados utilizando-se 2 μ L de *ready reaction premix Big Dye 2,5 X* (AmpliTaq DNA polimerase + Pirofosfatase termoestável; *Applied Biosystems*), 1 μ L de tampão *Big Dye Sequencing buffer 5X*, 10 μ M de iniciador FG1, nDEN1, nDEN2, nDEN3, nDEN4 ou nSLEV e DNA purificado para 10 μ L de volume final. A mistura de reagentes foi então submetida a um ciclo de 96 °C por 1 min e 40 ciclos de 96 °C por 15 seg, 50 °C por 15 seg, 60 °C por 4 min.

O produto da reação de PCR com *Big Dye terminator* foi precipitado com etanol/EDTA/Acetato de Sódio. Para esta precipitação foram adicionados 1 μ L de EDTA (125 mM), 1 μ L de Acetato de Sódio (3 M) e 30 μ L de etanol PA, e o volume foi incubado a temperatura ambiente (TA) por 15 min. Após a incubação o produto foi então centrifugado a 2500 x g por 30 min a 15 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado centrifugado a 185 x g e o sobrenadante novamente descartado. Ao precipitado foram adicionados 100 μ L de etanol 70 % e o volume final centrifugado a 20000 x g. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado novamente centrifugado a 185 x g. Após descarte do sobrenadante foram

adicionados 10 µL de formamida, seguido de homogeneização e centrifugação a 185 x g. O precipitado foi então submetido ao sequenciamento em *3500 Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*). As sequências obtidas da região do gene NS5 de DENV e SLEV foram comparadas pelo *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn; GenBank, NCBI) com sequências similares e as análises realizadas no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA versão 5.05).

4.10 Análise filogenética

As sequências nucleotídicas foram alinhadas e analisadas com sequências de cepas e isolados de flavivírus nos programas MEGA 5.05 e Geneious 6.0.6, através do BLASTn (GenBank, pubmed, NCBI), utilizando-se o Clustal W (THOMPSON et al., 1994). A árvore filogenética de parte do gene de envelope de SLEV foi construída pelo método *Neighbor-Joining* (NJ), que utiliza uma matriz de distâncias estimadas e emparelhadas para sequências de nucleotídeos usando o modelo de distância Tamura-Nei, com valor de Bootstrap de 1000 réplicas como critério de confiabilidade (TAMURA et al., 2004).

4.11 Análise de dados

Os dados contidos no registro do SINAN dos pacientes foram digitados no *Epidata Entry* (versão 3.1) e analisados no *Epidata Analysis* (versão 2.2.2.178). As variáveis positividade para os sorotipos do DENV-1 e DENV-4 e possíveis fatores de risco foram avaliadas por teste de duas proporções, considerando-se o erro alfa de 0,05.

Os mapas de amostragem e positividade para flavivírus em MT foram plotados com o programa ArcGIS (versão 9.3).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil epidemiológico dos pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 no estado de Mato Grosso

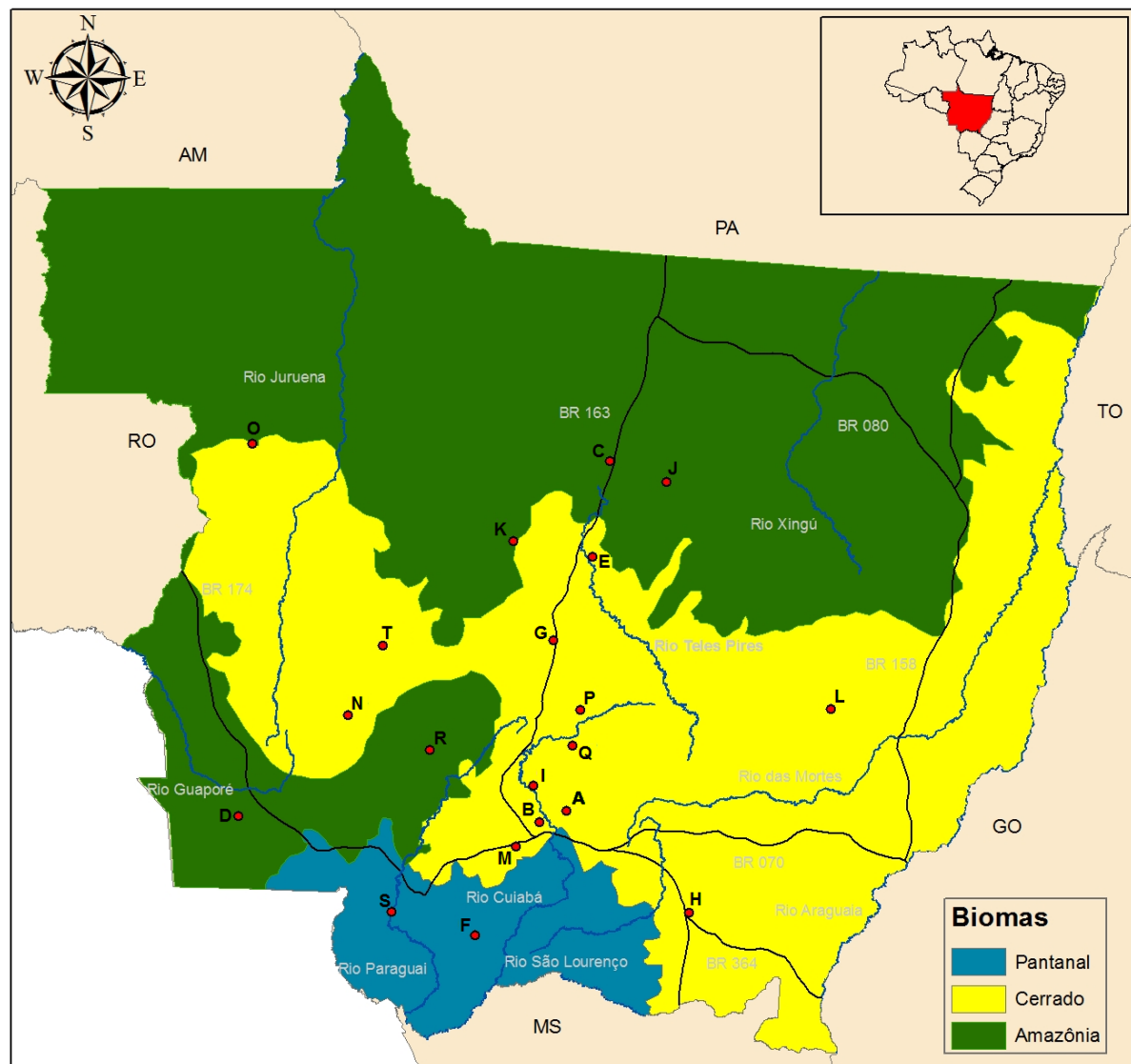
Neste estudo, analisou-se 604 amostras de soro de pacientes com doença febril aguda suspeita de dengue, provenientes de 20 municípios de MT entre outubro de 2011 e julho de 2012 (Figura 12), incluindo duas amostras de viajantes residentes nos estados de São Paulo e Bahia que se encontravam em Cuiabá. Dos pacientes incluídos no estudo, 538 (89,1 %) residiam em cidades da baixada Cuiabana, sendo 453 (75,0 %) de Cuiabá e 72 (11,9 %) de Várzea Grande. As cidades de origem desses enfermos estão concentradas principalmente na região central do estado, mais povoada e populosa, onde observou-se a maior casuística no período estudado. A região é caracterizada pelo bioma Cerrado.

Dentre os pacientes com dados disponíveis no SINAN, houve uma distribuição homogênea em relação ao gênero, sendo 300 (49,7 %) do sexo masculino e 304 (50,3 %) feminino. A variação do número de pacientes nas variáveis sociais/clínicas é devida à ausência de informações nos registros do SINAN para algumas ou a não aplicabilidade de alguns pacientes em determinadas variáveis. Por exemplo, entre as 304 amostras de mulheres, 256 possuem registros de gravidez disponível no SINAN e, dentre elas, nove (3,5 %) estavam gestantes. A maioria dos pacientes, 278/602 (46,2 %), possuía entre 20 e 39 anos, 112/602 (18,6 %) entre 40 e 59 anos, 103/602 (17,1 %) entre 5 e 14 anos, 70/602 (11,6 %) com 15 a 19 anos, 18/602 (3,0 %) menores de 5 anos e 21/602 (3,5 %) idosos com 60 anos ou mais. A maioria dos infectados (314/472; 66,5 %) eram pardos, (583/595; 98,0 %) residentes em área urbana, sem histórico de doença febril aguda suspeita de dengue pregressa. Em geral foram pardos 309/426 (72,5 %) e 379/426 (89,0 %) negaram visita a área rural/silvestre próximo ao episódio (Tabela 3).

Tabela 3. Características demográficas e epidemiológicas de pacientes com doença febril aguda com suspeita de dengue que demandaram os serviços de saúde em Mato Grosso entre outubro de 2011 e julho de 2012.

Características		Total	
		N*	%
Sexo	Masculino	300	49,7
	Feminino	304	50,3
Gestante	Sim	9	3,5
	Não	247	96,5
Idade (anos)	< 5	18	3,0
	5 9	40	6,6
	10 14	63	10,5
	15 19	70	11,6
	20 39	278	46,2
	40 59	112	18,6
	> 59	21	3,5
Etnia	Branca	111	23,5
	Parda	314	66,5
	Negra	37	7,8
	Amarela	5	1,1
	Outras	5	1,0
Zona	Urbana	583	98,0
	Rural	12	2,0
Histórico de doença pregressa	Sim	117	27,5
	Não	309	72,5
Histórico de visita à área rural/silvestre	Sim	47	11,0
	Não	379	89,0
Município de residência	Cuiabá	453	75,0
	Várzea Grande	72	11,9
	Sinop	19	3,1
	Pontes e Lacerda	15	2,5
	Sorriso	10	1,7
	Poconé	7	1,2
	Nova Mutum	4	0,7
	Outros	24	3,9
TOTAL		604	100,0

*A variação do número de pacientes nas variáveis é devida a ausência de informações nos registros do SINAN ou a não aplicabilidade de alguns pacientes em determinadas variáveis.



Legenda: Cidade (número de amostras)

A- Cuiabá (453)	H- Rondonópolis (3)	O- Juína (1)
B- Várzea Grande (72)	I- Acorizal (3)	P- Nobres (1)
C- Sinop (19)	J- Santa Carmem (2)	Q- Rosário Oeste (1)
D- Pontes e Lacerda (15)	K- Tapurah (2)	R- Nova Olímpia (1)
E- Sorriso (10)	L- Campinápolis (2)	S- Cáceres (1)
F- Poconé (7)	M- N Sra do Livramento (2)	T- Campo Novo do Parecis (1)
G- Nova Mutum (4)	N- Tangará da Serra (2)	

Figura 12. Distribuição dos pacientes com doença febril aguda suspeita de dengue de MT entre outubro de 2011 e julho de 2012 incluídos na pesquisa de arbovírus do gênero *Flavivirus*.

5.2 Caracterização dos casos positivos para flavivírus em Mato Grosso

Por multiplex semi-nested RT-PCR para região do gene da NS5 das 604 amostras incluídas no estudo, obteve-se 24/604 (3,97 %) amostras positivas para DENV-1, uma (0,17 %) para DENV-2, uma (0,17 %) para DENV-3, 315 (52,15 %) para DENV-4 e três (0,50 %) para o SLEV (Figuras 13 e 14). Dentre as 24 amostras positivas para DENV-1, nove são co-infecções com DENV-4, assim como a amostra positiva para DENV-2. Os três pacientes infectados pelo SLEV também são co-infecções com o DENV-4, sendo um deles uma tripla infecção por SLEV/DENV-1/DENV-4 (Tabela 4; Figura 15). Os demais flavivírus pesquisados não foram detectados, totalizando 273/604 (45,20 %) amostras negativas. Somente três cidades amostradas (Nova Olímpia, Campo Novo do Parecis e Rosário Oeste) não apresentaram amostras positivas para este gênero (Figura 16).

Dentre os pacientes positivos para DENV-1, 16/24 (66,7 %) eram do sexo feminino, 1/14 (7,1 %) com dado disponível estava gestante. A faixa etária mais acometida por este sorotipo foi de 20 a 39 anos com 11/24 (45,8 %) pacientes. Dentre aqueles que responderam a variável raça, 11/20 (55,0 %) se consideraram pardos, 7/20 (35,0 %) brancos e 2/20 (10,0 %) negros. Apenas 1/24 (4,2 %) paciente positivo residia em área rural, 3/19 (15,8 %) relataram histórico prévio de doença febril aguda suspeita de dengue e nenhum deles possui histórico de visita a área silvestre/rural próximo ao episódio febril (Tabelas 5 e 6). Pacientes infectados com DENV-1 residiam principalmente em cidades do meio-norte do estado (58,3 %), como Sinop (37,9 %), e em Cuiabá (33,3 %) (Tabelas 7 e 8; Figura 16).

A única infecção pelo DENV-3 detectada ocorreu em paciente do sexo feminino, 10 anos, com histórico de doença febril prévia suspeita de dengue, sem histórico de visita recente a áreas rurais/florestais e residia em área urbana de Cuiabá (Figura 16). Sinais e sintomas consistiram de hipertermia, cefaleia, mialgia e êmese.

Dentre os pacientes positivos para DENV-4, ambos os gêneros foram acometidos igualmente, 157/315 (49,8 %) do sexo masculino e 158/315 (50,2 %) feminino, 6/136 (4,4 %) estavam gestantes e a maioria das pessoas, 135/314 (41,3 %), possuíam entre 20 e 39 anos. Quanto à etnia, 170/250 (68,0 %) se consideraram pardas, 57/250 (22,8 %) brancas e 16/250 (6,4 %) negras; outras etnias somaram 2,8 %. Em sua maioria, os pacientes eram residentes de áreas urbanas, 299/309 (96,8 %) e apenas 10/309 (3,2 %) de zona rural. Com relação à histórico de doença pregressa, 179/233 (76,9 %) não reportaram histórico de infecção semelhante e 208/231 (90,0 %) não relataram viagens ou visita a áreas rurais e/ou silvestres recente (Tabelas 5 e 6). Sinais e sintomas mais frequentes estão relatados na Tabela 10. Positividade para DENV-4 foi detectada em todas as cidades pesquisadas do estado com

positividade para qualquer flavivírus (Figura 16).

Segundo análise estatística por teste de duas proporções entre possíveis fatores de risco para a infecção por DENV-1 ou DENV-4, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre residir em área urbana ($p=0,028$), não relatar histórico de doença febril aguda suspeita de dengue pregressa (0,029) e apresentar infecção por DENV-4 (Tabela 5).

Entre as nove co-infecções por DENV-1 e DENV-4, seis (66,7 %) ocorreram em mulheres e três (33,3 %) em homens, um paciente apresentava entre cinco e nove anos e outro entre 10 e 14 anos. A faixa etária mais prevalente, com 4/9 (44,4 %) pacientes, foi de 20 a 39 anos, seguida de 3/9 (33,3%) entre 40 e 59 anos. Somente um paciente relatou histórico de doença febril aguda pregressa e nenhum possui histórico de visita a área silvestre/rural recente. Os sinais e sintomas mais frequentes foram hipertermia (88,8 %), cefaleia (88,8 %), mialgia (88,8 %), artralgia (55,5 %) e dor retroorbital (33,3 %). Prostração, náuseas, diarreia e petéquias estavam presentes em 22,2 % dos pacientes. As amostras eram oriundas de Cuiabá (3; 33,3 %), Sinop (3; 33,3 %), Sorriso (2; 22,2 %) e Santa Carmem (1; 11,1 %). O único positivo para DENV-2 é uma co-infecção com DENV-4 em paciente do sexo masculino, 12 anos, sem histórico de doença febril pregressa ou visita a área rural/silvestre, residindo em área urbana de Cuiabá. Os sintomas foram hipertermia, cefaleia, êmese e dor epigástrica (Tabela 9).

Dentre os três pacientes co-infectados por DENV-4 e SLEV, um também apresentava DENV-1. Dois (66,7 %) eram do sexo masculino e um (33,3 %) feminino, um (33,3 %) possuía idade entre 10 e 14 anos e dois (66,7 %) entre 40 e 59 anos. Nenhum paciente relatou histórico de doença semelhante pregressa ou de visita a área rural/silvestre. O único sinal clínico em comum entre eles foi hipertermia. Entre os sintomas foram relatados dor na nuca, cefaleia, dor retroorbital e náuseas, sem diferenças significativas para os pacientes com infecções únicas. Os dados clínicos e epidemiológicos das co-infecções entre DENV-1 e DENV-4, DENV-2 e DENV-4, DENV-1, DENV-4 e SLEV e SLEV e DENV-4 constam na Tabela 9.

Analisando-se pelas características epidemiológicas e demográficas, 10/18 (55,5 %) dos menores de cinco anos de idade e 11/21 (52,4 %) dos maiores de 60 anos foram positivos para DENV-4. Nestas duas faixas etárias, consideradas de maior risco de gravidade por infecção por DENV, os números absolutos de manifestações hemorrágicas, considerando-se todos os pacientes incluídos no estudo, não foram significativos. Porém analisando-se dentre os pacientes de mesma faixa etária, a maior incidência de sinais hemorrágicos foi observada entre as crianças <5 anos, com 42,9 % (6/14), e adultos entre 40 e 59 anos, 26,5 % (26/98).

Nenhum paciente com menos de cinco anos ou com 60 ou mais foi positivo para DENV-1.

Dentre os sinais e sintomas mais frequentes entre todos os pacientes positivos para infecção por *Flavivirus*, os mais frequentes foram hipertermia (94,1 %), mialgia (85,7 %) e cefaleia (77,7 %). Manifestações hemorrágicas, como trombocitopenia, petéquias, eczema, hemoptise, melena e gengivorragia, estavam presentes em 25,3 % dos pacientes no momento da coleta, ou seja, menos de cinco dias do início da sintomatologia (Tabela 10).

Observou-se que o mês de maio apresentou maior número de pacientes amostrados, com 311 pacientes, e maior número absoluto de casos positivos para *Flavivirus* (157; 50,5 %). O mês com maior proporção de positividade para estes vírus foi abril, com 44/60 (73,3 %) pacientes (Figura 17).

Neste estudo 77 amostras apresentaram banda de DNA compatível com o fragmento amplificado pelo iniciador do YFV, porém esses dados não foram apresentados por ausência de recursos para investigação por sequenciamento nucleotídico ou outras técnicas.

Somente três cidades amostradas (Nova Olímpia, Campo Novo do Parecis e Rosário Oeste) não apresentaram amostras positivas (Figura 16).

Tabela 4. Frequência de positividade para flavivírus em pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.

Infecção	DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4		SLEV		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Infecção única	15	62,5	0	0	1	100	303	96,2	0	0	319	96,4
Co-infecções com DENV-1	-	-	0	0	0	0	9	2,9	1	33,3	9*	2,7
Co-infecções com DENV-2	0	0	-	-	0	0	1	0,3	0	0	1	0,3
Co-infecções com DENV-3	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0
Co-infecções com DENV-4	9	37,5	1	100	0	0	-	-	3	100	12*	3,6
Co-infecções com SLEV	1	4,2	0	0	0	0	3	0,9	-	-	3*	0,9
TOTAL	24	100	1	100	1	100	315	100	3	100	331*	100

* Diferenças no N total são devidas à tripla infecção com DENV-1, DENV-4 e SLEV.

Tabela 5. Características demográficas e epidemiológicas de pacientes com doença febril aguda positivos para os sorotipos do vírus da dengue 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.

Característica		DENV-1 (N=24)			DENV-4 (N=315)		
		N	%	p	N	%	P
Sexo	Masculino	8	33,3	0,102	157	49,8	0,929
	Feminino	16	66,7		158	50,2	
Dados disponíveis no SINAN		24	100		315	100	
Gestante	Sim	1	7,1	0,448	6	4,4	0,407
	Não	13	92,9		130	95,6	
Dados disponíveis no SINAN		14*	100		136*	100	
Zona	Urbana	23	95,8	0,444	299	96,8	0,028
	Rural	1	4,2		10	3,2	
Dados disponíveis no SINAN		24	100		309*	100	
Histórico de doença Pregressa	Sim	3	15,8	0,243	54	23,2	0,029
	Não	16	84,2		179	76,8	
Dados disponíveis no SINAN		19*	100		233*	100	
Histórico de visita à área rural/silvestre	Sim	1	5,3	0,411	23	10,0	0,440
	Não	18	94,7		208	90,0	
Dados disponíveis no SINAN		19*	100		231*	100	

*A variação do número de pacientes nas variáveis é devida a ausência de informações nos registros do SINAN ou a não aplicabilidade de alguns pacientes em determinadas variáveis.

Tabela 6. Distribuição de pacientes com doença febril aguda positivos para os sorotipos do vírus da dengue 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) entre 2011 e 2012 em Mato Grosso segundo idade e etnia.

Características		DENV-1		DENV-4	
		N*	%	N*	%
Idade (anos)	< 5	0	0,0	10	2,9
	5 9	2	8,3	20	10,2
	10 14	3	12,5	35	10,5
	15 19	2	8,3	37	11,4
	20 39	11	45,9	135	41,3
	40 59	6	25,0	66	20,3
	> 59	0	0,0	11	3,5
Etnia	Branca	7	35,0	57	22,8
	Parda	11	55,0	170	68,0
	Neg a	2	10,0	16	6,4
	Amarela	0	0,0	4	1,6
	Outras	0	0,0	3	1,2
TOTAL		24	100	315	100

Tabela 7. Distribuição de pacientes com doença febril aguda positivos para os sorotipos do vírus da dengue 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) entre 2011 e 2012 em Mato Grosso segundo município de residência.

Município de residência	DENV-1		DENV-4	
	N	%	N	%
Cuiabá	8	33,3	244	77,5
Várzea Grande	1	4,2	33	10,5
Sinop	9	37,5	7	2,2
Pontes e Lacerda	0	0,0	5	1,6
Sorriso	4	16,7	5	1,6
Poconé	0	0,0	5	1,6
Nova Mutum	0	0,0	2	0,6
Santa Carmem	2	8,3	1	0,3
Outros	0	0	13	4,1
TOTAL	24	100	315	100

Tabela 8. Distribuição de pacientes com doença febril aguda positivos para os sorotipos do vírus da dengue 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) em relação à amostragem por município de residência entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.

Município de residência	DENV-1		DENV-4	
	N	%	N	%
Cuiabá	8/453	1,7	244/453	53,8
Várzea Grande	1/72	1,4	33/72	45,6
Sinop	9/19	47,3	7/19	36,7
Pontes e Lacerda	0/15	0,0	5/15	33,3
Sorriso	4/10	40,0	5/10	50,0
Poconé	0/7	0,0	5/7	71,4
Nova Mutum	0/4	0,0	2/4	50,0
Santa Carmem	2/2	100,0	1/2	50,0
TOTAL	24	100	315	100

Tabela 9. Dados clínicos e epidemiológicos de pacientes com doença febril aguda com co-infecção entre os sorotipos do vírus da dengue (DENV) e/ou com o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.

Paciente # (idade)	Sexo	Cidade de Origem	Ocupação	Sinais e sintomas clínicos	Visita a áreas rurais/ silvestres	RT-PCR
193 (46 a)	F	Sorriso	Cozinheira	Hipertermia, cefaleia, mialgia, artralgia	Não	DENV-1/ DENV-4
210 (23 a)	F	Sinop	Engenheira Florestal	Hipertermia, cefaleia, mialgia, anorexia, náuseas, prostração	Não	DENV-1/ DENV-4
251 (09 a)	F	Sorriso	Estudante	Cefaleia, mialgia, artralgia, náuseas	Não	DENV-1/ DENV-4
307 (42 a)	F	Cuiabá	Gerente	Hipertermia, mialgia, cefaleia, artralgia	Não	DENV-1/ DENV-4
312 (36 a)	F	Cuiabá	Empregada doméstica	Hipertermia, cefaleia, mialgia, prostração e dor retroorbital	Não	DENV-1/ DENV-4
610 (30 a)	M	Santa Carmem	Construção Civil	Hipertermia, cefaleia, mialgia, artralgia, diarreia	Não	DENV-1/ DENV-4
614 (33 a)	M	Sinop	Trabalhador Rural	Hipertermia, cefaleia, mialgia, artralgia, petéquias, dor retroorbital	Não	DENV-1/ DENV-4
615 (14 a)	M	Sinop	Estudante	Hipertermia, cefaleia, mialgia, náuseas, diarreia, dor retroorbital, petéquias	Não	DENV-1/ DENV-4
321 (12 a)	M	Cuiabá	Estudante	Hipertermia, cefaleia, êmese, dor epigástrica	Não	DENV-2/ DENV-4
364 (47 a)	F	Cuiabá	Serviços Gerais	Hipertermia e dor na nuca	Não	DENV-1/ DENV-4/ SLEV
367 (55 a)	M	Cuiabá	Engenheiro civil	Hipertermia, cefaleia, dor retroorbital e náuseas	Não	DENV-4/ SLEV
113 (10 a)	M	Várzea Grande	Estudante	NI	NI	DENV-4/ SLEV

*NI= Não Informado

Tabela 10. Frequência dos principais sinais e sintomas clínicos entre pacientes com doença febril aguda negativos e positivos para o DENV entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.

Sinais e/ou Sintomas	Negativos	Positivos
	N (%)	N (%)
Hipertermia	192 (89,7)	257 (94,1)
Mialgia	175 (81,8)	234 (85,7)
Cefaleia	170 (79,4)	212 (77,7)
Dor retroorbital	115 (53,7)	128 (46,9)
Prostração	82 (38,3)	85 (31,1)
Artralgia	54 (25,2)	81 (29,7)
Petéquias	28 (13,1)	65 (23,8)
Êmese	42 (19,6)	46 (16,8)
Náusea	24 (11,2)	42 (15,4)
Anorexia	19 (8,9)	18 (6,6)
Dor epigástrica	19 (8,9)	14 (5,1)
Prurido	4 (1,9)	9 (3,3)
Vertigem	6 (2,8)	4 (1,5)
Manifestações hemorrágicas*	35 (16,4)	69 (25,3)
TOTAL	273 (45,2 %)	331 (54,8 %)

*Sinais e sintomas como trombocitopenia, petéquias, eczema, hemoptise, melena e gengivorragia foram agrupados nesta variável.

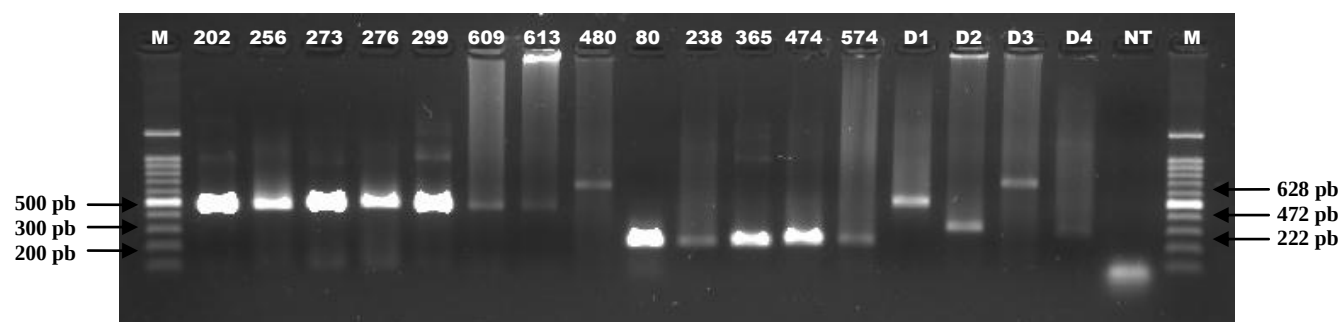


Figura 13. Produtos de multiplex semi-nested PCR para região do gene NS5 do vírus da dengue (DENV) em pacientes com doença febril aguda em Mato Grosso. M: marcador de peso molecular (100 pb), pacientes positivos para DENV-1 (202 a 613), DENV-3 (480), DENV-4 (80 a 574). Controles: D1: DENV-1 Mochizuki (472 pb), D2: DENV-2 SpH 125367 (316 pb), D3: DENV-3 RPDen06/41 (628 pb), D4: DENV-4 Boa Vista (222 pb) e NT: controle negativo (*No-template*).

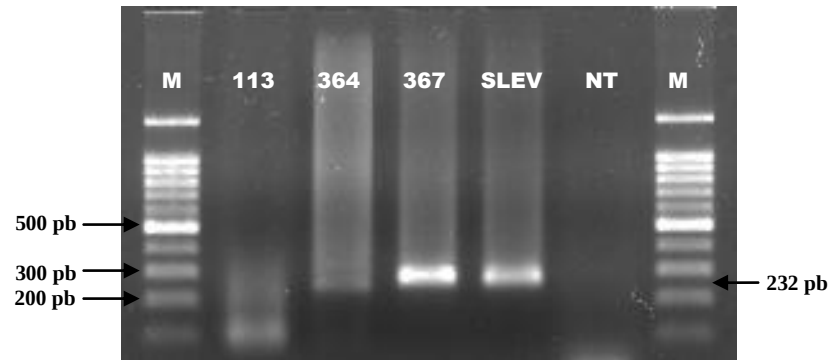


Figura 14. Produtos de multiplex semi-nested PCR para a região do gene NS5 do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) em pacientes com doença febril aguda em Mato Grosso. M: marcador de peso molecular (100 pb), pacientes positivos para o SLEV (#113, 364 e 367). Controles: SLEV: BeH355964 (232 pb) e NT: controle negativo.

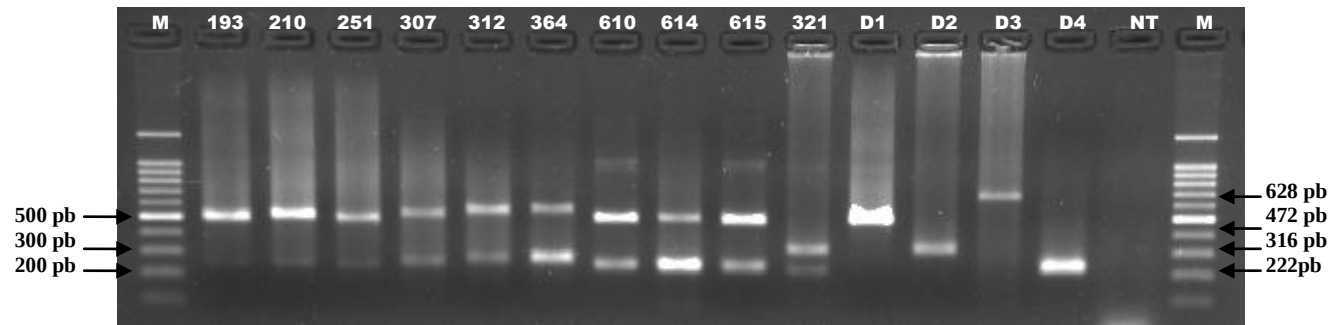


Figura 15. Produtos de multiplex semi-nested PCR para a região do gene NS5 em pacientes com doença febril aguda co-infectados com os sorotipos do vírus da dengue (DENV) em Mato Grosso. M: marcador de peso molecular (100 pb), amostras dos pacientes co-infectados com DENV-1 e DENV-4 (193 a 615) e com DENV-2 e DENV-4 (321). Controles: D1: DENV-1 Mochizuki (472 pb), D2: DENV-2 SpH 125367 (316 pb), D3: DENV-3 RPDen06/41 (628 pb), D4: DENV-4 Boa Vista (222 pb) e NT: controle negativo.

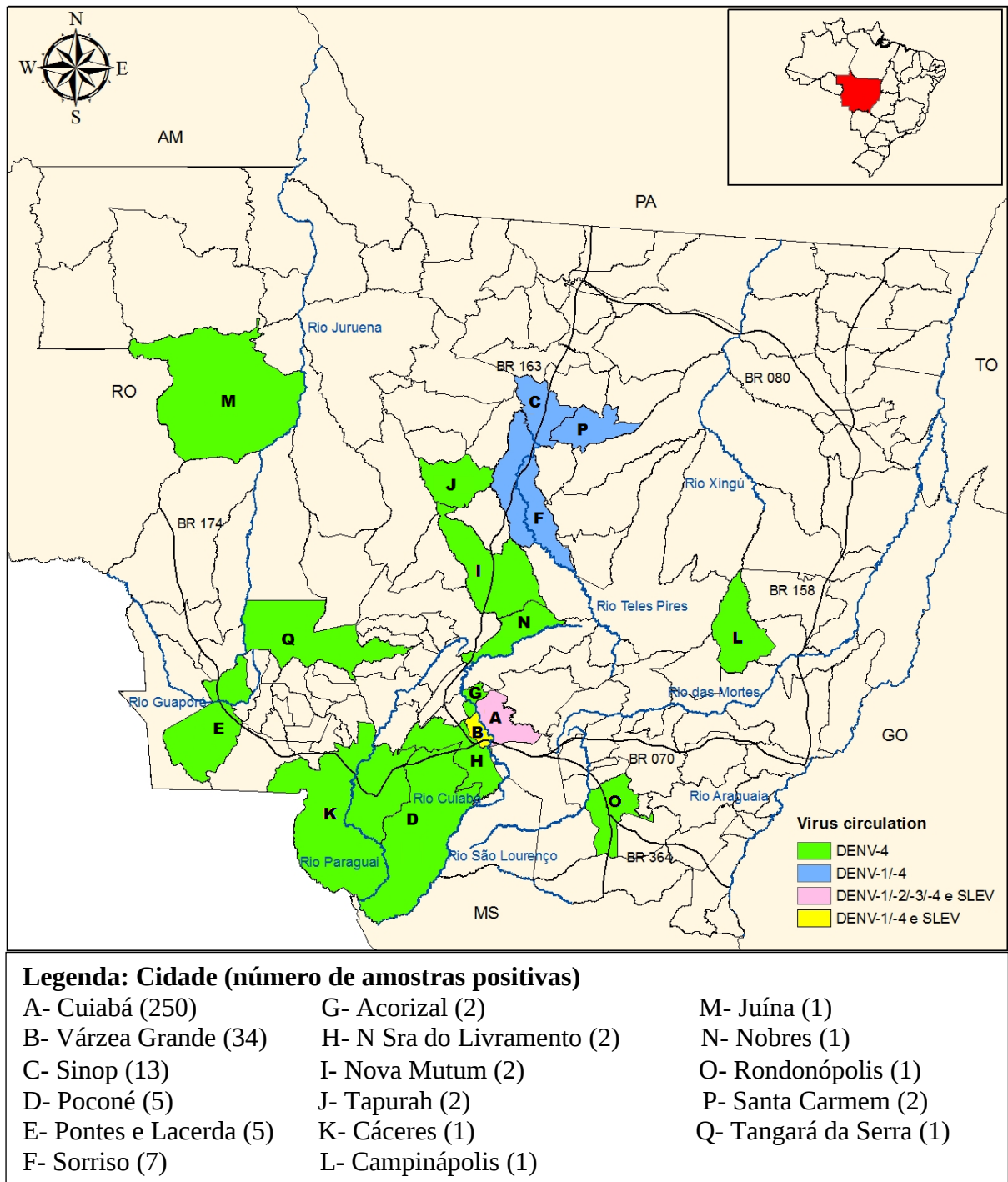


Figura 16. Distribuição dos pacientes com doença febril aguda positivos para flavivírus por multiplex semi-nested RT-PCR que demandaram os serviços de saúde entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.

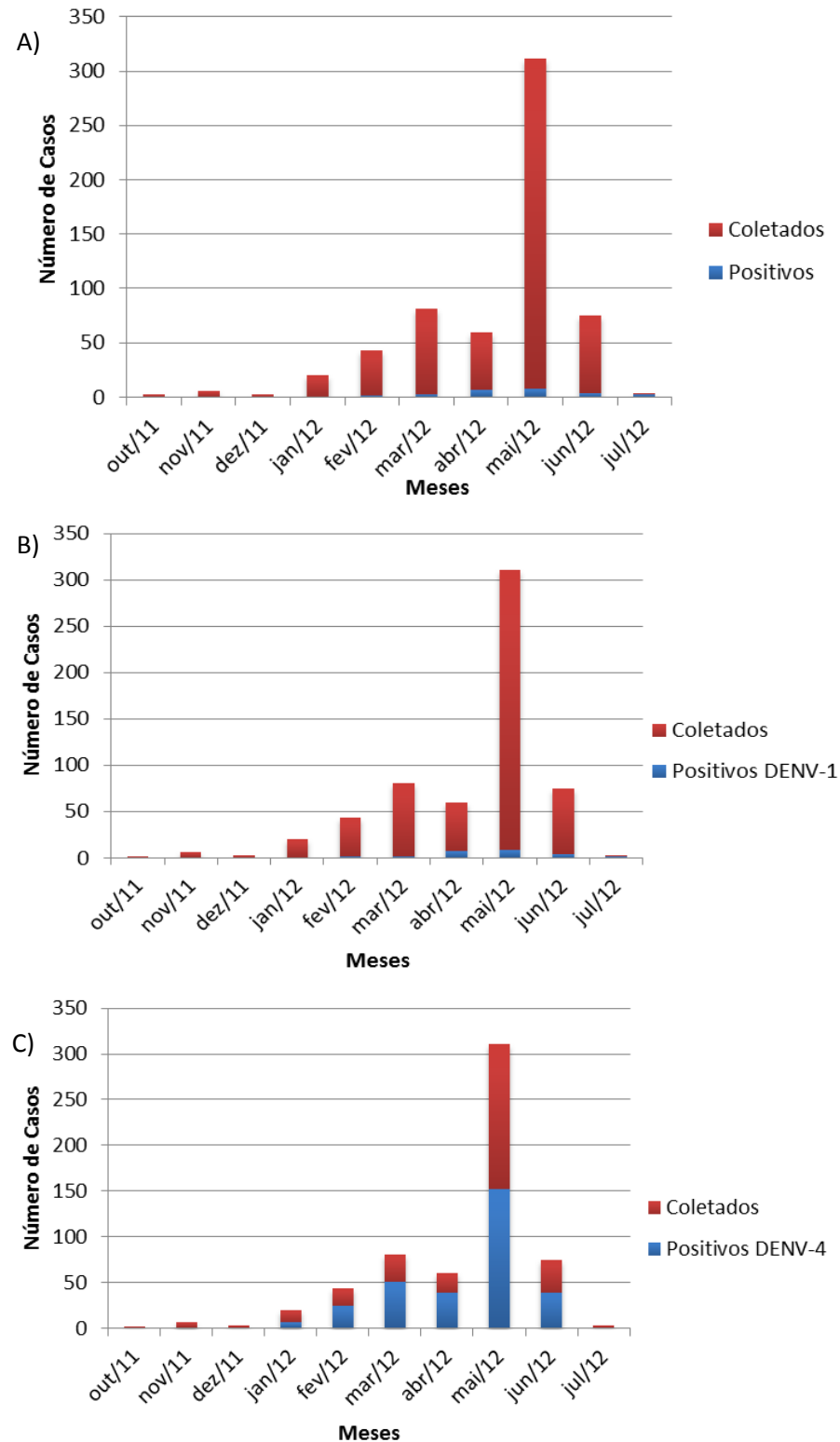


Figura 17. Distribuição de pacientes amostrados e positivos para DENV em relação ao mês de coleta em Mato Grosso entre outubro de 2011 e julho de 2012. A) flavivírus B) DENV-1 e C) DENV-4.

5.3 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética

Os produtos de single semi-nested RT-PCR positivos para DENV-2 (316 pb), DENV-3 (628 pb), SLEV (232 pb) e co-infecções por DENV-1 (472 pb) e DENV-4 (222 pb), foram submetidos ao sequenciamento para confirmação das espécies virais identificadas. O produto de DENV-2 (amostra 321) apresentou 97 % de identidade com a estirpe BR42727/RJ/91 (número de acesso: HQ012534.1), do Rio de Janeiro, que pertence ao genótipo Sudeste Asiático. A sequência da amostra 480 apresentou 97 % de identidade com o isolado de DENV-3 BR/BID-V3590/2007 (número de acesso: GU131869.1), de São Paulo, que provavelmente pertence ao genótipo III. As amostras sequenciadas de DENV-1 e DENV-4 apresentaram similaridade com diversos isolados, pertencentes ao genótipo V do DENV-1 e II do DENV-4 (Figura 18). Porém a amplificação parcial do gene da NS5 não permite classificar os genótipos de DENV das amostras circulantes no MT, tendo em vista que o gene de envelope é utilizado para esse fim.

As sequências nucleotídicas obtidas das amostras positivas para região do NS5 do SLEV (113, 364 e 367) confirmaram a especificidade da amplificação (Figura 19). Uma região de 477 bp para o gene para da glicoproteína de Envelope (Figura 20) foi sequenciada para análise filogenética em comparação com sequências de SLEV depositadas no GenBank e uma amostra de SLEV identificada no estado em estudo paralelo (BR/MT-CbaAr499/2013) (Tabela 11; Figura 20). A árvore filogenética foi construída pelo modelo de *Neighbor-Joining* (Figura 21), usando o modelo de distância Tamura-Nei, com valor de *bootstrap* de 1000 réplicas. Segundo a análise filogenética, a amostra identificada em Cuiabá, BR/MT-CbaH364/2012 (designação: MT/Cba364), se agrupa com amostras do genótipo V A, isoladas na Bacia Amazônica, Pará, com valor de *bootstrap* de 98,0 %.

Tabela 11. Sequências de flavivírus incluídas na árvore filogenética da amostra de SLEV obtida de paciente com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em Mato Grosso.

Designação	Estirpe	Vírus/ Genótipo	Acesso GenBank	Localidade	Ano
CA-63	BFS508	SLEV I A	AF205454	Califórnia/EUA	1963
CA-70	E22924	SLEV I A	AF205453	Califórnia/EUA	1970
TX-87	PV7-3389	SLEV I B	AF205491	Texas/EUA	1987
TX-89	PV0-620	SLEV I B	AF205492	Texas/EUA	1989
BRA-68	SpAn9398	SLEV II A	AF205472	São Paulo	1968
FL-69B	L695121.05	SLEV II A	AF205459	Flórida/EUA	1969
TX-83	83V4953	SLEV II B	AF205498	Texas/EUA	1983
FL-79	FL79-411	SLEV II C	EF158062	Flórida/EUA	1979
CA-89	Kern 217	SLEV II C	AF205465	Califórnia/EUA	1989
MEX-65	65V-310	SLEV II D	AF205470	México	1965
PAN-73 ^a	Panan90260	SLEV II D	AF205471	Panamá	1973
MO-37	Hubbard	SLEV II E	AF205508	Missouri/EUA	1937
MO-33	Parton	SLEV II E	AF205509	Missouri/EUA	1933
GUA-69	GMO-94	SLEV II F	AF205513	Guatemala	1969
ARG-79	79V2533	SLEV III	AF205490	Argentina	1979
PAN-77 ^a	GML902981	SLEV IV	AF205489	Panamá	1977
PAN-73B	PanAr902745	SLEV IV	AF205476	Panamá	1973
BRA-U	BeAn248396	SLEV V A	AF205480	Belém-PA	?
BRA-73B	BeAn246407	SLEV V A	AF205482	Belém-PA	1973
BRA-ARG78	78v6507	SLEV VA	AF205481	Argentina	1978
BRA-74C	BeAn 259507	SLEV VA	GU808545	Altamira-PA	1974
BRA-60	BeAr 23379	SLEV V B	AF205485	Belém-PA	1960
BRA-71	BeH 203235	SLEV V B	AF205484	Belém-PA	1971
BRA-72	BeAn 246262	SLEV V B	AF205483	Belém-PA	1972
PAN-83	GML903797	SLEV VI	AF205487	Panamá	1983
ARG-66	Argentine66	SLEV VII	AY632544	Argentina	1966
ARG-67	CorAn9275	SLEV VII	EF158068	Argentina	1967
BRA-84D	BeAn 423429	SLEV VIII A	GU808548	Belém-PA	1984
BRA-84F	BeAr 423512	SLEV VIII A	GU808554	Monte Alegre-PA	1984
BRA-84G	BeAr 423357	SLEV VIII A	GU808556	Altamira-PA	1984
BRA-84C	BeAn 421297	SLEV VIII B	GU808546	Tucuruí-PA	1984
BRA-73F	BeAn 248376	SLEV VIII B	GU808552	Itaituba-PA	1973
WNV	Nea Santa-Greece 2010	WNV	HQ537483	Grécia	2010
JEV	Torres Strait 98	JEV	AF148899	Austrália	1998
DENV-1	D1/Madagascar/0602aTw	DENV-1	EU448412	Taiwan	2003
CBA364	BR/MT-CbaH364/2012	V A	KJ847419	Cuiabá-MT	2012
CBA499	BR/MT-CbaAr499/2013	V A	KJ801827	Cuiabá-MT	2013

A) Virus da Dengue sorotipo 1 estirpe 242/2010/BR/RJ/2010, gene da poliproteína

```
#364      1 AGC CAA CCT AGA TAT CAT TGG CCA GAG GAT AGA GAA CAT AAA AAA TGA 48
#610      1 ACC CAA CCC AGA TAT CAA TGG CCA GAG GAT AGA GAA CAT AAA AAA TGA 48
242/2010/BR/RJ/2010 8174 AGC CAA CCT AGA TAT CAT TGG CCA GAG GAT AGA GAA CAT AAA AAA TGA 8222

#364      49 ACA TAA GTC AAC ATG GCA TTA TGA TGA AGA CAA TCC ATA CAA AAC ATG 97
#610      49 ACA TAA GTC AAC ATG GCA TTA TGA TGA AGA CAA TCC ATA CAA AAC ATG 97
242/2010/BR/RJ/2010 8223 ACA TAA GTC AAC ATG GCA TTA TGA TGA AGA CAA TCC ATA CAA AAC ATG 8271

#364      98 GGC CTA TCA TGG ATC ATA TGA GGT CAA ACC ATC AGG ATC AGC CTC ATC 146
#610      98 GGC CTA TCA TGG ATC ATA TGA GGT CAA ACC ATC AGG ATC AGC CTC ATC 146
242/2010/BR/RJ/2010 8272 GGC CTA TCA TGG ATC ATA TGA GGT CAA ACC ATC AGG ATC AGC CTC ATC 8320

#364      147 CAT GGT GAA TGG CGT GGT GAG ATT GCT CAC CAA ACC ATG GGA TGT TAT 195
#610      147 CAT GGT GAA TGG CGT GGT GAG ATT GCT CAC CAA ACC ATG GGA TGT TAT 195
242/2010/BR/RJ/2010 8321 CAT GGT GAA TGG CGT GGT GAG ATT GCT CAC CAA ACC ATG GGA TGT TAT 8369

#364      196 TCC CAT GGT CAC ACA AAT AG 216
#610      196 TCC CAT GGT CAC ACA AAT AG 216
242/2010/BR/RJ/2010 8370 CCC CAT GGT CAC ACA AAT AG 8390
```

B) Virus da Dengue sorotipo 2 estirpe BR42727/RJ/1991, gene da poliproteína

```
#321      1 AAC TCC ACA CCT GAG ATG TAC TGG GTA TCC AAT GCT TCC GGG AAC ATA 48
BR42727/RJ/91      8110 AAC TCC ACA CAT GAG ATG TAC TGG GTA TCC AAT GCT ACC GGG AAC ATA 8158

#321      49 GTG TCA TCA GTG AAC ATG ATT TCA AGG ATG TTG ATT AAC AGA TTC ACA 97
BR42727/RJ/91      8159 GTG TCA TCA GTG AAC ATG ATT TCA AGG ATG TTG ATT AAC AGA TTC ACA 8207

#321      98 ATG AAA CAC AAG AAA GCC ACC TAC GAG CCA GAT GTT GAC CTA GGA AGA 146
BR42727/RJ/91      8208 ATG AAA CAC AAG AAA GCC ACC TAC GAG CCA GAT GTT GAC CTA GGA AGC 8256

#321      147 GGA ACC CGC AAC ATC GGA ATT GAA AGT GAG ATA CCA AAT CTA GAC ATA 195
BR42727/RJ/91      8257 GGA ACC CGC AAC ATT GGA ATT GAA AGT GAG ATA CCA AAT CTA GAC ATA 8305

#321      196 ATA GGG AAG AGA ATA GAG AAA ATA AAG CAA GAG CAT GAG ACA TCA TGG 244
BR42727/RJ/91      8306 ATA GGA AAG AGA ATA GAG AAA ATA AAG CAA GAG CAT GAA ACA TCA TGG 8354

#321      245 CAC TAT GAC CAA GAT CAC CCA TAC 269
BR42727/RJ/91      8355 CAC TAT GAC CAA GAC CAC CCA TAC 8379
```

C) Virus da Dengue sorotipo 3 isolado BR/BID-V3590/2007, genoma parcial

```
#480      1 AAC TCC ACA CAT GAG ATG TAC TGG ATA TCT AAT GGC ACA GGT AAC ATT 48
BR/BID-V3590/2007 8177 AAC TCC ACG CAC GAA ATG TAC TGG ATA TCT AAT GGC ACA GGT AAC ATT 8225

#480      49 GTC GCT TCA GTC AAT ATG GTA TCT AGA CTG TTA CTG AAC AGT TTC ACG 97
BR/BID-V3590/2007 8226 GTC GCT TCA GTC AAT ATG GTA TCT AGA CTG CTA CTG AAC AGG TTC ACG 8274

#480      98 ATG ACA CAC AGA AGA CCC ACC ATT GAG AAA GAT GTG GAT TTA GGA GCA 146
BR/BID-V3590/2007 8275 ATG ACA CAC AGA AGA CCC ACC ATT GAG AAA GAT GTG GAT TTA GGA GCA 8323

#480      147 GGA ACT CGA CAT GTT AAT GCG GAA CCA GAA ACA CCC AAC ATG GAT GTC 195
BR/BID-V3590/2007 8324 GGA ACT CGA CAT GTT AAT GCG GAA CCA GAA ACA CCC AAC ATG GAT GTC 8372

#480      196 ATT GGG GAA AGA ATA AAA AGG ATC AAG GAG GAG CAT AAT TCA ACA TGG 244
BR/BID-V3590/2007 8373 ATT GGG GAA AGA ATA AAA AGG ATC AAG GAG GAG CAT AAT TCA ACA TGG 8421

#480      245 CAC TAT GAT GAC GAA AAC CCC TAC AAA ACG TGG GCT TAC CAT GGA TCT 293
BR/BID-V3590/2007 8422 CAC TAT GAT GAC GAA AAC CCC TAC AAA ACG TGG GCT TAC CAT GGA TCT 8470

#480      294 TAT GAA GTC AAA GCC ACA GGG CTC AGC CTC CTC CAT GAT AAA TGG AGT 342
BR/BID-V3590/2007 8471 TAT GAA GTC AAA GCC ACA GG- CTC AGC CTC CTC CAT GAT AAA TGG AGT 8519

#480      343 CGT GAA ACT CCT CAC TAA ACC ATG GGA TGT GGT CCC CAT GGT GAC ACA 391
BR/BID-V3590/2007 8520 CGT GAA ACT CCT CAC TAA ACC ATG GGA TGT GGT GCC CAT GGT GAC ACA 8568

#480      392 GAT GGC AAT GAC AGA TAC AAC TCC TTT TGG CCA GCA GAG AGT TTT CAA 440
BR/BID-V3590/2007 8569 GAT GGC AAT GAC AGA TAC AAC TCC TTT TGG CCA GCA GAG AGT TTT TAA 8617

#480      441 AGA GAA AGT GGA CAT TAG GAC ACC CAG GTC CAT GCC ATG AAC AAG ATG 489
BR/BID-V3590/2007 8618 AGA GAA AGT GGA CAC CAG GAC ACC CAG GTC CAT GCC AGG AAC AAG AAG 8666
```

D) Virus da Dengue sorotipo 4 isolado DENV-4/VE/BID-V2176/2000, genoma completo

```
#364      1 TCA AGG AAC TCC ACA CAT GAG ATG TAC TGG GTG TCA GGA GCG TCG GGA 48
VE/BID-V2176/2000 7995 TCC AGG AAC TCC ACC CAT GAG ATG TAC TGG GTG TCA GGA GCG TCG GGA 8043

#364      49 AAC ATT GTG AGC TCT GTG AAC ACA ACA TCA AAG ATG --T TGT TGA ACA 97
VE/BID-V2176/2000 8044 AAC ATT GTG AGC TCT GTG AAC ACA ACA TCA AAG ATG --T TGT TGA ACA 8092

#364      98 GGT TCA C-A ACA AG- -GC ATA GGA AAC CCA CTT ATG AG- AAG GAC GTA 146
VE/BID-V2176/2000 8093 GGT TCA C-A ACA AG- -GC ATA GGA AAC CCA CTT ATG AG- AAG GAC GTA 8141

#364      147 GAT CTT GGG GCA GGA ACG AGA AGT GTC TCC 195
VE/BID-V2176/2000 8142 GAT CTT GGG GCA GGA ACG AGA AGT GTC TCC 8172
```

Figura 18. Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos amplicons do gene da proteína NS5 do soro de pacientes de Mato Grosso positivos para o DENV. A) DENV-1 (#364 e #610); B) DENV-2 (#321); C) DENV-3; D) DENV-4 (#312 e #364) (GenBank: KF672759.1, HQ012534.1, GU131869.1 e FJ850095.1).

Alinhamento do gene NS5 com o SLEV estirpe BeAn 246262

#113	1	-GT	GGT	GCT	CCC	TCT	GCC	TGC	CGC	TGG	GTC	GCT	CGC	AGA	39
#367	1	-GT	GGA	GAT	GCA	-CA	GTC	AGA	GCA	GGA	GTG	GGC	CAC	GCT	39
SLEV_BeAn_246262	49	GGG	GAG	GAT	GGA	-CA	AAC	AGA	ACA	GGA	GTG	GGC	CAC	GCT	88
#113	40	TTG	ATA	GAA	GAA	TAA	ATA	AGG	TTG	GTC	GAG	GAT	TAA	CTT	79
#367	40	CTG	AGG	AAG	ATG	TGA	ACT	---	TAG	GAT	GTG	GAA	CGC	GCT	79
SLEV_BeAn_246262	89	ATG	AGG	AAG	ATG	TGA	ACT	---	TGG	GAA	GTG	GAA	CGC	GCT	128
#113	80	CCG	CCC	GAC	C-G	CCC	ACG	G-A	TGT	GCC	AGA	TTT	CCT	TGA	119
#367	80	CCG	TCG	GAA	A-G	CTC	ACA	G-A	GAA	GCC	AGA	TCT	CCG	-GA	119
SLEV_BeAn_246262	129	CCG	TCG	GAA	A-G	CTC	ACA	G-A	GAA	ACC	AGA	TCT	CCG	-GA	168
#113	120	CCG	TTG	GGG	AAA	GAA	TAC	TGA	GAT	TGA	GAG	AAG	AAT	ACC	159
#367	120	AAG	TTG	GCG	AAT	GAA	TAC	GGA	GAT	TGA	GAG	AAG	AAT	A--	159
SLEV_BeAn_246262	169	AAG	TTG	GGG	AAA	GAA	TAC	GGA	GAT	TGA	GAG	AAG	AAT	ACC	208

Alinhamento de gene de Envelope com SLEV estirpe BeAn 259507

#364	73	GGT	ACT	TGA	AGG	AGG	AAG	CTG	TGT	CAC	AGT	GAT	GGC	ACC	112
SLEV_BeAn259507	70	GGT	ACT	TGA	AGG	AGG	AAG	CTG	TGT	CAC	AGT	GAT	GGC	ACC	109
#364	113	AGA	GAA	ACC	AAC	ATT	GGA	CTT	CAA	AGT	GAT	GAA	GAT	GGA	152
SLEV_BeAn259507	110	AGA	GAA	ACC	AAC	ATT	GGA	CTT	CAA	AGT	GAT	GAA	GAT	GGA	149
#364	153	GGC	CAC	GGA	GTT	AGC	TAC	TGT	GCG	TGA	GTA	TTG	CTA	CGA	192
SLEV_BeAn259507	150	GGC	CAC	GGA	GTT	AGC	TAC	TGT	GCG	TGA	GTA	TTG	CTA	CGA	189
#364	193	AGT	A-T	TTC	CCT	CTG	ACT	-CC	AAC	TG					218
SLEV_BeAn259507	190	AGC	AAC	CTT	GGA	CAC	ACT	GTC	AAC	AG					215

Figura 19. Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos *amplicons* parciais dos genes NS5 e da glicoproteína E obtidas de pacientes positivos para o SLEV com as estirpes BeAn 246262 e BeAn259507, respectivamente (GenBank: AF205483.1 e GU808545.1).

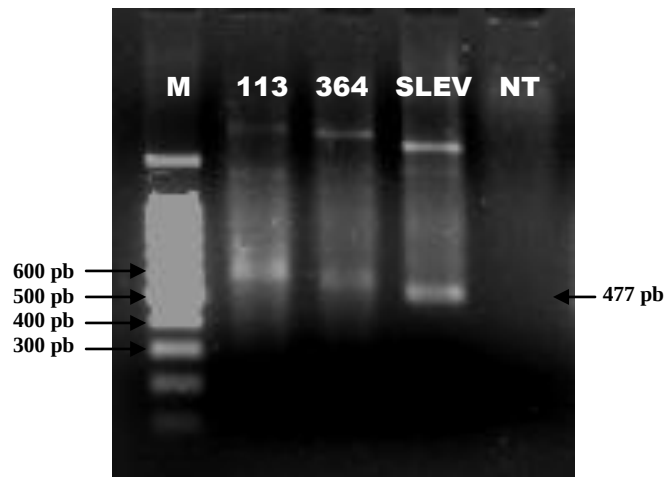


Figura 20. Produtos de Semi-nested RT-PCR para o gene da glicoproteína E do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV).
Legenda- M: marcador de peso molecular (100 pb), amostras #113, #364. Controles utilizados foram: SLEV: BeH 355964 (477 pb) e NT: controle negativo.

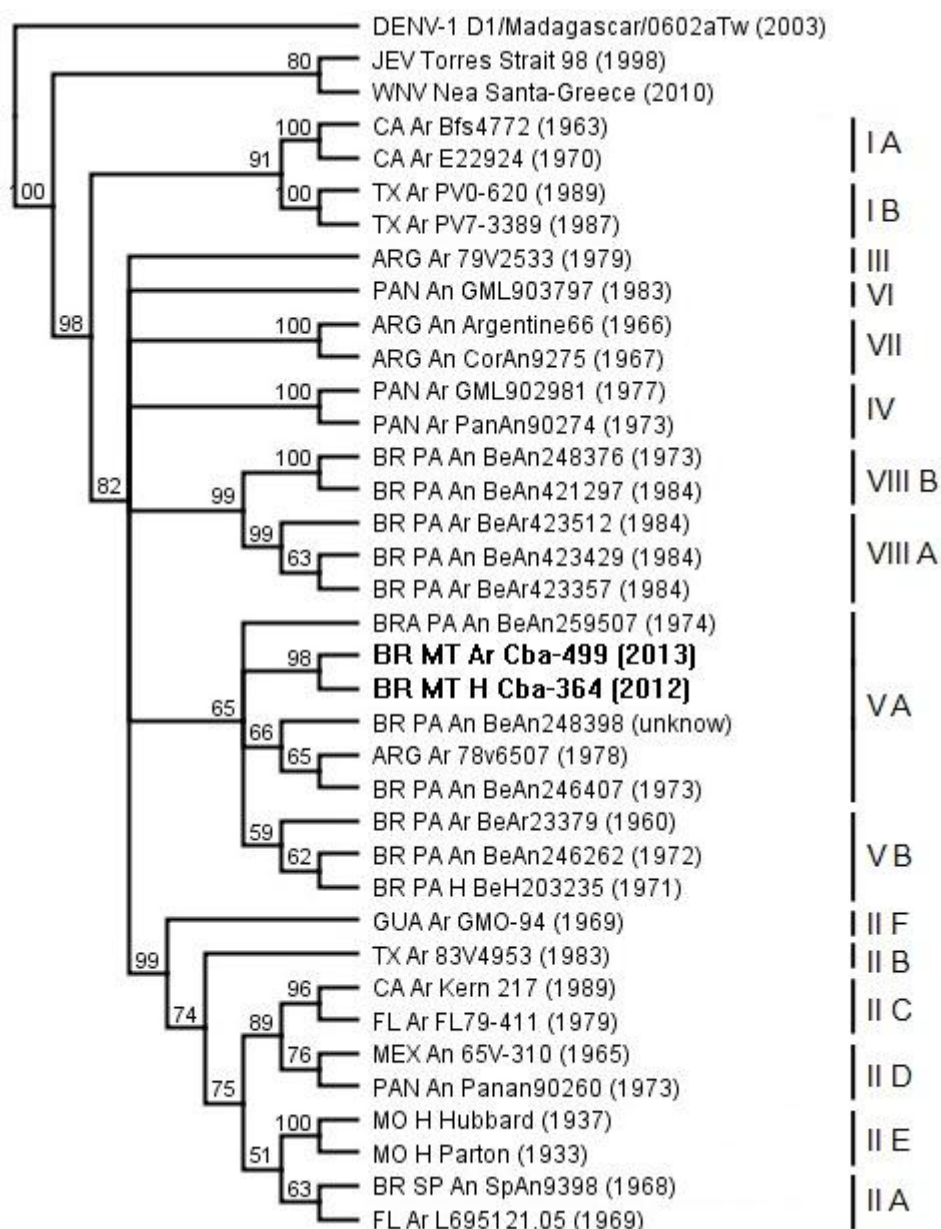


Figura 21. Árvore filogenética de região do gene da glicoproteína E do SLEV BR/MT-CbaH364/2012, identificado neste estudo, e SLEV_BR/MT-CbaAr499/2013, identificado em estudo paralelo (números de acesso: KJ847419 e KJ801827, respectivamente), e amostras de referência de diferentes genótipos de SLEV depositadas no GenBank (NCBI), utilizando o método de *Neighbor-Joining*, modelo de distância de Tamura-Nei e *bootstrap* de 1000 réplicas. As amostras de SLEV identificados em Mato Grosso estão em destaque. Grupos externos incluem vírus da Encefalite Japonesa, West Nile e sorotipo 1 do DENV.

6 DISCUSSÃO

As arboviroses são importantes causas de morbimortalidade mundialmente. A frequência e distribuição de diferentes arboviroses entre pacientes com doença febril aguda é pouco compreendida em MT (KUNIHOLM et al., 2006). Este estudo foi desenvolvido para investigar a ocorrência de infecções por flavivírus circulantes no Brasil em pacientes com doença febril aguda entre 2011 e 2012 em MT.

Entre outubro de 2011 e julho de 2012, observou-se que a maioria dos casos de dengue confirmados foi causada pelo DENV-4 seguido pelo DENV-1. Estes dados corroboram os achados da Secretaria Estadual de Saúde, que relatou a circulação de DENV-1 e a introdução do DENV-4 durante a epidemia de dengue em MT em 2012 (SES-MT, 2013). Contudo, duas amostras de pacientes de Cuiabá sem histórico de viagem recente foram positivas para o DENV-2 e DENV-3, indicando que, embora em menor proporção, estes sorotipos também circularam no estado neste período.

A coexistência dos quatro sorotipos do DENV em áreas endêmicas com epidemias subsequentes denomina-se estado de hiperendemicidade (OKI & YAMAMOTO, 2012). Este cenário já foi descrito anteriormente em Porto Rico em 2002, na Índia e Nepal em 2008 e em Manaus e no Rio de Janeiro em 2011 (RIGAU-PÉREZ et al., 2002; BHARAJ et al., 2008; MALLA et al., 2008; NOGUEIRA & EPPINGHAUS, 2011; BASTOS et al., 2012). A cidade de Cuiabá apresenta temperatura média de 24 °C durante o ano, podendo variar de 4° a até 42 °C dependendo do mês, com clima tropical e estação chuvosa bem definida, tornando o ambiente favorável à proliferação de mosquitos vetores de arboviroses e, consequentemente, a incidência da doença. O último Levantamento de Índice Rápido do *Ae. aegypti* (LIRAA) de 2012 relatou uma média de infestação larvária em Cuiabá de 3,1, considerado de risco elevado para a transmissão da dengue (SMS, 2013).

A introdução de novos sorotipos do DENV em população totalmente susceptível, aliada à elevada densidade de mosquitos vetores, propiciam a ocorrência de epidemias de grandes proporções em curto espaço de tempo (NEWTON & REITER, 1992; FOCKS et al., 1995; RIGAU-PÉREZ et al., 2002; DE SIMONE et al., 2004). Pacientes positivos para o DENV-4 foram detectados em diversas cidades de MT, incluindo 10 casos de zona rural. Contudo, a maior casuística foi observada em Cuiabá e Várzea Grande, cidades estas mais populosas, onde a epidemia foi mais intensa

durante o período de estudo e que, consequentemente, contribuíram para a maior parcela da amostragem. O DENV-1 foi mais prevalente em cidades do meio-norte do MT, principalmente em mulheres (2/3 dos casos) e somente um paciente reside em zona rural, observando-se menor frequência de positivos para o DENV-4 nesta região.

Após análise estatística, observou-se associação entre infecção por DENV-4, residência em área urbana e histórico de doença febril suspeita de dengue. A dengue é considerada uma infecção prevalentemente urbana, embora ciclos silvestres ocorram na África e Ásia (VASILAKIS et al., 2011). Como a imunidade nas infecções pelo DENV é sorotipo-específica, ocorrendo proteção cruzada aos outros sorotipos por apenas alguns meses após a infecção, é possível que muitas destas infecções tenham sido primárias. Entretanto, apenas estudos sorológicos com pesquisa de IgM e IgG frente aos diferentes sorotipos poderiam confirmar esta hipótese. A não associação entre infecção por DENV-1 e possíveis fatores de risco pode ter ocorrido devido ao baixo número de infectados por esse sorotipo identificado no estudo.

Dentre os positivos para DENV, nove pacientes apresentavam infecções simultâneas por DENV-1 e DENV-4, e um pelo DENV-2 e DENV-4. Co-infecções ou superinfecções são frequentes quando há circulação de diferentes sorotipos principalmente em regiões tropicais (FIGUEIREDO et al., 2011). Fatores de risco para infecções e co-infecções por DENV incluem a virulência do isolado circulante e a densidade de vetores, possibilitando a transmissão de mais de um sorotipo ao hospedeiro (GUZMÁN et al., 1986; BHARAJ et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2011). O primeiro relato de co-infecção por dois sorotipos de DENV ocorreu em Porto Rico, 1982. Co-infecções por mais de um sorotipo podem ocorrer naturalmente, já foram descritas entre DENV-1 e DENV-3, DENV-2 e DENV-3, DENV-1 e DENV-4 e de DENV-3 com DENV-4. Estas co-infecções não são necessariamente acompanhadas de sintomas e sinais mais graves (GUBLER et al., 1985; LAILLE et al., 1991; WANG et al., 2003; ARAÚJO et al., 2006; BHARAJ et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2011; BASTOS et al., 2012; PONGSIRI et al., 2012; COLOMBO et al., 2013). No Brasil, co-infecções entre os sorotipos 1 e 4 foram relatadas em São José do Rio Preto (COLOMBO et al., 2013) e Manaus (BASTOS et al., 2012).

A maior incidência na faixa etária de 20 a 39 anos, que contribuiu com a maioria da amostragem, pode ser atribuída à recente introdução do DENV-4 no estado, responsável por 95,2 % das infecções, tendo em vista a ausência de circulação desse

sorotipo no país entre 1981 e 2008, permitindo que grande parcela da população jovem e adulta permanecesse soronegativa e susceptível à infecção (FIGUEIREDO et al., 2008). Entre 2007 e 2008, crianças entre cinco e 14 anos e jovens entre 15 e 19 anos constituíram-se nas faixas etárias com maior incidência de Dengue em Cuiabá. Contudo, os sorotipos do DENV prevalentes no estado nestes anos são desconhecidos (SOUZA & BARATA, 2012). Outros estudos também encontraram faixa etária semelhante (20 a 30 anos) como a mais acometida pelo DENV durante epidemias (SCANDAR et al., 2003; GUPTA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006; BHARAJ et al., 2008; TERZIAN, 2008; POUDEL et al., 2012). Há descrições de algumas notificações por DENV-1/DENV-2 em 1990 em MT (BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

No presente estudo as faixas etárias de menores de cinco anos e maiores que 59, consideradas mais propensas a formas clínicas mais graves de dengue, não apresentaram números absolutos significativos para manifestações hemorrágicas. Porém, estas manifestações geralmente ocorrem tardiamente durante o curso da infecção, tendo em vista que os dados obtidos neste estudo referem-se ao início da infecção (1-5 dias de apresentação de sintomas). Apesar do reduzido número de amostras de crianças menores que cinco anos testadas, na análise dos pacientes com mesma faixa etária, foi observada maior frequência de sinais hemorrágicos neste grupo etário, semelhante aos relatos no Sudeste Asiático e Norte do Brasil (KITIGUL et al., 2007; ROCHA & TAUIL, 2009).

Dentre os pacientes estudados, três apresentaram co-infecção pelo SLEV e DENV-4, provenientes de Cuiabá e Várzea Grande, sendo um deles positivo ainda para o DENV-1. O SLEV encontra-se amplamente distribuído nas Américas, do Canadá à Argentina, porém os relatos de infecção clínica são mais frequentes nos EUA (VASCONCELOS et al., 1991; SABATTINI et al., 1998). Estudos relatam 5% de soroprevalência em populações do Norte e Sudeste do Brasil, contudo relatos de doença febril por SLEV no país são escassos (VASCONCELOS et al., 1998) E entre eles, dois pacientes no Pará (PA) (PINHEIRO et al., 1981), um de São Pedro, SP (ROCCO et al., 2005) e seis em São José do Rio Preto, SP, durante epidemia de DENV-3 (MONDINI et al., 2007a). Provavelmente, a escassez de dados em humanos é devido à viremia transiente, visto que estes são hospedeiros finais no ciclo de transmissão, bem como pela grande maioria das infecções ser subclínica ou inaparente (VASCONCELOS et al., 1991; MONDINI et al., 2007b; RODRIGUES et al., 2010a). Dentre os pacientes

positivos para SLEV neste estudo dois são adultos com 47 e 55 anos, idades estas que apresentam maior predisposição aos sintomas, o que pode ter contribuído para a procura de atendimento médico, embora diferenças clínicas com infecções únicas pelo DENV não tenham sido observadas no momento da coleta da amostra.

Em equinos, há isolamento em caso de encefalite em Minas Gerais (MG) (ROSA et al., 2013) e detecção de anticorpos na Bacia Amazônica e Pantanal Sul-mato-grossense, além de um caso na cidade de Juruena-MT (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010a; OMETTO et al., 2013). Isolamento viral também tem sido relatado em artrópodes e aves na Amazônia, demonstrando que o SLEV circula em hospedeiros e vetores no país. Identificação em ave em cidade do interior do MT já ocorreu em 1974 (RODRIGUES et al., 2010b). Aves migratórias se constituem em reservatórios para o vírus e poderia propiciar sua introdução no MT a partir de outros estados, principalmente aquelas envolvidas em rotas migratórias que incluem a região Amazônica e o Pantanal (AUGUSTE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010b). Neste sentido, Cuiabá e Várzea Grande são próximas da região pantaneira do estado e, mosquitos do gênero *Culex*, vetores de SLEV, são abundantes nestas cidades.

A análise filogenética de sequência parcial do gene da glicoproteína de envelope (E) indica que os isolados identificados em pacientes da região metropolitana de Cuiabá são inseridos em um *cluster* pertencente ao genótipo V, subgenótipo A, frequentemente relatado em amostras da Bacia Amazônica, no PA (KRAMER & CHANDLER, 2001; BAILLIE et al., 2008; TERZIAN, 2008; AUGUSTE et al., 2009; ROSA et al., 2013). A árvore filogenética demonstra que a amostra de MT possui um ancestral comum com amostras do Pará e Argentina, pertencentes ao genótipo V nível de confiança de 51,6 %. No entanto há maior grau de similaridade com o isolado BRA-74C de aves domésticas de Altamira-PA, formando um *cluster*. Amostras de animais de Belém (BRA-U e BRA-73B) e de mosquitos *Culex pipiens* da Argentina (BRA-ARG78) estão contidas no mesmo subgenótipo.

Os genótipos V e VIII são os mais prevalentes no Brasil e estão amplamente distribuídos na Amazônia Brasileira, especialmente no estado do Pará (PA). O genótipo VIII, que se subdivide em subgenótipos A e B, é frequente na Amazônia. Este genótipo já foi relatado no Pará (VIII A e B), em uma amostra de ave no estado de MT, em 1974, e em equino de MG em 2013 (ambos VIII B) (RODRIGUES et al., 2010b; ROSA et al., 2013). O subgenótipo V A é amplamente distribuído nas Américas, já isolado no Brasil,

Argentina, Peru e Trinidad e Tobago. No Brasil foi detectado em diferentes municípios do Pará e no estado de Rondônia. Já o V B foi relatado no Pará apenas (RODRIGUES et al., 2010b).

Provavelmente, a ocorrência de infecções pelo SLEV em humanos no estado ocorre esporadicamente e, os relatos são pouco frequentes devido ao quadro clínico brando ou inaparente apresentado pela grande maioria dos infectados. A ausência de diagnóstico diferencial, bem como a amostragem deste estudo, que se constitui exclusivamente por pacientes que demandaram a rede pública de serviços de saúde do estado, também pode contribuir para a subnotificação da infecção em MT. Pelos dados obtidos, não é possível inferir se houve maior gravidade na doença apresentada pelos pacientes co-infectados com DENV e SLEV, visto que não houve acompanhamento posterior à coleta das amostras, realizadas com até cinco dias de início dos sintomas. Outros flavivírus pesquisados não foram detectados entre os pacientes com sintomatologia de doença febril aguda incluídos neste estudo. Contudo não é possível inferir que estes não ocorrem no estado em hospedeiros e vetores, tendo em vista os relatos recentes em equinos no Pantanal do MS de anticorpos neutralizantes para ILHV, ROC, CPCV, WNV, inclusive para SLEV (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014).

No presente estudo algumas amostras apresentaram fragmento de DNA compatível com o fragmento amplificado pelo iniciador do YFV porém este resultado pode ser decorrente de amplificações inespecíficas ou amostras verdadeiramente positivas para o YFV. No entanto por ausência de recursos para investigação por sequenciamento nucleotídico ou outras técnicas estes dados não foram apresentados.

Pelos resultados obtidos, observa-se a importância da ampliação do diagnóstico diferencial entre as arboviroses, bem como das estratégias de vigilância entomológica e virológica, visando a prevenção e controle de surtos na iminência de introdução desses agentes na população de MT. Dificuldades relativas ao transporte e refrigeração de amostras a partir de unidades de saúde do interior também têm se constituído em uma limitação para o diagnóstico e vigilância no estado. Estudos adicionais envolvendo outras espécies animais e mosquitos potencialmente vetores do SLEV são necessários para compreender o ciclo de transmissão deste arbovírus em MT.

7 CONCLUSÕES

- Os sorotipos do Dengue 1 e 4 (DENV-1 e DENV-4) foram os arbovírus do gênero *Flavivirus* mais frequentemente identificados no estado de Mato Grosso entre outubro de 2011 e janeiro de 2012 em pacientes com doença febril aguda;
- Os quatro sorotipos do dengue foram identificados no estado, observando-se hiperendemicidade e maior casuística de infecção na cidade de Cuiabá durante o período estudado;
- O SLEV foi detectado em três pacientes de Cuiabá e Várzea Grande co-infectados com o DENV-4, indicando que infecções acidentais esporádicas por este agente ocorrem em humanos na região;
- Foram observadas co-infecções por DENV-1 e DENV-4, DENV-2 e DENV-4, SLEV e DENV-4 e SLEV, DENV-1 e DENV-4 no estado durante o período de estudo;
- Houve associação estatisticamente significativa entre infecção por DENV-4, residir em ambiente urbano e ausência de histórico prévio de doença semelhante;
- A faixa etária com maior incidência de infecções por DENV no período estudado foi entre 20 e 39 anos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, S. et al. DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 10, p. e1002934, 2012.
- ALLISON, S. L. et al. Oligomeric rearrangement of Tick-borne Encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH . **Journal of Virology**, v. 69, n. 2, p. 695–700, 1995.
- ANDERSON, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 229–74, 2003.
- ARAÚJO, F. et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 925–8, 2006.
- ARAÚJO, J. M. G. et al. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. e1784, 2012.
- AUGUSTE, A. J.; PYBUS, O. G.; CARRINGTON, C. V. F. Evolution and dispersal of St. Louis encephalitis virus in the Americas. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 709–15, 2009.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. Estudo experimental sobre a patogenicidade do Vírus Ilhéus em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 73–80, 2010.
- BAILLIE, G. J. et al. Phylogenetic and evolutionary analyses of St. Louis encephalitis virus genomes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 47, n. 2, p. 717–28, 2008.
- BALEOTTI, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian Flavivirus Phylogeny Based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 379–82, 2003.
- BARBA-SPAETH, G. et al. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 9, p. 1179–84, 2005.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil : situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.
- BASTOS, M. DE S. et al. 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. 393–4, 2012.

BATISTA, P. M. et al. Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the State of Mato Grosso do Sul , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 168–73, 2012.

BATISTA, W. C. et al. Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondônia , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 528–530, 2011.

BHARAJ, P. et al. Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi , India. **Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 2008.

BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N.; OLSON, K. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 651–61, 2000.

BOCATO-CHAMELET, E. L.; COIMBRA, T. L. M.; NASSAR, ELZA DA SILVA PEREIRA, L. E. Isolamento do flavivirus Iguape a partir de mosquitos Anopheles (Kerteszia) cruzii em Juquitiba - Estado de Sao Paulo - Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 65–9, 2001.

BRONZONI, R. V. D. M. et al. 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. et al. A prospective study of dengue infections in Bangkok. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 1, p. 172–80, 1988.

CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **Veterinary Research**, v. 35, p. 467–83, 2004.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649–88, 1990.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 866–71, 1997.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418–31, 2006.

COIMBRA, T. L. M. et al. Arthropod- and Rodent-borne viruses Detected in São Paulo State, Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Eds.). **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém - PA: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 168–176.

COLOMBO, T. E. et al. Co-infection of Dengue virus by serotypes 1 and 4 in patient from medium sized city from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 4, p. 275–81, 2013.

CONCEIÇÃO, T. M.; DA POIAN, A. T.; SORGINE, M. H. F. A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2 and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. **Journal of Virological Methods**, v. 163, p. 1–9, 2010.

DAY, J. F. Predicting St. Louis encephalitis virus epidemics: Lessons from Recent, and Not So Recent , Outbreaks. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 111–38, 2001.

DE ALMEIDA, M. et al. Yellow fever outbreak affecting Alouatta populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. **American Journal of Primatology**, v. 74, n. 1, p. 68–76, 2012.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. Dengue : A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 390–8, 2004.

DE SIMONE, T. S. et al. 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, n. 9, p. 553–62, 2004.

ELNIFRO, E. M. et al. Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 559–70, 2000.

ELSHUBER, S. et al. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. **The Journal of General Virology**, v. 84, n. Pt 1, p. 183–91, 2003.

EMBRAPA, - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do arroz de terras altas no Estado de Mato Grosso - Clima**. EMBRAPA. 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/clima.htm>>. Acesso em: 05 ago. 2013.

FELIX, A. C. et al. Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 12, p. 1972–6, 2012.

FIGUEIREDO, R. M. P. DE et al. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 667–9, 2008.

FIGUEIREDO, R. M. P. DE et al. Co-infection of dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 6, p. 321–3, 2011.

FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643–9, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–9, 2007.

FIGUEIREDO, M. L. G. **Identificação de Flavivirus Infectando Culicídeos de 1999 a 2007 no Brasil**. 2010. 23 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FILETTE, M. et al. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 1–15, 2012.

FLORES, E. F.; CARGNELUTTI, J. F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. 2ª. ed. Santa Maria - RS: editoraufsm, 2012. p. 325–65.

FOCKS, D. A. et al. A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 5, p. 489–506, 1995.

FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds.). **Tratado de Infectologia**. São Paulo: [s.n.]. p. 343–56.

FORSHEY, B. M. et al. **Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007**. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2919378&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 ago. 2013.

FULOP, L. et al. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 44, n. 2-3, p. 179–88, 1993.

GIBBONS, R. V; VAUGHN, D. W. Dengue : an escalating problem. **British Medical Journal**, v. 324, p. 1563–6, 2002.

GOMES, G.; CAUSEY, O. R. Bussuquara , a new arthropod-borne virus. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 12, n. 1, p. 103–9, 1962.

GOULD, E. A; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500–9, 2008.

GUBLER, D. J. et al. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 1, p. 170–3, 1985.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330–42, 2002.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 5ª. ed. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1153–252.

GUIRAKHOO, F. et al. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. **The Journal of General Virology**, v. 72 (Pt 6), p. 1323–9, 1991.

GUIRAKHOO, F.; BOLIN, R. A.; ROEHRIG, J. T. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 921–31, 1992.

GUPTA, E. et al. The changing epidemiology of dengue in Delhi, India. **Virology Journal**, v. 3, n. 1, p. 92, 2006.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G.; BRAVO, J. Is sequential infection a risk factor for DHF/DSS? **Arthropod-borne Virus Information Exchange**, p. 172–5, 1986.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estado de Mato Grosso**. IBGE. 2011. <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=mt>>. Acesso em: 30 jul. 2013.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Flaviviridae: Flavivirus. 2012. Disponível em: <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv/fs_flavi.htm>. Acesso em 30 out. 2013

IVERSSON, L. B. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, p. 9–35, 1980.

IVERSSON, L. B.; TIRIBA, A. C. Encefalite por Arbovírus Rocio. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds.). **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 233– 9.

KADING, R. C. et al. Prevalence of antibodies to alphaviruses and flaviviruses in free-ranging game animals and nonhuman primates in the greater Congo basin. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 3, p. 587–99, 2013.

KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses: Including Certain Other Viruses of Vertebrates**. 3rd. ed. San Antonio, Texas: American Society Tropical Medicine and Hygiene, 1985. p. 673–4

KIERMAYR, S. et al. Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. **Journal of Virology**, v. 78, n. 15, p. 8078–84, 2004.

KITTIGUL, L. et al. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 39, n. 2, p. 76–81, 2007.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 138, p. 123–30, 2006.

KOONIN, E. V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. **The Journal of General Virology**, v. 74, p. 733–40, 1993.

KRAMER, L. D.; CHANDLER, L. J. Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. **Archives of Virology**, v. 146, n. 12, p. 2341–55, 2001.

KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 61–81, 2008.

KROSCHEWSKI, H. et al. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. **Virology**, v. 308, n. 1, p. 92–100, 2003.

KUHN, R. Flaviviruses. In: ACHESON, N. H. (Ed.). **Fundamentals of Molecular Virology**. 1^a. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2007. p. 181–90.

KUHN, R. J. **Research Flaviviruses**. Richard J. Kuhn. 2013. Disponível em: <http://bilbo.bio.purdue.edu/~viruswww/Kuhn_home/research.php>. Acesso em: 18 ago. 2013.

KUMARASAMY, V. et al. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. **Singapore Medical Journal**, v. 48, n. 7, p. 669–73, 2007.

KUNIHOLM, M. H. et al. Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 1078–83, 2006.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 72–83, 1998.

KUNO, G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. In: CHAMBER, T. J.; MONATH, T. P. (Eds.). **Advances in Virus Research**. California, USA: Elsevier, 2003. p. 3–65.

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. **Journal of Medical Virology**, v. 34, n. 1, p. 51–4, 1991.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545–51, 1992.

LIM, S. M. et al. West Nile virus: immunity and pathogenesis. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 811–28, 2011.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 5^a. ed. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1101–52.

LO, M. K.; TILGNER, M.; SHI, P.-Y. Functional Analysis of Mosquito-Borne Flavivirus Conserved Sequence Elements within 3' Untranslated Region of West Nile Virus by Use of a Reporting Replicon That Differentiates between Viral Translation and RNA Replication. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 10004–14, 2003.

LOBIGS, M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 13, p. 6218–22, 1993.

LOBO, J. M. DE A. **Koutango: Under Reported Arboviral Disease in West Africa**. 2012. 127 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - School of Veterinary Medicine - Graduate Faculty of the Louisiana State University, 2012.

LOPES, O. DE S. et al. Isolation of St. Louis encephalitis virus in South Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n. 3, p. 583–5, 1979.

LOPES, O. S. et al. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. **American Journal of Epidemiology**, v. 107, n. 5, p. 444–9, 1978.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 33–40, 2013.

MALAN, A. K. et al. Detection of IgG and IgM to West Nile Virus: Development of an Immunofluorescence Assay. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 119, n. 4, p. 508–15, 2003.

MALLA, S. et al. Identification of all dengue serotypes in Nepal. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1669–70, 2008.

MARTINS, V. E. P. et al. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41386, 2012.

MEDEIROS, D. B. A. **Caracterização Molecular e Relação Filogenética do Genoma Completo dos Arbovírus Bussuquara, Iguape, Ilhéus e Rocio (Família Flaviviridae, Gênero Flavivirus)**. 2009. 219 f. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

MEIRA, R. “Urucubaca” gripe ou dengue? Dengue. **Clínica Médica**, p. 273–85, 1916.

MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–5, 2012.

MONATH, T. Yellow fever. In: MONATH, T. (Ed.). **The Arboviruses: Ecology and Epidemiology**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 139–241.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 40, p. 84–6, 2007.

MONDINI, A. et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 176–8, 2007.

MORELI, M. L. et al. Diagnosis of Oropouche Virus Infection by RT-Nested-PCR. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 139–142, 2002.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2013.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, p. 1–8, 2013.

MORENO, E. S. et al. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 290–6, 2011.

MOURÃO, M. P. G. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42–6, 2012.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.

NATHANSON, N. Epidemiology. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 5^a. ed. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 423–46.

NAVARRO-SANCHEZ, E. et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Reports**, v. 4, n. 7, p. 723–8, 2003.

NEWTON, E. A.; REITER, P. A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 6, p. 709–20, 1992.

NIEDRIG, M. et al. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 12, p. 867–71, 1999.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925–6, 2001.

NOGUEIRA, R. M.; EPPINGHAUS, A. L. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 255–6, 2011.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 253, 1990.

OKI, M.; YAMAMOTO, T. Climate change, population immunity, and hyperendemicity in the transmission threshold of dengue. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e48258, jan. 2012.

OLIVEIRA, A. S. et al. Diagnóstico laboratorial da dengue: Situação atual e perspectivas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 2, p. 125–30, 2011.

OMETTO, T. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723–30, 2013.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 829–833, 2010.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467–74, 2011.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2706, 2014.

PAUVOLID-CORREA, A.; VARELLA, R. B. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 3, p. 463–72, 2008.

PEDRO, A. O dengue em Nictheroy. **Brazil Médico**, v. 1, n. 13, p. 173–7, 1923.

PEPIN, K. M.; LAMBETH, K.; HANLEY, K. A. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. **BioMed Central Microbiology**, v. 8, n. 28, p. 1–10, 2008.

PESSANHA, E. J. M. et al. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 103–5, 2011.

PFEFFER, M. et al. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 6, p. 709–18, 1997.

PFEFFER, M.; DOBLER, G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 35, p. 1–15, 2010.

PHAM, A. M.; LANGLOIS, R. A; TENOEVER, B. R. Replication in cells of hematopoietic origin is necessary for Dengue virus dissemination. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002465, 2012.

PINHEIRO, F. P. Bussuquara Fever. In: BERAN, G. W. (Ed.). **CRC Handbook Series in Zoonosis**. Viral Zoon ed. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 168–71.

PINHEIRO, F. P. et al. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 1, p. 145–8, 1981.

PINHEIRO, F. P. et al. Arboviroses: aspectos clínico-epidemiológicos. In: **Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. I ed. Belém: Fundação SESP, 1986. p. 375–408.

PONGSIRI, P.; THEMBOONLERS, A.; POOVORAWAN, Y. Changing pattern of Dengue virus serotypes in Thailand between 2004 and 2010. **Journal of Health, Population, and Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 366–70, 2012.

POUDEL, A. et al. The burden of dengue infection in some vulnerable regions of Nepal. **Nepal Medical College Journal**, v. 14, n. 2, p. 114–7, 2012.

POWELL, K. E.; BLAKEY, D. L. Concurrent evaluation of epidemic St. Louis encephalitis: are you on the upward or downward side of the curve? **American Journal of Public Health**, v. 72, n. 1, p. 62–4, 1982.

QUARESMA, J. A. S. et al. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Reviews in Medical Virology**, v. 23, n. 5, p. 305–18, 2013.

RIBEIRO, A. F. et al. [Association between dengue incidence and climatic factors]. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 4, p. 671–6, 2006.

RIDPATH, J. F.; BAUERMANN, F. V.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. 2^a. ed. Santa Maria - RS: editoraufsm, 2012. p. 657–89.

RIGAU-PÉREZ, J. et al. Dengue: A Literature Review and Case Study of Travelers from the United States, 1986-1994. **Journal of Travel Medicine**, v. 4, n. 2, p. 65–71, 1997.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 355–62, 2002.

ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281–5, 2005.

ROCCO, I. M. et al. First isolation of dengue 4 in the state of São Paulo, Brazil, 2011. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 49–51, 2012.

ROCHA, L. A.; TAUILL, P. L. Dengue em criança : aspectos clínicos e epidemiológicos , Manaus , Estado do Amazonas , no período de 2006 e 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 18–22, 2009.

RODRIGUES, S. et al. Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul , Brazil : elevated prevalence of antibodies in horses. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 81–86, 2010.

RODRIGUES, S. G. et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **The Journal of General Virology**, v. 91, p. 2420–7, 2010.

RODRIGUES, S. G. et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. Pt 10, p. 2420–7, 2010.

ROEHRIG, J. T.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. D. T. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. **Viral Immunology**, v. 21, n. 2, p. 123–32, 2008.

ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. e2537, 2013.

SABATTINI, M.; AVILÉS, G.; MONATH, T. Historical, epidemiological and ecological aspects of arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.; VASCONCELOS, P.; TRAVASSOS DA ROSA, J. (Eds.). **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém - PA: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 113–34.

SAMUEL, P. P.; TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian Journal Medical Research**, v. 123, p. 615–28, 2006.

SANTOS, C. L. S. DOS et al. Genetic characterization of St. Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 57–63, 2006.

SANTOS, N. S. DE O.; BENATI, F. J. Diagnóstico Laboratorial das Viroses. In: SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. (Eds.). **Introdução a Virologia Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 83–116.

SAXENA, D. et al. Development and evaluation of NS1 specific monoclonal antibody based antigen capture ELISA and its implications in clinical diagnosis of West Nile virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 3, p. 528–34, 2013.

SCANDAR, S. A. S. et al. Inquérito sorológico, após epidemia de Dengue. Paraíso - São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 83–9, 2003.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245–6, 1986.

SERIÉ, C. et al. Studies on yellow fever in Ethiopia. I. Introduction- clinical symptoms of yellow fever. **Bull World Health Organ**, v. 38, n. 6, p. 835–41, 1968.

SES/MT - SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MATO GROSSO. **Estado divulga dados da dengue de 1º de janeiro a 20 de dezembro de 2012**. Disponível em: <<http://www.saude.mt.gov.br/noticia/3278>>. Acesso em: 16 out. 2013.

SHARP, T. W. et al. Dengue fever in U.S. troops during Operation Restore Hope, Somalia, 1992-1993. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 1, p. 89–94, 1995.

SHOPE, R. E. The Discovery of Arbovirus Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 740, p. 138–45, 1994.

SILVA, F. G. et al. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue – São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 8, n. 91, p. 14–26, 2011.

SILVA, J. R. **Pesquisa de infecções por Flavivirus da encefalite de Saint Louis, Rocio, e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral**. 2010. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SIMÕES, M. **Avaliação da acurácia e confiabilidade do teste sorológico de neutralização por redução de placas de lise (micro PRNT) na detecção de anticorpos para o vírus da Febre Amarela**. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

SMITHBURN, K. C. et al. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 20, p. 471–2, 1940.

SMS - Secretaria Municipal de Saúde de Cuiabá. Dengue em Cuiabá em 2012: o alerta para 2013. **Informe da Dengue 2012 - 2013**. 2013.

SOUZA, R. P. DE et al. Dengue Virus Type 4 Phylogenetics in Brazil 2011 : Looking beyond the Veil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. e–14397, 2011.

SOUZA, L. S.; BARATA, R. D. C. B. Diferenciais intraurbanos na distribuição de dengue em Cuiabá, 2007 e 2008 Intra-urbandifferentials in dengue distribution, Cuiabá, 2007-2008. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 4, p. 761–70, 2012.

STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8475–81, 1997.

STORCH, G. Diagnostic Virology. In: KNIPE, P. M.; HOWLEY, D. M. (Eds.). **Fields Virology**. 1^a. ed. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 566–604.

STRAATMANN, A. et al. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (Flaviviridae) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 511–515, 1997.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11030–5, 2004.

TASSANEETRITHEP, B. et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 7, p. 823–9, 2003.

TERZIAN, A. C. B. **Diagnóstico Molecular de Arboviroses Brasileiras em Soros de Pacientes com Doença Febril Aguda**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

THOMAS, S. J. et al. Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 825–33, 2009.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–80, 1994.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Surto de dengue em Boa Vista, Território de Roraima, Brasil. **Boletim Epidemiológico (Rio de Janeiro)**, v. 14, n. 9, p. 93–100, 1982.

TRAVASSOS, J. F. S. et al. Epidemiologia do vírus da Encefalite de Sao Luis na Amazônia. **Revista da FSESP**, v. 25, n. 2, p. 73–80, 1980.

TSAL, T. F. et al. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. **Lancet**, v. 352, n. 9130, p. 767–71, 1998.

TSAL, T. F.; MITCHELL, C. J. St. Louis Encephalitis. In: MONATH, T. P. (Ed.). **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. [s.l.] CRC Press, 1988. p. 113–43.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Arboviruses Pathogenic for Man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA

ROSA, J. F. S. (Eds.). **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém - PA: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 72–99.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Arboviroses. In: FOCACCIA, R.; VERONESI, R. (Eds.). **Tratado de Infectologia**. São Paulo - SP: Atheneu, 2005. p. 289–302.

VASCONCELOS, P. F. D. C. et al. Epidemiologia das Encefalites por Arbovírus na Amazônia Brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 465–76, 1991.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532–41, 2011.

VASILAKIS, N. **First New Dengue Virus Type in 50 Years**. Science. 2013. Disponível em: <<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>>. Acesso em 30 out. 2013.

VENEGAS, E. A. et al. Ilheus Virus Infection in Human , Bolivia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 516–8, 2012.

WAN, S.-W. et al. Autoimmunity in dengue pathogenesis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 112, n. 1, p. 3–11, 2013.

WANG, W.-K. et al. Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 36, n. 2, p. 89–95, 2003.

WATERMAN, S. H.; GUBLER, D. J. Dengue Fever. **Clinics in Dermatology**, v. 7, p. 117–22, 1989.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–45, 2010.

ZOU, G. et al. Exclusion of West Nile virus superinfection through RNA replication. **Journal of Virology**, v. 83, n. 22, p. 11765–76, 2009.

ANEXO I



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS EM SAÚDE**

Cuiabá, 31 de maio de 2012.

Pelo presente confirmo que fui convidado (a) a participar do projeto de pesquisa *"Investigação da infecção por arbovirus dos gêneros Alphavirus, Flavivirus e Orthobunyavirus em humanos com doença febril no Estado de Mato Grosso, Brasil"*, coordenado pela prof. Dr. Renata Dezengrini Silhessarenko. Este projeto será submetido a editais da FAPEMAT e CNPq para captação de recursos.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita de MSc. Marcelo Adriano Mendes dos Santos, caracterizada por uma letra 'M' grande e estilizada.

MSc. Marcelo Adriano Mendes dos Santos
MT-Laboratório

ANEXO II

SINAN

República Federativa do Brasil
Ministério da SaúdeSISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
FICHA DE INVESTIGAÇÃO DENGUE

Nº

CASO SUSPEITO: pessoa que viva ou tenha viajado nos últimos 14 dias para área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue ou tenha presença de *Ae. aegypti* que apresenta febre, usualmente entre 2 e 7 dias, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações: náuseas, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaleia, dor retroorbital, petéquias ou prova do laço positiva e leucopenia.

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação		2 - Individual		Código (CID10)		3 Data da Notificação	
	2 Agravado/doença		DENGUE		A 90			
	4 UF	5 Município de Notificação				Código (IBGE)		
Notificação Individual	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código				7 Data dos Primeiros Sintomas	
	8 Nome do Paciente						9 Data de Nascimento	
	10 (ou) Idade		11 Sexo		12 Gestante		13 Raça/Cor	
Dados de Residência	17 UF		18 Município de Residência		Código (IBGE)		19 Distrito	
	20 Bairro		21 Logradouro (rua, avenida,...)				Código	
	22 Número		23 Complemento (apto., casa, ...)				24 Geo campo 1	
Dados laboratoriais	25 Geo campo 2		26 Ponto de Referência				27 CEP	
	28 (DDD) Telefone		29 Zona		30 País (se residente fora do Brasil)			
			1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado					
Dados laboratoriais	31 Data da Investigação		32 Ocupação					
	Exame Sorológico (IgM)		Exame NS1					
	33 Data da Coleta		34 Resultado		35 Data da Coleta		36 Resultado	
Conclusão	Isolamento Viral		RT-PCR					
	37 Data da coleta		38 Resultado		39 Data da Coleta		40 Resultado	
	41 Sorotipo		Histopatologia		Imunohistoquímica			
Conclusão	42 Resultado		43 Resultado					
	44 Classificação		45 Critério de Confirmação/Descarte					
	46 O caso é autóctone do município de residência?		47 UF		48 País			
Conclusão	49 Município		Código (IBGE)		50 Distrito		51 Bairro	
	52 Doença Relacionada ao Trabalho		53 Evolução do Caso					
	54 Data do Óbito		55 Data do Encerramento					

Dengue

ANEXO III

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller
Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

**TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA
DE PROJETO DE PESQUISA**

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 100/CEP- HUJM/2011

"COM PENDÊNCIAS"

☐

APROVADO "ad referendum"

☐

APROVAÇÃO FINAL

☒

NÃO APROVADO

☐

O projeto de pesquisa intitulado: "**Diagnóstico molecular e investigação da circulação de arbovírus zoonóticos dos gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthoburnyavirus* no estado de mato Grosso, Brasil,**" encaminhada pelo (a) pesquisador (a) **Renata Dezengrini Shlessarenko** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 19/10/2011 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 19 de Outubro de 2011.



Prof. Dra. Shirley Ferreira Pereira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM