



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**TEREZA CRISTINA DE CARVALHO SOUZA GARCÊS**

**INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EMERGENTES E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE *Dengue virus* CIRCULANTES NO ESTADO DO PIAUÍ**

**PARNAÍBA  
2016**

**TEREZA CRISTINA DE CARVALHO SOUZA GARCÊS**

**INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EMERGENTES E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE *Dengue virus* CIRCULANTES NO ESTADO DO PIAUÍ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Microbiologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Drº. Gustavo Portela Ferreira.

PARNAÍBA  
2016

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

G215i      Garcês, Tereza Cristina de Carvalho Souza  
                Investigação de flavivírus emergentes e caracterização molecular de  
*Dengue virus* circulantes no estado do Piauí [manuscrito] / Tereza  
Cristina de Carvalho Souza Garcês. – 2016.  
                93 f. : il. color.

                Impresso por computador (printout).  
                Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do  
Piauí, 2016.  
                Orientação: Prof. Drº. Gustavo Portela Ferreira

                1. Flavivirus. 2. *Dengue virus*. 3. Sequenciamento. 4. Genótipo. I.  
Título.

CDD: 616.9

TEREZA CRISTINA DE CARVALHO SOUZA GARCÊS

**INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EMERGENTES E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE *Dengue virus* CIRCULANTES NO ESTADO DO PIAUÍ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM 10/03/2016

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr.<sup>o</sup>. Gustavo Portela Ferreira  
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso - PI  
Presidente

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira  
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso - PI  
Membro

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karina Oliveira Drumond  
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso - PI  
Membro

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado  
é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”*

*(Roberto Shinyashiki)*

*À Maria do Socorro de C. S. Garcês e à Lucia Helena de C. Souza,  
minhas duas mães, maior fonte de amor, inspiração e confiança.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o guia da minha vida, por nunca me fazer perder a fé, por ser luz nos momentos de escuridão, pela força durante a minha caminhada e por abençoar as minhas escolhas.

A Nossa Senhora de Fátima, minha mãe santíssima, por sempre passar na frente e resolver tudo àquilo que sou incapaz, por todas as bênçãos alcançadas e pela certeza de que tem reservado o melhor para mim.

À minha mãe, Maria do Socorro de Carvalho Souza Garcês, pelo amor incondicional, carinho, cuidado, pelo exemplo de força e perseverança, por nunca medir esforços para me ver feliz, por motivar meus sonhos e, principalmente, por acreditar na minha capacidade, minha eterna gratidão. Eu te amo mamãe!

À Lucia Helena de Carvalho Souza, uma mulher guerreira, iluminada e abençoada. Minha tia, madrinha e segunda mãe, a melhor pessoa que alguém poderia ter em sua vida. Palavras não descrevem a sua importância e não são suficientes para agradecer pela confiança e por tudo o que faz por mim até hoje, eu devo essa conquista a você. Obrigada por existir!

À minha irmã, Stella Cristina, pelo incentivo diário, pelo apoio, pelo amor e amizade verdadeira. Você sempre vai poder contar comigo.

Ao meu pai, Raimundo Garcês, pelo amor e apoio.

Ao Jean Fiúza, meu companheiro, pelo amor, carinho, respeito, paciência, força, incentivo, por nunca duvidar do meu potencial e por ser minha alegria diária.

A todos os meus familiares, por sempre torcerem pela minha felicidade e, em especial, à Alê e à Rose por terem participado do meu crescimento.

Aos poucos e bons amigos que o tempo e a correria diária não foram capazes de afastar, aos que sempre torceram pelas minhas conquistas, pela minha felicidade e que, de alguma forma, estiveram presentes nos momentos mais importantes da minha caminhada.

A todos do BIOMIC por sempre terem sido atenciosos, pela parceria, amizade, carinho, pelos momentos felizes compartilhados e até mesmo os de angústia. Em especial ao Deuzair Neves, pela amizade sincera e por sempre estar disposto a ajudar. À Iara Gois, por ter sido meu ombro amigo durante todo o mestrado, por enxugar minhas lágrimas, pelos conselhos, pela força e principalmente pela amizade, vou sentir muitas saudades. Ao Thiago Gomes, pela ajuda, disponibilidade e por ser esse exemplo de pessoa. E à Lorena, Naiany, Silveny, Sansara, Mayck, Juana e Rayssa por terem tornado essa caminhada mais leve. Vocês são minha segunda família.

À Vanessa do Vale, minha eterna companheira de laboratório, a quem devo muito do que aprendi, pela amizade incondicional, por sempre ter uma palavra de conforto, por dividir comigo momentos tristes e felizes da minha vida profissional e pessoal.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial a Hianny, Hygor, Augusto e Tâmisa pelo acolhimento, por sempre tentarem ajudar de alguma maneira e por todos os “Blues” doados para eletroforese.

Ao Professor Dr<sup>o</sup>. Gustavo Portela Ferreira, pela oportunidade de ingressar na pesquisa, pela competência, críticas, ensinamentos, confiança, por incentivar o meu crescimento profissional e despertar o desejo de chegar mais longe, eu só tenho a agradecer.

À professora Dr<sup>a</sup>. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira, por ser essa pessoa repleta de luz própria, pela tranquilidade que transmite, pela preocupação, incentivo e pela excelência profissional, que levo como um espelho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Karina Drumond pela competência e disponibilidade de contribuir com esse trabalho.

À direção do Laboratório Central Dr.<sup>o</sup> Costa Alvarenga, Pronto Socorro Municipal de Parnaíba, Laboratório Araújo e Hospital Estadual Dirceu Arcoverde pelas amostras cedidas.

À Karliane de Araújo Lima Uchôa pela disponibilidade, por sempre querer ajudar e ter sido fundamental na obtenção das amostras.

Aos colaboradores de Minas Gerais, em especial ao professor Danilo Bretas e à professora Betânia Drumond, pela colaboração valiosa e imprescindível para a realização desse trabalho.

À coordenação e aos mestres do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, pelo apoio e atenção durante o curso, em especial aos mestres, por repassarem conhecimentos, valores e contribuírem com a nossa formação profissional.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Ciências Biomédicas pela troca mútua de conhecimentos e pelos momentos alegres compartilhados.

A todos os profissionais servidores da UFPI de Parnaíba, por contribuírem com o crescimento cada vez mais expressivo da nossa instituição.

E a todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista, o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	18
<b>2.1 Arbovírus</b> .....	18
<b>2.2 Flavivírus</b> .....	21
2.2.1 Características gerais .....	22
2.2.2 Ciclo de transmissão.....	25
2.2.3 <i>Dengue virus</i> (DENV).....	26
2.2.4 <i>Zika virus</i> (ZIKV).....	31
2.2.5 <i>West Nile virus</i> (WNV) .....	32
2.2.6 <i>Saint louis encefalite virus</i> (SLEV).....	34
<b>2.3 Diagnóstico laboratorial</b> .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	39
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	39
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	40
<b>4.1 Amostras</b> .....	40
<b>4.2 Extração do RNA e Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)</b> .....	41
4.2.1 Transcrição Reversa (RT).....	41
4.2.2 PCR para a região dos genes <i>C/prM</i> .....	42
4.2.3 PCR para o gene <i>E</i> .....	43
4.2.4 PCR para o gene <i>NS5</i> .....	45
<b>4.3 Sequenciamento e Análise Filogenética</b> .....	47
4.3.1 Purificação dos produtos da PCR .....	47
4.3.2 Sequenciamento.....	48
4.3.3 Análise das sequências e filogenética.....	48
4.3.4 Fluxograma.....	49
<b>5 RESULTADOS</b> .....	50
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68

## RESUMO

Os arbovírus são vírus transmitidos por vetores artrópodes e podem infectar seres humanos e animais. Esses vírus constituem um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Produzem diferentes manifestações clínicas, que variam de doença febril a formas graves, incluindo alterações hemorrágicas e neurológicas. Em 2015, nove arbovírus que causam doenças em humanos circularam no Brasil, entre eles destacam-se o *Dengue virus* (DENV), *West Nile virus* (WNV) e *Saint Louis encefalite virus* (SLEV). Recentemente a emergência do *Zika virus* (ZIKV) e *Chikungunya virus* (CHIKV) causando doenças exantemáticas, tem dificultado o diagnóstico laboratorial destes arbovírus. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi detectar através de métodos moleculares os Flavivírus associados a doenças exantemáticas e caracterizar geneticamente os sorotipos do *Dengue virus*, circulantes no estado do Piauí durante o período de 2014-2015. Neste período, foram analisadas 114 amostras de soro e 14 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com suspeita clínica de dengue ou outras arboviroses cedidos por laboratórios públicos e privados, localizados no estado do Piauí. O RNA viral (vRNA) foi extraído e convertido em DNA complementar (cDNA) através da técnica de Transcrição Reversa (RT) com o uso de iniciadores aleatórios. Na amplificação dos produtos foram analisadas três regiões de interesse distintas: os genes *C/prM*, *E* e *NS5*, em seguida quatro amostras de pacientes com sinais e sintomas de gravidade foram purificadas e sequenciadas pelo método de Sanger (1977), sendo que as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas quanto ao grau de identidade com sequências depositadas no GenBank. Uma árvore filogenética foi construída através do programa Mega v.6.0, por análise de Máxima Verossimilhança a partir do gene *E*, que possui altas taxas de recombinação, resultando no surgimento de variantes a partir de genótipos e linhagens, que podem estar associados ao desenvolvimento de formas graves e análises dessa região permitem acompanhar a evolução viral. O gene *NS5* consiste em uma região altamente conservada entre os Flavivírus, o que permite monitorar a sua inserção em determinada região geográfica. Das amostras analisadas por RT-PCR, 22 amostras de soro foram positivas e as do líquido cefalorraquidiano (LCR) não amplificaram. Este estudo identificou a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 no Piauí, o que reflete a situação de hiperendemicidade no estado. Análises filogenéticas do DENV-1 confirmaram a circulação do genótipo V, que é o único descrito no Brasil até o momento e encontra-se distribuído nas Américas, África ocidental e Ásia. Estas análises indicam a detecção de duas linhagens distintas: linhagem 1 (PI-279), que corresponde a isolados da Venezuela, Colômbia e do Brasil e a linhagem 6 (PI-52), que inclui amostras isolada das Ilhas Virgens e a maioria das amostras Brasileiras. Essa relação com países da América Latina reforça a hipótese que estes vírus possam ter sido introduzidos no Brasil através da rota Caribenha, a qual é conhecida como uma importante via de entrada de novos vírus na América do Sul, incluindo o Brasil. A partir da cocirculação dos diferentes arbovírus, entre eles o quatro sorotipos do DENV, o WNV associado à primeira infecção em humanos no país em 2014 e o ZIKV responsável por um surto de doenças exantemáticas no Nordeste Brasileiro em 2015, o nosso grupo de pesquisa padronizou uma RT-PCR para detecção de ZIKV, DENV 1-4 e SLEV a partir de regiões do gene *E* e *NS5*. Estudos complementares baseados no diagnóstico diferencial de arbovírus associados a doenças exantemáticas e caracterização molecular dos Flavivírus circulantes são essenciais para o estabelecimento de medidas preventivas em regiões hiperendêmicas, como o estado do Piauí.

**Palavras-chave:** *Flavivirus*. *Dengue virus*. Sequenciamento. Genótipo.

## ABSTRACT

Arboviruses are viruses transmitted by arthropod vectors and can infect humans and animals. These viruses are a serious public health problem in Brazil and worldwide, resulting in high rates of morbidity and mortality. They produce different clinical manifestations, ranging from febrile illness to severe forms, including hemorrhagic and neurological disorders. In 2015, nine arboviruses that cause disease in humans have been circulating in Brazil, among them stand out from the *Dengue virus* (DENV), *West Nile virus* (WNV) and *Saint Louis virus encephalitis* (SLEV) and recently the emergence of *Zika virus* (ZIKV) and *Chikungunya virus* (CHIKV) causing rash illnesses has hindered the laboratory diagnosis of these arboviruses. The aim of this study is to detect Flavivirus associated with rash diseases by molecular methods and genetically characterize the serotypes of Dengue virus circulating in the state of Piauí during the period 2014-2015. 114 serum samples were analyzed as well as 14 cerebrospinal fluid samples (CSF) of patients with clinical suspicion of dengue or other arboviruses granted by public and private laboratory, located in the state of Piauí. The viral RNA (vRNA) was extracted and converted to cDNA by reverse transcription technique (RT) using random primers. In the amplification products were analyzed three regions of distinct interest: the genes *C/prM*, *E* and *NS5*, then four samples from patients with signs and symptoms of gravity were purified and sequenced by the Sanger method (1977) the sequences obtained were aligned and compared by the degree of identity with sequences deposited in GenBank. A phylogenetic tree was constructed using the Mega v.6.0 software for analysis Maximum Likelihood from the *E* gene, which has high recombination rates, resulting in the emergence of variants from genotype and strains that may be associated with the development of severe disease, and analysis of the region allows the monitoring of viral evolution. The *NS5* gene is a highly conserved region among Flaviviruses, which allows the evaluation of their insertion in a particular geographic region. From the samples analyzed by RT-PCR, 22 serum samples were positive and cerebrospinal fluid (CSF) did not amplify. This study identified the circulation of serotype DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in Piauí, reflecting the hyperendemicity situation in the state. Phylogenetic analyzes of DENV-1 confirmed the circulation of genotype V, which is the one described in Brazil to date and is distributed in the Americas, West Africa and Asia. These analyzes indicate the detection of two distinct lines: line 1 (PI-279), corresponding to isolates from Venezuela, Colombia and Brazil and line 6 (PI-52), including isolated samples of the Virgin Islands and most Brazilian samples. This relation with Latin America reinforces the hypothesis that these viruses may have been introduced in Brazil through the Caribbean route, which is known as an important new virus entry via South America, including Brazil. From the co-circulation of different arboviruses, including the four serotypes of DENV, WNV associated with the first human infection in the country in 2014 and ZIKV responsible for an outbreak of rash in Northeast Brazil in 2015, our research group has standardized one RT-PCR to detect ZIKV, DENV 1-4 and SLEV from E and NS5 regions of the gene. Further studies based on the differential diagnosis of arbovirus associated with rash diseases and molecular characterization of circulating Flavivirus are essential for the establishment of preventive measures in highly endemic areas, such as the state of Piauí.

**Keywords:** *Flavivirus*. *Dengue virus*. Sequencing. Genotype.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Representação do ciclo de vida dos arbovírus. LACV (La crosse virus), DENV (Dengue virus), VEEV (Encefalite equina venezuelana virus), WNV (West Nile virus), SLEV (Saint Louis encefalite virus) (Fonte: Hollidge et al. (2010). Adaptado. ....	19
<b>Figura 2-</b> Estrutura do Dengue virus. Fonte: Nature (2011). Adaptado. ....	22
<b>Figura 3-</b> Organização do genoma do DENV e suas proteínas resultantes. Fonte: Guzmán et al. (2010). ....	23
<b>Figura 4-</b> Ciclo de transmissão do DENV. Fonte: Whitehead (2007). Adaptado. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 5-</b> Risco da dengue global em 2014. Fonte: Guzmán; Harris (2015). Adaptado. ....	276
<b>Figura 6-</b> Comparação entre os métodos diagnósticos diretos e indiretos. Fonte: Peeling et al. (2010). Adaptado. ....	36
<b>Figura 7-</b> Representação dos métodos de diagnóstico para arbovírus e o período adequado para sua realização. Fonte: Maeda; Maeda (2013). Adaptado. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	<b>7</b>
<b>Figura 8-</b> Representação esquemática das etapas realizadas para detecção molecular do DENV, ZIKV e SLEV. ....	508
<b>Figura 9-</b> Representação gráfica dos sorotipos do DENV identificados durante o período de 2014-2015. ....	509
<b>Figura 10-</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do DENV obtido na Semi-nested PCR junto a junção dos genes C/prM, gerando fragmento com comprimento de DENV-1 (453pb), DENV-2 (119pb), DENV-3 (288pb), DENV-4 (394pb). L: marcador de peso molecular. B: branco. ....	50
<b>Figura 11-</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do DENV obtidos na PCR para o gene E, gerando fragmento com comprimento de DENV-1 (972pb), DENV-2 (651pb), DENV-3 (1012pb), DENV-4 (1212pb). L: marcador de peso molecular; B: branco. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figura 12-</b> Representação gráfica da distribuição das amostras positivas quanto ao sexo durante o período de 2014-2015. ....	521
<b>Figura 13-</b> <b>A.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de amplificação do ZIKV obtido na RT-PCR para o gene E, gerando fragmento com comprimento de 364pb. <b>B.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do DENV e SLEV obtido na RT-PCR para o gene NS5, gerando fragmento com comprimento de D1 (472pb), D2 (316pb), D3 (659pb), D4 (222pb) e SLEV (232pb). L: marcador de peso molecular; B: branco. ....	554
<b>Figura 14-</b> Árvore filogenética construída pelo método da Máxima Verossimilhança através do programa MEGA v.6.0, mostrando a identificação do genótipo V para as amostras de DENV 1 identificadas no Piauí (grifadas em vermelho), sendo que a amostra PI-279 corresponde a linhagem 1 e está relacionada com amostras brasileiras, da Venezuela e Colômbia e a PI-52 corresponde a linhagem 6 e está relacionada com amostras brasileiras... ..	576

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Classificação dos diferentes genótipos do DENV, conforme sua distribuição geográfica. Fonte: WEAVER; VASILAKIS, 2009.....	287
<b>Tabela 2-</b> Sequência dos iniciadores descritos por Lanciotti e colaboradores (1992) para amplificação da região de interesse junto aos genes C/prM do DENV, com sua localização e tamanhos do produto da reação de PCR.....	42
<b>Tabela 3-</b> Sequência dos iniciadores para amplificação da região de interesse no gene E do DENV, com seus sorotipos específicos e tamanhos do produto da reação de PCR.....	443
<b>Tabela 4-</b> Sequência dos iniciadores descritos por Faye e colaboradores (2008) para amplificação da região de interesse no gene E do ZIKV e o tamanho do produto após amplificação.....	454
<b>Tabela 5-</b> Sequência dos iniciadores descritos por Chao e colaboradores (2007) para amplificação da região de interesse no gene NS5 dos Flavivirus e o tamanhos dos produtos da reação de PCR. ....	465
<b>Tabela 6-</b> Sequência dos iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005) para amplificação da região de interesse no gene NS5 do DENV 1-4 e SLEV e o tamanho dos produtos da reação de PCR.....	46
<b>Tabela 7-</b> Descrição das amostras clínicas positivas por RT-PCR, quanto a idade, manifestações clínicas, outros testes como IgG, NS1 e sorotipo identificado. NR= não realizado; (+) = positivo; (-) = negativo; NI = não informado; THE = Teresina; PHB = Parnaíba .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADE** Exacerbação dependente de anticorpo (do inglês “*Antibody dependent enhancement*”)
- BIOMIC** Laboratório de Bioquímica e Biologia de Micro-organismos e Plantas
- BSQV** *Bussuquara virus*
- cDNA** DNA complementar
- CDC** Center of Disease Control
- CHIKV** *Chikungunya virus*
- CPCV** *Cacipacore virus*
- DENV** *Dengue virus*
- dNTP** Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- E** Envelope
- ELISA** Teste imunoenzimático (do inglês “*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”)
- FD** Febre do Dengue
- FHD** Febre Hemorrágica do Dengue
- GelRed** Fel corante de ácido nucleico
- HEDA** Hospital Estadual Dirceu Arcoverde
- ICTV** Comissão Internacional de Nomenclatura de Vírus (do inglês “*International Committee on Taxonomy of Viruses*”)
- IFN** Interferon
- IgG** Imunoglobulina G
- IgM** Imunoglobulina M
- ILHV** *Ilheus virus*
- Kb** Kilobases
- LACEN** Laboratório Central Dr.º Costa Alvarenga
- LACV** *La crosse virus*
- MMLV** Transcriptase reversa (do inglês “*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*”)
- nm** Nanômetro
- NS** Proteína não estrutural (do inglês “*Non Structural Protein*”)
- ORF** Janela de fase aberta de leitura (do inglês “*Open Reading frame*”)
- pb** Pares de base
- PCR** Reação em cadeia da polimerase (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”)

**pH** Potencial de hidrogênio

**pM** Picomoles

**prM** Pré-membrana

**RdRp** RNA polimerase dependente de RNA

**ROCV** *Rocio virus*

**RT-PCR** Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (do inglês “*Reverse transcriptase – polymerase chain reaction*”)

**SCD** Síndrome do Choque da Dengue

**SNC** Sistema Nervoso Central

**SLEV** *Saint Louis encefalite virus*

**UTR** Região não traduzida (do inglês “*Untranslated region*”)

**vRNA** RNA viral

**VEEV** Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

**ZIKV** *Zika virus*

**WHO** World Health Organization

**WNV** *West Nile virus*

## 1 INTRODUÇÃO

Arbovírus são vírus mantidos na natureza através de ciclos que envolvem vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados, conforme denominado pela Comissão Internacional de Nomenclatura de Vírus (ICTV) (CASSEB et al., 2014; KARABTSOS, 1985). Os principais arbovírus relacionados à infecções em humanos e animais pertencem a três gêneros: *Flavivirus* (*Dengue virus*, *Zika virus*, *West Nile virus*, *Saint Louis virus*, *Yellow fever virus*, *Japanese encephalitis virus* e *Rocio virus*), *Alfavirus* (*Chikungunya virus* e *Venezuelan equine encephalitis virus*) e *Bunyavirus* (*Oropouche virus*) (CHRISTO, 2015; DASH et al., 2013; FIGUEIREDO, 2007; RUST, 2012; WEAVER, REISEN, 2010). Estes vírus encontram-se distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais, além de circularem entre animais selvagens em regiões temperadas do planeta (LIANG et al., 2015).

Devido a emergência e reemergência dos arbovírus em todo o mundo, as arboviroses são consideradas um sério problema de saúde pública, com uma elevada taxa de mortalidade estimada em 17 milhões de mortes por ano (CHRISTO, 2015; DASH et al., 2013; LOPES et al., 2014). Esse fenômeno está associado a fatores complexos como: recombinação viral e mutação, que favorecem a evolução e adaptação de linhagens virais, a urbanização, aumento do transporte aéreo e do comércio (CHRISTO, 2015; DASH et al., 2013). Além do clima que é um fator determinante na disseminação dos vetores (CHRISTO, 2015; DASH et al., 2013; FIGUEIREDO, 2007).

As infecções causadas por estes vírus podem gerar uma diversidade de sinais e sintomas inespecíficos e a maioria desaparecem espontaneamente após 1-2 semanas (WASAY, 2015). As manifestações clínicas variam de doença febril subclínica ou leve a formas graves, incluindo exantema ou rash maculopapular, hemorragia e alterações do Sistema Nervoso Central (SNC) (encefalite, meningite, meningoencefalite, mielite e acidente vascular cerebral), podendo evoluir para óbito (DASH et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2003; LIANG et al., 2015; LOPES et al., 2014; RUST, 2012).

Normalmente os vírus podem causar infecções sistêmicas, no entanto o envolvimento do SNC é incomum (WHITLEY, GNANN, 2002). Os arbovírus constituem a ameaça infecciosa internacional mais importante para o sistema nervoso humano (RUST, 2012). No Brasil, três importantes flavivírus e um orthobunyavírus destacam-se como causa de infecções do SNC. São eles: *West Nile virus* (WNV), *Saint Louis encefalite virus* (SLEV), *Dengue virus* (DENV) e *Oropouche virus* (OROV) (LOPES, 2014; MONDINI, 2007; SOARES et al.,

2011; BASTOS et al., 2014). Em 2014, o estado do Piauí registrou o primeiro caso de meningoencefalite em humanos associado ao WNV no Brasil (VIEIRA et al., 2015).

Desde o final de 2014, um elevado número de casos de doença exantemática aguda foram relatados em várias regiões do país e isso pode estar relacionado a circulação de novos vírus e aos avanços nos métodos de diagnóstico laboratorial (KEIGLEY et al., 2015). Em abril de 2015, o ZIKV foi identificado como agente etiológico desses casos na cidade de Salvador e a circulação simultânea do DENV e *Chikungunya virus* (CHIKV) também foi registrada (CAMPOS, SARDI, 2015; MUSSO et al., 2015). Recentemente, os surtos causados por ZIKV no Brasil têm sido associados ao aumento significativo de bebês nascidos com microcefalia e alterações neurológicas, constituindo um caráter emergencial de saúde pública global, segundo a Organização Mundial da Saúde (PETERSEN et al., 2016; WHO, 2016).

Diante da diversidade de arbovírus envolvidos nas infecções em seres humanos, do número de doenças febris com exceção da dengue que permanecem sem diagnóstico, da pluralidade de manifestações clínicas e das baixas taxas de identificação dos agentes causadores de infecções do SNC, é importante ressaltar a necessidade da manutenção de um sistema de monitoramento de diagnóstico laboratorial ativo (BALE, 2015; BASTOS et al., 2014; SILVA et al., 2014). Principalmente em pacientes que apresentam manifestações neurológicas e estão localizados em áreas hiperendêmicas, como o Estado do Piauí onde circulam os quatro sorotipos do DENV e outros arbovírus (SANTOS, 2012; VALE, 2015; VIEIRA et al., 2015).

Nesse aspecto, a utilização de métodos moleculares permite o estabelecimento de um diagnóstico rápido, sensível e diferencial para as arboviroses. Além disso, é necessário o monitoramento da introdução e circulação viral, bem como caracterização molecular dos principais *Flavivirus* (DENV, ZIKV, WNV e SLEV) associados a doenças exantemáticas e/ou alterações neurológicas. A finalidade é proporcionar a implantação de programas efetivos na detecção e controle das epidemias, redução dos riscos de transmissão em áreas endêmicas e auxílio no estabelecimento do prognóstico (BASTOS et al., 2014; MENDONZA et al., 2007).

## 2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 Arbovírus

Os arbovírus são vírus transmitidos por vetores artrópodes (mosquitos, carrapatos, percevejos, entre outros) e necessitam deles para completar seu ciclo de replicação (ANDAYI et al., 2014; CALISHER, KARABATSOS, 1988; FIGUEIREDO, 2007; LIANG et al., 2015; LOPES et al., 2014; RUST et al., 2012; TURTLE et al., 2012; WEAVER, REISEN, 2010). Constituem um sério desafio à saúde pública e encontram-se amplamente distribuídos, causando doenças febris em todo o mundo (SILVA et al., 2014; WEAVER, REISEN, 2010). Inicialmente foram identificados em regiões tropicais como África, América do Sul e Ásia (GOULD, SALOMON, 2008).

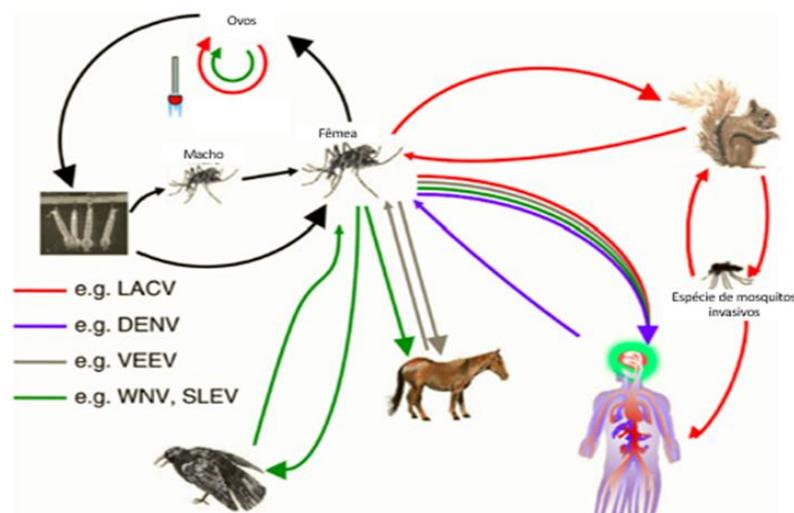
Durante os séculos XVI e XIX o comércio de escravos africanos foi o responsável pela emergência de dois arbovírus, o vírus da Febre amarela (YFV) e o *Dengue virus* (DENV) nos países correspondentes ao Novo Mundo. Desde então, outras arboviroses surgiram a partir dos seus reservatórios silvestres e estão globalmente dispersas (LIANG et al., 2015). Alguns fatores como a urbanização acelerada, alterações climáticas e o índice elevado de infestação vetorial contribuíram para esse fenômeno e levaram ao surgimento de ciclos endêmicos de diversos arbovírus, entre eles o *Dengue virus* (DENV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Zika virus* (ZIKV) (CHRISTO, 2015; DASH et al., 2012; WEAVER, REISEN, 2010).

Desde 1992 foram registradas no Catálogo Internacional de Arbovírus 535 espécies pertencentes a 14 famílias virais, no entanto este número vem aumentando devido aos avanços das técnicas de isolamento e sequenciamento viral (KARABATSOS, 1985; LIANG et al., 2015). Atualmente, estima-se que exista mais de 545 espécies, sendo mais de 150 associadas à doenças em humanos e responsáveis por elevados surtos de infecções emergentes (DASH et al., 2013; CHRISTO, 2015; LOPES et al., 2014).

A maioria das arboviroses que afetam os seres humanos são causadas pelos vírus das famílias *Togaviridae*, *Bunyaviridae* e do gênero *Flavivirus* (ANDAYI et al., 2014; BRONZONI et al., 2005; HANLEY, WEAVER, 2008; HOLLIDGE et al., 2010; WEAVER, REISEN, 2010). Os vírus produzem uma diversidade de manifestações clínicas que variam de doença febril indiferenciada ou moderada à grave, incluindo alterações neurológicas e hemorrágicas (BRONZONI et al., 2005; LOPES et al., 2014; RUST, 2012). Os principais sintomas são: gripe, febre, mal estar, dor de cabeça e garganta, calafrios, cefaleia, mialgia, artralgia, exantema, rash maculopapular, petéquias, entre outros (BALE, 2015; CLETON, 2012; LOPES et al., 2014; HOLLIDGE et al., 2010; RUST, 2012). Enquanto os sintomas

relacionados as infecções do SNC incluem: disfunção visual, anormalidades papilares, convulsões, distúrbios cognitivos e comportamentais, ataxia, níveis alterados de consciência, mielite, paralisia, graus variáveis de meningoencefalite, sonolência e coma profundo (BALE, 2015; RUST, 2012). Estas manifestações variam com a gravidade da infecção, do patógeno viral e do sistema imune do indivíduo (BALE, 2015; WASAY et al., 2015).

O ciclo de transmissão dos arbovírus depende da presença de artrópodes e hospedeiros vertebrados (Figura 1) (ANDAYI et al., 2014; CLETON et al., 2012; GUBLER, 2011). Ao alimentar-se de um animal infectado, durante o repasto sanguíneo, as fêmeas adquirem os vírus e estes replicam-se nas células epiteliais mesenteronais. Após serem liberados dessas células, infectam as glândulas salivares e são transmitidos para o hospedeiro vertebrado através de uma picada (GO et al., 2014; HOLLIDGE, et al. 2010). Entre os principais vetores envolvidos, destacam-se o *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex* e carrapatos (CHRISTO, 2015; KARABTSOS, 1985; LOPES et al., 2014; TURTLE et al., 2012).



**Figura 1.** Representação do ciclo de vida dos arbovírus. LACV (La crosse virus), DENV (Dengue virus), VEEV (Encefalite equina venezuelana virus), WNV (West Nile virus) e SLEV (Saint Louis encefalite virus) (Fonte: Hollidge et al. (2010). Adaptado.

Outra forma de transmissão é a vertical, através da via transovariana, na qual o mosquito fêmea transmite os vírus para sua progênie (FIGUEIREDO, 2007). Além disso, também são transmitidos através do sangue de pacientes virêmicos, o que constitui um dos principais motivos de preocupações no processo de doação de sangue em locais endêmicos (CLETON et al., 2012; LEVI et al., 2015). Em 2012, foi realizado um estudo durante epidemias nas cidades do Rio de Janeiro e Recife para investigar a transmissão do DENV

através de transfusão de sangue, obtendo uma taxa de 37,5%. A partir disso, foi possível concluir que 1% a 2% das doações podem ser positivas no teste para detecção do RNA do vírus durante os períodos de pico da epidemia e que 0,3% a 0,6% de todas as transfusões podem transmitir o DENV (SABINO, et al., 2016).

Em 2015, pelo menos nove arbovírus patogênicos que causam doenças em humanos tem circulado no Brasil (FIGUEIREDO, 2015). Entre eles o SLEV, que é transmitido através da picada de mosquitos *Culex* e desde 1953 tem causado pequenos surtos de doença febril aguda e meningoencefalite, sendo que em 2007 foi registrada a sua primeira epidemia no Brasil, concomitante a um surto de DENV-3. Situação similar foi descrita no estado do Mato Grosso entre 2011 e 2012, cujo três casos de co-infecção entre o DENV e o SLEV foram confirmados (HEINEN et al., 2015; SILVA et al., 2014; VEDOVELLO, 2015). O DENV 1-4 que circula em todo o país, associado a transmissão de doença febril aguda, meningite e outras formas graves, resultando em milhares de mortes anualmente (MURRAY et al., 2013; SOARES et al., 2006). E o WNV que foi introduzido no país na década passada, provavelmente oriundo da América do Norte e tem causado muitas infecções em cavalos. Em 2014, o primeiro caso de meningoencefalite em humanos associado ao WNV foi relatado no Estado do Piauí, localizado na região Nordeste do Brasil (FIGUEIREDO, FIGUEIREDO, 2014; TEIXEIRA et al., 2013; VIEIRA et al., 2015).

Nos últimos dois anos, o *Chikungunya virus* (CHIKV) que pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alfavirus* foram introduzidos em diferentes regiões do Brasil, com genótipos oriundos provavelmente do Caribe e da Ásia (FIGUEIREDO, 2015; BRASIL, 2014). Em 2015, o *Zika virus* (ZIKV) foi responsável por um surto de doença febril aguda no Nordeste Brasileiro, inicialmente no estado da Bahia e disseminando-se rapidamente para outros estados e países da América (CAMPOS, SARDI, 2015; FIGUEIREDO, 2015; WHO, 2016). Acredita-se que a introdução destes vírus esteja relacionada ao movimento de seres humanos, principalmente o turismo e a imigração (FIGUEIREDO, 2015). Outros arbovírus incluindo o *Bussuquara virus* (BSQV), *Ilheus virus* (ILHV) e *Cacipacore virus* (CPCV) também têm sido relatados no país, associados a casos esporádicos de infecções em humanos (BATISTA et al., 2011; NASSAR et al., 1997; SRIHONGSE, JOHNSON, 1971).

Não há nenhum medicamento específico para o tratamento de infecções causadas por arbovírus (RUST, 2012; WASAY et al., 2015). Nos casos de infecções do SNC, são realizados tratamento de suporte como: aumento da pressão intracraniana, manutenção da ventilação, função cardíaca e tratamento das convulsões (WASAY et al., 2015). A melhor estratégia disponível para o controle das arboviroses é a prevenção, através do controle dos

vetores, uso de repelentes, vacinação quando disponível e um monitoramento eficaz da vigilância ambiental, proporcionando uma redução da susceptibilidade do hospedeiro (CHRISTO, 2015; HEINZ, STIAS, 2012; NYRUST, 2012; WITHLEY, GNANN, 2002). Recentemente, a vacina tetravalente contra a dengue desenvolvida pela empresa Sanofi Pasteur, que já havia sido liberada no México e nas Filipinas, foi aprovada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (GUY et al., 2015; NOGUEIRA, 2015).

## 2.2 Flavivírus

O gênero *Flavivirus* pertence à família *Flaviviridae*, é composto por mais de setenta espécies de vírus altamente patogênicos para os seres humanos e animais, transmitidos através de vetores artrópodes (principalmente mosquitos e carrapatos) (GO et al., 2014; GOULD, SOLOMON, 2008; ISHIKAWA et al., 2014; LINDENBACH et al., 2013; MONATH, HEINZ, 1996; PIERSON, DIAMOND, 2012; WEISSENBOCK et al., 2009). Este gênero compreende o *Dengue virus* (DENV 1-4), o *Saint Louis encefalite virus* (SLEV), o *West Nile virus* (WNV), *Bussuquara virus* (BSQV), *Cacipacore virus* (CPCV), *Ilheus virus* (ILHV), *Rocio virus* (ROCV) e o *Febre amarela virus* (YFV) (FIGUEIREDO, 2000; LINDENBACH et al., 2007; MACKENZIE et al., 2004; MUKHOPADHYAY et al., 2005; PIERSON, DIAMOND, 2012; TURTLE et al., 2012).

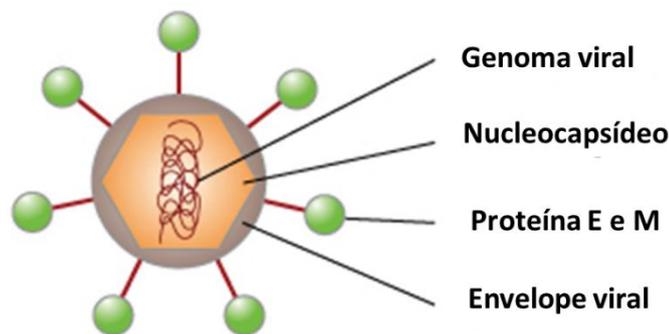
Podem ser classificados em complexos antigênicos e subcomplexos, relacionados a partir da sua genética, etiologia e sorologia (CALISHER, 1998; GO et al., 2014; GOULD, SOLOMON, 2008). Infecções causadas por estes vírus podem ser assintomáticas ou causar doença febril inespecífica (TURTLE et al., 2012). Além de uma série de manifestações, como: febre, exantemas, rash, alterações hemorrágicas, encefalite, meningite, mielite, convulsões, paralisia e icterícia (GOULD, SOLOMON, 2008; ISHIKAWA et al., 2014; SIPS et al., 2012; TURTLE et al., 2012).

No Brasil, além das epidemias de dengue em quase todo o país (TEIXEIRA et al., 2013) e dos surtos esporádicos de febre amarela silvestre, principalmente na Região Norte (CÂMARA et al., 2013), foram encontradas evidências sorológicas de cinco *Flavivirus* de potencial importância médica para humanos: WNV, SLEV, ILHV, CPCV e ROCV em equinos, ovinos e jacarés na região do Pantanal (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014). No Estado do Piauí, a dengue é hiperendêmica com a cocirculação dos quatro sorotipos virais, o que favorece ao desenvolvimento de epidemias e formas graves. O DENV-4 foi identificado em 2012, através de reações moleculares (*Semi-nested* -PCR) realizadas no Laboratório de

Bioquímica e Biologia de Micro-organismos e Plantas (BIOMIC) e posteriormente submetida a análise filogenética para confirmação (SANTOS, 2012; VALE, 2015). Em 2014, o Estado registrou o primeiro caso de infecção em humanos pelo WNV no país (VIEIRA, et al. 2015) e em 2015 o ZIKV foi responsável por um elevado número de casos de doenças exantemáticas em todo o país, principalmente na região Nordeste (CAMPOS, SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015). Diante disso, quatro Flavivírus (DENV, ZIKV, SLEV e WNV) serão amplamente discutidos neste trabalho.

### 2.2.1 Características gerais

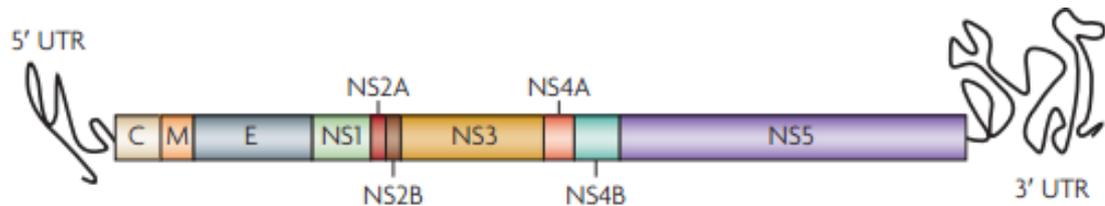
Os *Flavivirus* apresentam genoma RNA de fita simples, senso positivo com aproximadamente 11 Kilobases (kb) e medem de 40 a 60 nanômetro (nm) de diâmetro (FERREIRA et al., 2008).



**Figura 2.** Estrutura do Dengue vírus. Fonte: Nature (2011). Adaptado.

Seu genoma possui uma única fase de leitura aberta (*Open Reading Frame*, ORF) que codifica uma poliproteína, que após a clivagem por uma combinação de proteases do hospedeiro e do vírus é convertida em três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, pré-membrana/membrana (prM/ M) e proteína E do envelope, as quais estão envolvidas na entrada e montagem dos vírus, e são codificadas na porção N-terminal da poliproteína (Figura 2). Além de sete proteínas não-estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 que desempenham funções na regulação e expressão do vírus, como replicação, virulência e patogenicidade, e são codificadas na parte restante da poliproteína (Figura 3) (ALVAREZ et al., 2006; CHAMBERS et al., 1990; CHANG, 1997; FANG et al., 2013; GUBLER et al., 2007; LINDENBACH et al., 2007; LIU et al., 2005; LOPES et al., 2014; MUNOZ-JORDAN et al., 2003; PIERSON, DUMOND, 2012; SANTOS, ROMANOS,

WIGG, 2008; ROTHMAN, 2004). Regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3' desempenham papéis importantes no processo de replicação viral, tradução e montagem do vírus (ALVAREZ et al., 2006; FAGGIONI et al., 2014; LOPES et al., 2014; MARKOFF, 2003; WEAVER, VASILAKIS, 2009; YU et al., 2008).



**Figura 3.** Organização do genoma do DENV e suas proteínas resultantes. Fonte: Guzmán et al. (2010).

A principal proteína estrutural é a do envelope (E), uma glicoproteína incorporada na membrana viral que pesa 55 kDa. Esta proteína é responsável pela ligação ao receptor, fusão da membrana e montagem do vírus. Além disso, é um dos principais antígenos, o que pode induzir a formação de anticorpos neutralizantes e imunidade protetora específica ao hospedeiro (KUHN et al., 2002; MUKHOPADHYAY et al., 2005). Como esta proteína interage diretamente com o sistema imune do hospedeiro, possui a mais alta taxa de mutação entre os *Flavivirus*, resultando no surgimento de variantes genéticas (DETTOGNI et al., 2012; LAI et al., 2008). Ela é composta por três domínios: domínio I, que corresponde a uma estrutura em  $\beta$ -barril orientado paralelamente a membrana viral, domínio II, portador do peptídeo de fusão e o domínio III, que é responsável pela interação com receptores celulares, facilitando a entrada do vírus e possui os epítomos mais importantes na ligação a anticorpos neutralizantes (BEASLEY, BARRETT, 2002; LINDENBACH, RICE, 2007; WEAVER, VASILAKIS, 2009).

A proteína prM é um precursor da glicoproteína estrutural M, devido a adição de hidratos de carbono é essencial para o dobramento correto da proteína E. Este precursor sofre uma clivagem, que está relacionada à maturação do vírus e a sua liberação (HEINZ et al., 1994; LINDEBACH et al., 2003; LINDENBACH, RICE, 2007; LORENZ et al., 2002; PIERSON, DIAMOND, 2012).

A glicoproteína NS1 encontra-se retida no interior ou superfície da células. Possui dois locais de glicosilação que são conservados entre os *Flavivirus* (SCHLESINGER et al., 1987). Sua função ainda é desconhecida, mas acredita-se que ela facilite a infecção e patogênese viral (LIBRATY et al., 2002). Ao contrário das outras glicoproteínas virais, a NS1 não faz

parte da formação do vírus, mas é expressa na superfície das células infectadas. Portanto, trata-se de um importante marcador de infecção aguda e produz forte imunogenicidade (AVIRUTNAN et al., 2010; MALAVIGE et al., 2004; PERERA, KUHN, 2008).

As proteínas NS2A, NS4A e NS4B são as menos caracterizadas, estão associadas com as membranas celulares e descobertas recentes propõe um papel inibitório na transdução de sinal mediada por interferon (IFN) (BACK, LUNDKVIST, 2013; GUZMAN, HARRIS, 2015). As NS3 e NS5 estão localizadas no citoplasma e interagem diretamente entre si (WELSCH et al., 2009; YU et al., 2013). Estas duas proteínas, compõe o complexo de replicação junto com o RNA viral, cofatores virais e cofatores das células hospedeira (MURRAY et al., 2013; PAUL, BARTENSCHLAGER, 2013).

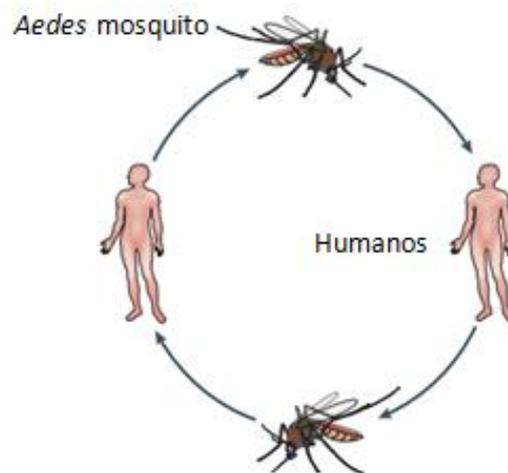
A NS3 é uma serina-protease que requer o cofator NS2B para funcionar como uma enzima ativa (CHAMBERS et al., 1990; LI et al., 2005). E a NS5 é a maior e mais conservada proteína entre os *Flavivirus* (LUO et al., 2015), possui três domínios funcionais: uma metiltransferase na extremidade N-terminal, sequências de localização nuclear e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) na sua extremidade C-terminal (DONG et al., 2012; LI et al., 1999; PERERA, KUHN, 2008; XIE et al., 2011). Atualmente, ambas funcionam como base para o desenvolvimento de fármacos contra os *Flavivirus* (LUO et al., 2015).

O ciclo de replicação dos Flavivírus acontece no citoplasma das células do hospedeiro e a entrada do vírus na célula ocorre por endocitose, mediada por receptores entre eles as lecitinas do tipo C e as famílias TIM e TAM da fostatidilserina (MEERTENS et al., 2012). Após a adsorção, o vírus é endocitado em vesículas recobertas por clatrininas (CHU, NG, 2004). O pH ácido do endossoma induz uma mudança conformacional da proteína E, através da fusão do envelope do vírus com membranas celulares, a qual é responsável pela liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (GOLLINS, PORTERFIELD, 1986; HEINZ et al., 2003; KUHN et al., 2002; MODIS et al., 2004). Assim que o genoma viral é liberado no citoplasma da célula inicia-se o processo de tradução e replicação viral. A primeira etapa da replicação consiste na síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa, a qual servirá de molde para novas fitas de RNA de polaridade positiva e o processo de replicação é finalizado com a montagem de novas partículas virais (BACK, LUNDKVIST, 2013; CLYDE et al., 2006; LINDENBACH et al., 2007; LOPES et al., 2014; SANTOS, ROMANOS, 2008).

### 2.2.2 Ciclo de transmissão

O DENV e o ZIKV são transmitidos aos seres humanos através da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes* (Figura 4) (GUBLER, 1998; PETERSEN et al., 2016; WHO, 2016). Esses mosquitos estão distribuídos ao longo dos trópicos (PETERSEN et al., 2016) e o *Aedes aegypti* é o principal vetor associado à transmissão destes arbovírus, no entanto o *Aedes albopictus* destaca-se na região dos EUA e sul da Europa. Ambos estão associados à transmissão de outras arboviroses importantes como CHIKV (CDC, 2016; MARCONDES et al., 2015; PETERSEN et al., 2016; TERZIAN et al., 2015; WONG et al., 2013).

Estes adquirem o vírus ao realizarem o repasto sanguíneo em indivíduos infectados durante o período de viremia (2 a 10 dias). Ao entrar em contato com o mosquito o vírus passa por um período de incubação de 8 a 12 dias, onde se replica no intestino médio, é carregado pela hemolinfa até atingir outros órgãos e chegar às glândulas salivares. Após esse período o mosquito potencialmente infectante transmite a doença a outros seres humanos, durante o repasto sanguíneo (GUBLER, 1998; MALAVIGE et al., 2004; RIGAU-PÉREZ et al., 1998).



**Figura 4.** Ciclo de transmissão do DENV.  
Fonte: Whitehead (2007). Adaptado.

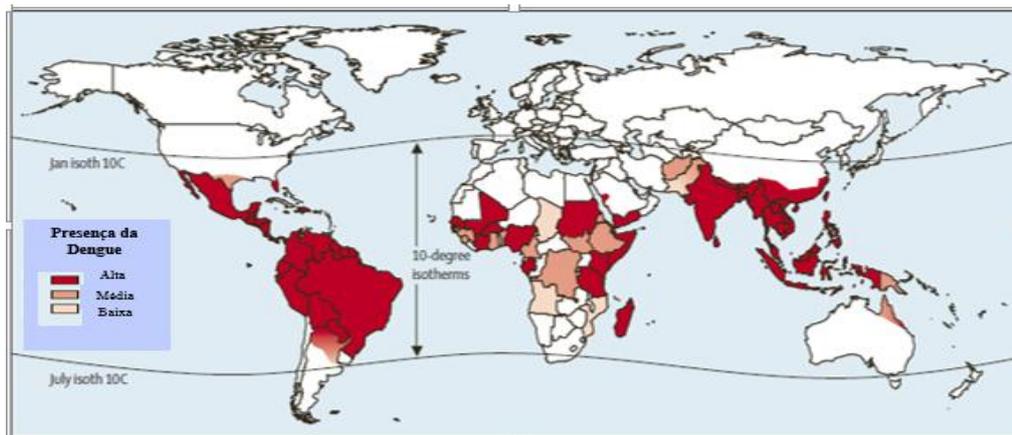
No caso do SLEV, o ciclo biológico é mantido através de aves silvestres (pardal, pombos) que funcionam como hospedeiros vertebrados primários e várias espécies de mosquitos, seres humanos e outros mamíferos são considerados hospedeiros acidentais (Figura 1) (FIGUEIREDO, 2000; MONATH, HEINZ, 1996; REISEN, 2003; SPINSANTI et al., 2008; VASCONCELOS et al., 1998). A infecção nos pássaros ocorre de forma inaparente,

no entanto eles desenvolvem viremia suficiente capaz de infectar os vetores. O principal vetor envolvido é o mosquito do gênero *Culex* e as espécies variam de acordo com a região (AUGUSTE et al., 2009; GO et al., 2014; SILVA et al., 2014). Além disso, acredita-se que as aves migratórias de longas distâncias são responsáveis pela dispersão dos vírus (FIGUEIREDO, 2007; TWIDDY, HOLMES, 2003).

E quanto ao WNV, de acordo com a literatura há descrição de infecção por este vírus em diversos animais, entre eles cães, gatos, ovelhas, esquilos, jacarés, cavalos e aves (BOWEN, 2011; CHANCEY et al., 2015; PETERSEN, HAYES, 2008). O ciclo de transmissão existe em áreas urbanas e rurais, onde o vírus infecta aves, seres humanos, cavalos e outros mamíferos (CDC, 2015; CHÁVEZ et al., 2013; HAMER et al., 2013; PAZ, 2015). O principal vetor envolvido na transmissão do WNV é o mosquito do gênero *Culex* (BLITVICH, 2008). A infecção pelo WNV assim como o SLEV pode não apresentar sintomas clínicos detectáveis ou apresentá-los de forma leve, com isso há um alto risco de transmissão destes vírus por transfusão sanguínea, transplantes de órgãos e leite materno, como descrito em países da América do Norte (CDC, 2002; IWAMOTO et al., 2003; GOULD, SOLOMON, 2008; MONDINI et al., 2007; STRAMER et al., 2005; VAMVAKAS et al., 2006). Os seres humanos e os cavalos são considerados hospedeiros acidentais, como não desenvolvem viremia suficiente para infectar os vetores, não participam do ciclo de transmissão do WNV (CHANCEY et al., 2015; MEULEN et al., 2005).

### 2.2.3 *Dengue virus* (DENV)

Dengue é a doença sistêmica aguda mais prevalente transmitida ao homem (BHATT, 2013). A doença é causada por um dos quatro sorotipos do Dengue virus (DENV 1-4) e espalha-se rapidamente, resultando no aumento da frequência das epidemias, surgimento de formas graves e transmissão autóctone na Europa e EUA (GOULD; SOLOMON, 2008; GUBLER 2002; GUZMAN, HARRIS, 2015). Um quinto sorotipo viral (DENV-5) foi recentemente descrito, detectado durante a triagem de amostras virais no estado de Sarawak da Malásia em 2007 (GRANGE et al., 2014; MUSTAFA et al., 2015; NORMILE, 2013; VASILAKIS, 2013). A doença é endêmica em mais de 100 países, incluindo América, Pacífico Ocidental, África e região do Mediterrâneo Oriental como mostra a figura 5 (GRANGE et al., 2014; GUZMAN, HARRIS, 2015; WHO, 2012).



**Figura 5.** Risco da dengue global em 2014. Fonte: Guzmán; Harris (2015). Adaptado.

Estima-se que 3,6 bilhões de pessoas (55% da população mundial), em centenas de países, estejam sujeitas a contrair a dengue (FARIA et al., 2013; WHO 2009). Nos últimos 50 anos a sua incidência aumentou 30 vezes e de acordo com estimativas feitas pela Organização Mundial de Saúde em 2013 este valor foi três vezes maior quando comparado a 2012 (BHATT, 2013; CHRISTO, 2015; GUZMAN, HARRIS, 2015). Bhatt e colaboradores (2013) apontam que este número possa ser ainda maior, com 390 milhões de infecções ocorrendo por ano, das quais 96 milhões são aparentes. Desta forma a dengue representa um crescente desafio para as autoridades de saúde pública, além de ser considerada um ônus econômico em países endêmicos (BHATT, 2013; SHEPARD et al., 2013).

O DENV consiste em quatro sorotipos geneticamente distintos que compartilham uma homologia de 60-75% ao nível de aminoácido (GUBLER, 1998; GUZMAN, HARRIS, 2015; ROTHMAN, ENNIS, 1999). Cada sorotipo é subdividido em genótipos e linhagens, com base na diversidade genética e distribuição geográfica (ARAÚJO et al., 2009; RICO-HESSE, 1990; RICO-HESSE, 2007; VASILAKIS et al., 2007). Dentro do mesmo sorotipo apresentam diferenças que variam cerca de 3% ao nível de aminoácidos e 6% ao nível de nucleotídeos e são determinantes no estabelecimento de potenciais epidemias, diversidade das manifestações clínicas, virulência, gravidade da doença e desenvolvimento de vacinas (CARNEIRO et al., 2012; CHAO, et al. 2008; GUBLER, 1998; GUZMAN, KOURI, 2002; GUZMAN, HARRIS, 2015; KATZELNICK et al., 2015; MIAGOSTOVICH et al., 2003; OHAINLE et al., 2011; VU et al., 2010; ZHANG et al., 2005).

A variedade dos genótipos foi determinada de acordo com suas sequências nucleotídicas, através da análise das regiões dos genes *M*, *E*, *NS1*. Atualmente são reconhecidos cinco genótipos para o DENV-1 e seis genótipos para o DENV-2 com base na junção *E/NS1* (RICO-HESSE, 1990; GONÇALVEZ et al., 2002; TWIDDY, 2002), quatro

genótipos para DENV-3 com base no sequenciamento dos genes *M/E* (LANCIOTTI et al., 1994) e quatro genótipos para o DENV-4, através da análise do gene *E* (CHEN, VASILAKIS, 2011; LANCIOTTI et al., 1997). A distribuição geográfica dos genótipos do DENV está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação dos diferentes genótipos do DENV, conforme sua distribuição geográfica. Fonte: WEAVER; VASILAKIS, 2009.

SOROTIPO	GENÓTIPO	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China e África Oriental
	II	Tailândia (1950-1960)
	III	Vírus silvestre identificado na Malásia
	IV	Ilhas do Pacífico Ocidental e Austrália
	V	Américas, África Ocidental e alguns vírus da Ásia
DENV-2	Asiático 1	Malásia, Tailândia e Ásia
	Asiático 2	Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do Pacífico e do Oceano Índico, no subcontinente Indiano e em Ilhas do Pacífico
	Americano	América Latina e Caribe (1950-1960), subcontinente Indiano e ilhas do Pacífico
	Asiático/Americano	Tailândia, Vietnã e Américas
	Silvestre	Vírus coletados em humanos, mosquitos ou animais sentinelas na África Ocidental e Sudeste Asiático.
DENV-3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas e ilhas do Pacífico Sul
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Sri Lanka, Índia, África e Samoa
	IV	Porto Rico, América Latina e Central e Taiti
DENV-4	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão
	II	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Tailândia (vírus recentes)
	IV	Malásia (vírus silvestres)

Segundo WEAVER, VASILAKIS (2009) existem evidências de que alguns genótipos são mais virulentos que outros, pois frequentemente estão associados a manifestações

hemorrágicas. Entre eles, o genótipo asiático do DENV-2 tem demonstrado risco aumentado para hemorragias em infecções secundárias (LEITMEYER et al., 1999; RICO-HESSE et al., 1997). O genótipo I do DENV-4, também foi apontado como mais virulento e com maior potencial de disseminação (PATIL et al., 2012). Acredita-se que isso aconteça pois eles se replicam mais eficientemente em células dendríticas humanas e no vetor *Aedes aegypti*, quando comparado ao genótipo americano (ARMSTRONG, RICO-HESSE, 2001; COLOGNA et al., 2005).

Os quatro sorotipos do DENV produzem um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam desde doença febril aguda autolimitada (FD) a casos de febre hemorrágica (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD), no entanto a maioria são assintomáticas ou subclínicas (WHO 2009; FREDERICKS, FERNANDEZ-SESMA, 2014; GUZMAN et al., 2010; GUZMAN, HARRIS, 2015; NEERAJA et al., 2014; WEAVER, VASILAKIS, 2009). Em 2008 os tipos clássicos de manifestações foram reclassificadas pela OMS, em dengue sem sinal de alerta, com sinal de alerta e dengue severa, sendo esta denominação implantada no Brasil desde janeiro de 2014 (BARNIOL, 2011; CAVALCANTI, 2011; GUZMAN, HARRIS 2015; WAN, 2013; WHO, 2009). Segundo estudos realizados, os resultados obtidos com o novo método são satisfatórios, principalmente na identificação de casos graves, que passou a incluir manifestações neurológicas. Esta nova classificação visa melhorar a triagem e o tratamento adequado (CAROD-ARTRAL et al., 2013; HORSTICK et al., 2012; NARVAEZ et al., 2011; PUCCIONI-SOHLER et al., 2015).

As formas mais brandas caracterizam-se por febre alta, dor de cabeça, mialgia, artralgia, dor retro-orbital, exantema, rash maculopapular e leucopenia. Enquanto as formas mais graves, por complicações hemorrágicas como epistaxe, sangramento gengival e gastrointestinal, hematúria, trombocitopenia e extravasamento do plasma (GUZMAN, KOURI, 2002; GUZMAN et al., 2010). Outras manifestações como miocardiopatia, insuficiência hepática, complicações neuromusculares, encefalopatia e encefalites que antes eram consideradas raras, atualmente tornaram-se comuns (ARAÚJO, 2011; GUZMAN, HARRIS, 2015).

Alterações do SNC têm sido descritas em 4-47% dos casos de pacientes infectados pelo DENV em locais onde a doença é endêmica (ARAÚJO, 2011; CAROD-ARTRAL et al., 2013). Além disso, 0,5-20% dos pacientes internados em hospitais com dengue clássica podem apresentar um quadro clínico neuroinvasivo (CAROD-ARTRAL et al., 2013). Conforme estudo realizado Jackson e colaboradores (2008) na Jamaica, alterações neurológicas anormais são comuns em casos de dengue clássica (JACKSON et al., 2008;

SOARES et al., 2010; WHO, 2009). Evidência do neurotropismo do DENV e o aumento do isolamento do vírus em líquido cefalorraquidiano ou tecido cerebral tem aumentado desde o final da década de 1990 (DOMINGUES et al., 2008; LUM et al., 1996; SOLOMON et al., 2000).

No Brasil, a primeira epidemia descrita ocorreu no estado de Roraima, no início dos anos 80, onde foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (OSANAI, 1983). Somente em 1986, ocorreram epidemias atingindo o Rio de Janeiro e algumas capitais da região Nordeste, sendo identificado o sorotipo DENV-1, em 1990 o DENV-2 e em 2000 o DENV-3 (BRASIL, 2010; NOGUEIRA et al., 1993; NOGUEIRA et al., 2007; SCHATZMAYR et al., 1986). Em julho de 2010, o DENV-4 reemergiu no Estado de Roraima e em 2011 foi detectado pela primeira vez no Estado do Piauí, seguido de casos identificados no Amazonas, Pará, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo (SIQUEIRA JR et al., 2011; PIAUÍ, 2012). Atualmente é possível observar a cocirculação dos quatro sorotipos virais no país, o que constitui um fator de risco para novas epidemias, principalmente após a introdução de um sorotipo em áreas anteriormente não afetadas (ACOSTA et al., 2011; BRASIL, 2005).

A infecção primária por um sorotipo do DENV confere proteção homóloga ao longo da vida e imunidade heteróloga transitória (3-4 meses) (KURANE, ENNIS, 1992; SIMMONS et al., 2012; WHO, 2009). Em áreas onde a dengue é endêmica, infecções heterotípicas sequenciais são comuns e constituem um importante fator de risco para o desenvolvimento de formas graves, através do fenômeno denominado resposta exacerbada dependente de anticorpo (ADE) (HALSTEAD, 1988; HALSTEAD, 2007; GUZMAN et al., 2000; GUZMAN et al., 2010; WHITEHORN et al., 2011). De acordo com esta hipótese, os anticorpos neutralizantes produzidos na infecção primária, facilitam a entrada do vírus nas células, levando ao aumento do número de células infectadas e conseqüentemente dos níveis de viremia (HALSTEAD, 2007; WEAVER, VASILAKIS, 2009; WHITEHORN et al., 2011). Além disso, a idade e fatores genéticos do vírus e do hospedeiro desempenham um papel importante no desenvolvimento de formas graves (GUZMAN, KOURI, 2002; HALSTEAD et al., 2007; RICO-HESSE, 1997).

No Estado do Piauí, a dengue é um problema de saúde pública desde o início dos anos 90, quando os surtos da doença tornaram-se mais frequentes (CASTRO et al., 2003). Ocorre em todas as regiões do estado, com as mais altas taxas de incidência nos municípios localizados ao norte (BRASIL, 2008). A ocorrência de sucessivos surtos de dengue em vários municípios e a cocirculação dos quatro sorotipos favorecem o desenvolvimento de formas graves da doença (PIAUI, 2012).

#### 2.2.4 *Zika virus* (ZIKV)

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em um macaco rhesus na floresta Zika, localizada em Uganda em 1947 (DICK et al., 1952). Em 1954, foi o responsável pelo surto de doenças febris em humanos na África Ocidental, disseminando-se para Indonésia, Micronésia, Tailândia, Filipinas, Polinésia Francesa e Ilha da Páscoa no Oceano Pacífico, onde ocorreu um dos maiores surtos durante o período 2013-2014 (ALERA et al., 2015; BARONTI et al., 2015; BUATHONG et al., 2015; DUFFY et al., 2009; HAYES, 2009; MACNAMARA, 1954; MUSSO et al., 2014; OLSON et al., 1981; TOGNARELLI et al., 2014).

Acredita-se que o ZIKV tenha sido introduzido no Brasil logo após o Campeonato Mundial de Canoas que foi realizado no Rio de Janeiro, em agosto de 2014 e não durante a Copa do Mundo de Futebol, na qual não houve participação de atletas oriundos de países do Pacífico. Outra possibilidade foi a introdução através de viajantes oriundos do Chile (MUSSO et al., 2014; SALVADOR, FUJITA, 2015).

Na América do Sul, o primeiro registro de infecção pelo ZIKV foi relatado no Brasil em maio de 2015 na cidade de Salvador – BA, a partir de isolamento viral em caso suspeito de dengue (CAMPOS, SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015), disseminou-se rapidamente para diversas regiões do território Brasileiro, predominando na região Nordeste e outros 26 países americanos (BRASIL, 2015; CALVET et al., 2016; CDC, 2015; GINIER et al., 2016; PETERSEN et al., 2016; ZANLUCA et al., 2015). Nos EUA em 2015 e 2016, aproximadamente oito turistas foram positivos para o ZIKV (CDC, 2016) e a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) emitiu um alerta sobre o potencial risco de transmissão desse vírus no nordeste do Brasil (OPAS, 2015).

Recentemente, este surto tem sido associado ao aumento do número de bebês nascidos com microcefalia e outras alterações neurológicas (BRASIL, 2015; CALVET et al., 2016; WHO, 2016; PETERSEN et al., 2016). Segundo o último boletim epidemiológico liberado pelo Ministério da Saúde no dia 23 de fevereiro de 2016, os casos suspeitos de microcefalia que estão sob investigação chegam a 4.107 casos em todo o país, desses 583 casos foram confirmados para microcefalia e outras alterações do sistema nervoso em 235 municípios, incluindo o estado do Piauí (BRASIL, 2016).

A transmissão materno-fetal do ZIKV foi documentada durante a gravidez, e o vírus pode ser transmitido da mãe para o feto durante qualquer trimestre da gestação, entretanto estudos sugerem que a transmissão durante o primeiro trimestre eleva o risco de

microcefalia fetal (OLIVEIRA et al., 2016; PETERSEN et al., 2016; SCHULER- FACCINI et al., 2016). O RNA viral do ZIKV foi detectado em várias amostras de tecidos do corpo, incluindo o cérebro de uma criança que foi a óbito no período neonatal, no líquido amniótico de duas gestantes com fetos microcefálicos e em crianças com microcefalia, o que reforça a ligação entre a infecção pelo vírus na gravidez e microcefalia no feto, no entanto mais estudos ainda estão sendo realizados (CALVET et al., 2016; GINIER et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; SCHULER- FACCINI et al., 2016; PETERSEN et al., 2016).

Outras formas de transmissão têm sido sugeridas, como através de relações sexuais, transfusões de sangue e perinatal (BESNARD et al., 2014; FOY et al., 2011; MARANO et al., 2015; MUSSO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016). Como 80% das pessoas infectadas pelo ZIKV são assintomáticas, é necessário reforçar o monitoramento nos bancos de sangue, principalmente em áreas endêmicas para as arboviroses (PETERSEN et al., 2016).

Os primeiros sintomas da infecção desenvolvem-se entre 3 a 12 dias após a picada do mosquito, assim como descrito por outras arboviroses, no entanto o período de incubação do vírus ainda não é conhecido (IOOS et al., 2014; PETERSEN et al., 2016; RUDOLPH et al., 2014). A maioria dos casos são assintomáticos, mas o ZIKV pode causar uma doença leve e em alguns o espectro clínico sobrepõe-se ao de infecções causadas pelo DENV e CHIKV (CDC, 2016; CARDOSO et al., 2015; WHO, 2016). Casos graves são incomuns e na maioria não é necessário hospitalização. As principais manifestações clínicas incluem: febre, dor de cabeça, mal-estar, exantema maculopapular, astenia, conjuntivite, dor muscular e articular. Esses sintomas desaparecem rapidamente e duram cerca de 2 a 7 dias (MUSSO et al., 2014; PETERSEN et al., 2016; WHO, 2016). Além disso, em 2013 durante a epidemia ocorrida na Polinésia Francesa, foram relatadas complicações neurológicas, como a Síndrome de Guillain Barré e recentemente casos associados a esta síndrome também foram descritos no Brasil (BRASIL, 2015; OEHLER et al., 2014; PINTO JUNIOR et al., 2015).

#### 2.2.5 *West Nile virus* (WNV)

O WNV foi isolado pela primeira vez em Uganda, no ano de 1937 (SMITHBURN et al., 1940; GOULD et al., 2003). Inicialmente causou surtos esporádicos na Ásia, África, Oriente Médio e Austrália (GO et al., 2014; HAYES, O'LEARY, 2004; PETERSEN et al., 2013). Em 1999, emergiu em Nova York disseminando-se rapidamente nos EUA, sendo o principal agente envolvido nas causas de encefalite (KILPATRICK, 2011; NASH et al., 2001;

RUIZ et al., 2010; PETERSEN et al., 2004; WEAVER et al., 2004). Desde então, há relatos da sua atividade na Europa Central e países sul-americanos (GOULD, FIKRIG, 2004; MONACO et al., 2010; SILVA et al., 2013). O vírus é classificado sorologicamente, como membro do complexo da encefalite japonesa (PAZ, 2015) e encontra-se distribuído de forma global assim como o DENV ocorrendo principalmente em áreas tropicais e subtropicais do sudeste Asiático, Pacífico e Américas (GO et al., 2014).

De acordo com análises genéticas, observou-se que o WNV possui cinco linhagens com base na sequência de nucleotídeos e filogenia (GO et al., 2014; MANN et al., 2013). As linhagens genéticas 1 e 2 são as principais e podem afetar tanto os seres humanos quanto animais (cavalos) (LANCIOTTI et al., 2002; LONGO, 2014; MANN et al., 2013; PAPA et al., 2013; PETERSEN et al., 2013). A classificação taxonômica e virulência das linhagens 3 e 4 ainda não são claras e a 5 está presente, principalmente, na região da Índia (GO et al., 2014; KRAMER et al., 2008).

As principais manifestações clínicas associadas a infecções por WNV incluem febre, mal-estar, náuseas, dor de cabeça e retro-orbital, artralgia, mialgia, vômitos, diarreia, dor de garganta e linfadenopatia. Outros sintomas como hepatomegalia, esplenomegalia, miocardite, pancreatite e hepatite têm sido descritos em infecções graves (GOULD, SOLOMON, 2008; HAYES et al., 2006; HAYES, O'LEARY, 2004). A maioria das infecções (80%) são subclínicas e desaparecem espontaneamente e a minoria (20%) são caracterizadas por estes sinais clínicos (CDC, 2015; HAYES et al., 2005; MOSTASHARI et al., 2001). Aproximadamente 1% dos pacientes desenvolvem sintomas neurológicos, entre eles encefalite, meningite ou meningoencefalite, sendo mais comuns em idosos ou em pacientes imunodeprimidos (GO et al., 2014; PAPA et al., 2013). A taxa de mortalidade nestes pacientes é de 5 a 10% (GOULD, SOLOMON, 2008).

No Brasil, os primeiros anticorpos neutralizantes para WNV foram detectados em cavalos e aves, na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul (MELANDRI et al., 2012; PAUVÔLID-CORREIA et al., 2011). Além de circular e infectar cavalos na região Centro-Oeste do Brasil, foram encontradas evidências sorológicas do WNV em cavalos na Paraíba (PB), sugerindo a expansão do vírus para regiões do Nordeste Brasileiro (OMETTO et al., 2013; SILVA, 2013). Em 2014, foi registrado o primeiro caso de Febre do Nilo Ocidental em humanos no Brasil, na zona rural do município Aroeiras do Itaim, localizado ao Sul do Estado do Piauí (Nordeste Brasileiro). O paciente apresentou sintomas como: febre, dores de cabeça, rigidez muscular e encefalite. A doença foi confirmada através de testes sorológicos (IH e ELISA) reagentes para o WNV (VIEIRA et al., 2015).

### 2.2.6 *Saint louis encefalite virus* (SLEV)

O SLEV foi isolado inicialmente em 1933 nos Estados Unidos, durante uma grande epidemia em St. Louis, Missouri (SILVA et al., 2014; REISEN, 2003; WEBSTER, FITE, 1933). O vírus é amplamente distribuído nas Américas e ilhas do Caribe, e tem sido detectado em regiões do Canadá até Argentina com vários surtos descritos recentemente (AUGUSTE et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2007; HEINEN et al., 2015; MAIA et al., 2014; REISEN, 2003; ROCCO et al., 2005; SANTOS et al., 2006). O SLEV destaca-se como um dos principais arbovírus responsáveis por infecções na América do Norte, pertence ao complexo do vírus da encefalite japonesa e a taxa de mortalidade varia de 5% a 20% (CALISHER, GOULD, 2003; GUBLER et al., 2007; HEINEN et al., 2015; LOPES et al., 2014; MAIA et al., 2014; REISEN, 2003; RODRIGUES et al., 2010). O SLEV reage de forma cruzada com outros integrantes do gênero, principalmente DENV, WNV e JEV, tornando difícil o diagnóstico sorológico destas infecções (GO et al., 2014; HEINEN et al., 2015; KUNO, 2003).

Infecções causadas por SLEV variam desde uma doença febril leve a encefalite grave que pode ser fatal, inicialmente caracterizada por uma síndrome gripal, seguida de alterações nas meníngeas e sinais neurológicos focais (AUGUSTE et al., 2009; GOULD, SOLOMON, 2008; MAIA et al., 2014; MONDINI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2010). A idade do paciente é um dos fatores associados a gravidade da infecção, sendo os idosos o principal grupo de risco (MONATH, HEINZ, 1996; REISEN, 2003; SPINSANTI et al., 2007; VASCONCELOS et al., 1998). Além disso, alguns fatores como hipertensão, doença aterosclerótica, diabetes e alcoolismo crônico predispõe a infecções graves e fatais (GOULD, SOLOMON, 2008).

No Brasil, a soroprevalência do SLEV na população varia de 3% a 43% (MAIA et al., 2014; PAUVOLID-CORREIA et al., 2010; PAUVOLID-CORREIA et al., 2014). Em 1978, foi registrado o primeiro caso de SLEV em humanos através de diagnóstico sorológico, o qual ocorreu em Belém no Estado do Pará (PINHEIRO et al., 1981). Nos anos seguintes, Vedovello e colaboradores (2015) analisaram a primeira sequência completa de SLEV isolada a partir de humanos no Brasil, cuja amostra original corresponde ao primeiro caso registrado no estado do Pará. Estas análises contribuem para o conhecimento sobre a dispersão do vírus no país e no mundo, fornecendo ferramentas para o estudo de proteínas e sua variabilidade (VEDOVELLO, et al., 2015).

Um percentual de 5% de anticorpos específicos para o SLEV foi detectado em humanos da região Norte e Nordeste do país, no entanto deve se levar em consideração as reações heterotípicas entre os *Flavivirus*, principalmente em locais endêmicos para dengue e de populações imunizadas para febre amarela (LAROQUE et al., 2014; MONDINI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2010; VASCONCELOS et al., 1998). Acredita-se que o SLEV circule nestas áreas, resultando em infecções humanas subclínicas ou inaparentes, acompanhadas por baixos títulos de viremia. Entretanto, o baixo número de casos em humanos também pode ser resultado da subdetecção, devido à ausência de diagnóstico diferencial (HEINEN et al., 2015; MONDINI et al., 2007; VASCONCELOS et al., 1998).

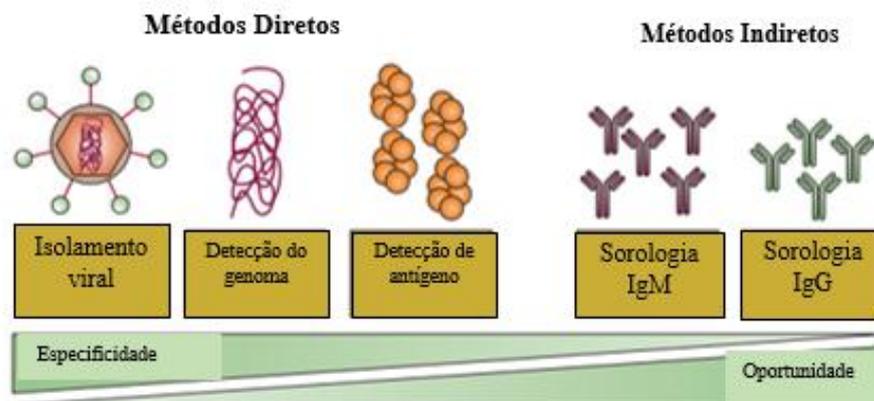
Em 2004, outros casos foram reportados no Estado de São Paulo e diagnosticados por RT-PCR (ROCCO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2010). Em 2006, foi registrado em São José do Rio Preto – SP um surto de doença febril aguda com meningoencefalite e/ou manifestações hemorrágicas, este ocorreu concomitantemente com uma grande epidemia de dengue (MONDINI et al., 2007; TERZIAN et al., 2011) e um caso de co-infecção com o DENV-3 e SLEV foi identificado (MONDINI et al., 2007). O SLEV além de humanos, é capaz de infectar pássaros, mosquitos e marsupiais (FIGUEIREDO, 2000; GO et al., 2014). Recentemente o vírus foi isolado também a partir do cérebro de um cavalo que manifestou sinais de alterações neurológicas, no estado de Minas Gerais (ROSA et al., 2013). Infecções causadas por este vírus provavelmente não são raras no Brasil, mas muitos casos permanecem sem diagnóstico, principalmente devido a semelhança dos sintomas com o DENV (HEINEN et al., 2015; MAIA et al., 2014).

### **2.3 Diagnóstico laboratorial**

Infecções causadas por arbovírus necessitam de um diagnóstico rápido e confiável, a fim de auxiliar no manejo clínico adequado do paciente, diferenciação de outras doenças com sintomatologia semelhante e estabelecimento dos programas de vigilância (DEEN et al., 2006; FOORD et al., 2014; GUZMAN et al., 2010; GUZMAN, HARRIS, 2015; MENDONZA et al., 2007; SANTIAGO et al., 2013; TANG et al., 2012; WHO, 2009). O diagnóstico pode ser realizado utilizando técnicas diretas e indiretas que variam de acordo com a evolução do quadro clínico (MORALES et al., 2006). Os métodos diretos detectam o genoma do vírus e são importantes na identificação da infecção durante a fase aguda. E os métodos indiretos detectam os anticorpos produzidos pelo hospedeiro em resposta ao agente viral e são úteis no

diagnóstico tardio (Figura 6) (LANCIOTTI, 2003; LAUGHLIN et al., 2012; LOW et al., 2011; PEELING et al., 2010; WHO, 2009).

Os métodos sorológicos são os mais utilizados na rotina laboratorial, devido a facilidade quando comparado a técnicas moleculares e de cultura celular (CALISHER, POLAND, 1980; MOURÃO et al., 2015; PAUVÔLID-CORREIA et al., 2014; PEELING et al., 2010; TANG et al., 2012). Uma vez que o isolamento viral a partir do soro ou LCR, em alguns casos é incomum, embora seja considerado como método padrão ouro, possui limitações, principalmente devido a viremia transitória (MOURÃO et al., 2015; SPINSANTI et al., 2008). O método de ELISA é amplamente utilizado no diagnóstico de arboviroses, em amostras de soro e LCR (BASTOS et al., 2014; CASSEB et al., 2014; CDC, 2003; MAIA et al., 2014; MONDINI, 2007; PAPA et al., 2013; SOARES et al., 2006). É um método simples, sensível e de fácil execução, além de possuir uma elevada especificidade (CASSEB et al., 2014; MARTIN et al., 2002), mas como os anticorpos não são detectáveis na fase inicial da doença, a análise de amostras coletadas durante a viremia, podem levar a resultados falso-negativos (MURRAY et al., 2013).



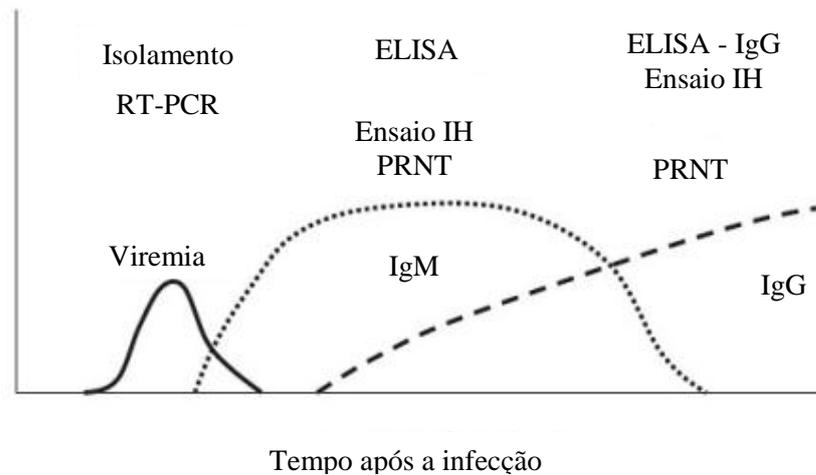
**Figura 6.** Comparação entre os métodos diagnósticos diretos e indiretos. Fonte: Peeling et al. (2010). Adaptado.

A cocirculação de diferentes *Flavivirus* na mesma área geográfica tem dificultado o diagnóstico específico destes vírus, devido às reações cruzadas (CHÁVEZ et al., 2013; GO et al., 2014; MARTIN et al., 2002). Autores sugerem que o domínio III da proteína E pode ser usado como antígenos para diagnóstico sorológico específico de infecções pelos *Flavivirus*. Diante disso, testes sorológicos baseados neste princípio têm sido aplicados no diagnóstico de infecções por WNV (CHÁVEZ et al., 2013) e SLEV (SILVA et al., 2014; FIGUEIREDO, 2014).

Os métodos moleculares detectam o RNA viral e constituem uma técnica rápida, sensível, específica e confiável, amplamente utilizada como método de escolha para o diagnóstico de infecções, durante a fase aguda da doença (FOORD et al., 2014; GUZMAN, HARRIS, 2015; LANCIOTTI et al., 1992; LANCIOTTI et al., 2000; MENDONZA et al., 2007; MOURÃO et al., 2015; SANTIAGO et al., 2013; TANG et al., 2012). O vRNA pode ser extraído a partir de amostras de soro, LCR, sangue, plasma, tecidos, saliva e urina (BASTOS et al., 2014; BARZON et al., 2014; GUZMAN, HARRIS, 2015; LINKE et al., 2007; MENDONZA et al., 2007).

Vários protocolos de RT-PCR têm sido desenvolvidos para detecção de arbovírus, entre eles RT-PCR convencional, RT-PCR em tempo real e PCR multiplex. Esses protocolos, variam quanto ao método de extração do RNA, localização genômica dos iniciadores, especificidade e sensibilidade (BRONZONI et al., 2005; CHIEN et al., 2006; GUZMAN, KOURI, 2002; HUE et al., 2011; JHONSON, et al. 2005; LANCIOTTI, et al. 1992; MORITA, 1994; MUNOZ-JORDAN et al., 2003; PATEL et al., 2013; TANG et al., 2012). Em infecções causadas pelo ZIKV e WNV, o diagnóstico molecular em amostras de soro é limitado, devido ao baixo nível de viremia em pacientes infectados (CARDOSO et al., 2015). Diante disso, amostras de urina e saliva tem se destacado como uma alternativa viável, pois o vírus pode ser excretado por um longo período nesses espécimes clínicos, e eles podem ser testados até três semanas após o início dos sintomas (BESNARD et al., 2014; GOURINAT, 2015; MUSSO et al., 2015; PETERSEN et al., 2015).

Outros métodos também são utilizados, entre eles o teste de inibição de hemaglutinação (IH) que permite testar simultaneamente um grande número de amostras para diferentes arbovírus (RODRIGUES et al., 2010; SPINSANTI et al., 2008). E o teste de neutralização de redução de placa (PRNT), usado na confirmação de infecções específicas por *Flavivirus*, em amostras de soro convalescentes e quando há preocupação com reações cruzadas (Figura 7) (BARZON et al., 2014; CALISHER et al., 1989; JHONSON et al., 2009; KUNO, 2003; LANCIOTTI et al., 2000; MURRAY et al., 2013; RAINWATER-LOVETT et al., 2012; PAPA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2010; SPINSANTI et al., 2008).



**Figura 7.** Representação dos métodos de diagnóstico para arbovírus e o período adequado para sua realização. Fonte: Maeda; Maeda (2013). Adaptado.

Nos casos de infecções do SNC causadas por arbovírus, além dos métodos citados acima, os achados laboratoriais e de imagem são essenciais para o diagnóstico, no entanto estes podem ser inespecíficos no início dos sintomas ou em casos leves. Os principais achados incluem: aumento dos leucócitos, das proteínas e níveis de glicose normais, que podem variar em certas infecções (ARYEE, THWAITES, 2015; WASAY, 2015). Não existe um teste diagnóstico ideal para identificação das arboviroses, a escolha do método depende da finalidade para o qual ele vai ser utilizado (GUZMAN et al., 2004; PEELING et al., 2010). A melhor ferramenta é combinação destes métodos para aumentar a sensibilidade e especificidade (BALE, 2015; LAUGHLIN et al., 2012; LUM, 1996; PUCCIONI-SOHLER et al., 2001; SOARES et al., 2006).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Detectar através de métodos moleculares os Flavivírus associados a doenças exantemáticas e caracterizar geneticamente os sorotipos do *Dengue virus*, circulantes no estado do Piauí durante o período de 2014-2015.

#### 3.2 Objetivos específicos

Identificar os sorotipos do *Dengue virus* através de RT-PCR, utilizando iniciadores específicos para os genes *C/prM* e *E*.

Analisar amostras clínicas de soro e/ou LCR através de RT-PCR, utilizando iniciadores específicos e monitorar a circulação dos Flavivírus (DENV 1-4, SLEV, WNV e ZIKV) na região.

Caracterizar a partir do sequenciamento do gene *E* os *Dengue virus* circulantes e realizar análise da diversidade genética, através de inferências filogenéticas, além de estabelecer os genótipos virais e compará-los com os isolados em outras regiões do país e do mundo.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Amostras

Foram analisadas 114 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue ou outras arboviroses e 14 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com sintomatologia sugestiva de infecções do Sistema Nervoso Central (SNC) e/ou alterações neurológicas, cedidas pelo Laboratório Central Dr<sup>o</sup>. Costa Alvarenga (LACEN), localizado em Teresina-PI, pelo Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA), pelo Pronto Socorro Municipal ou por laboratórios privados da cidade de Parnaíba-PI. As amostras de soro foram coletadas desde o início do ano de 2014 e as de LCR desde o início de 2015. Para a realização desse estudo, foram selecionadas amostras coletadas até o 7<sup>o</sup> dia após o início dos sintomas, período que corresponde a fase aguda da doença.

As amostras de soro e LCR cedidas pelo LACEN foram previamente testadas nos casos de infecções suspeitas de dengue ou por outros arbovírus. Para identificação do DENV, amostras de soro foram submetidas a testes para detecção do antígeno NS1, anticorpos IgM e/ou IgG e isolamento viral. Para detecção de arbovírus foram realizados testes de Inibição de hemaglutinação, isolamento viral, reação em cadeia da polimerase (PCR) e Enzimoimunoensaio (ELISA) nas amostras de soro e LCR. Os resultados foram disponibilizados através do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). As amostras de soro provenientes de Parnaíba, cedidas pelo HEDA também foram previamente testadas para detecção de anticorpos IgM e/ou IgG nos casos suspeitos de dengue, e as fichas clínicas foram obtidas quando disponíveis pelas unidade que cederam as amostras. Para o desenvolvimento dessa pesquisa as amostras de Teresina-PI foram autorizadas de acordo com a *Declaração e autorização de caráter ético e legal*, concedida pelo LACEN. Enquanto as de Parnaíba-PI, o projeto foi aprovado em 24/08/2015 sob o CAAE 46111615000005214/ Parecer 1.197.622.

Os espécimes clínicos oriundos de Teresina-PI foram transportados em gelo seco e junto com as amostras coletadas em Parnaíba-PI foram enviados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia de Micro-organismos e Plantas (BIOMIC) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Após seleção criteriosa, considerando o período da coleta, sintomas e os resultados laboratoriais disponíveis as amostras foram submetidas a análise molecular visando à detecção do genoma viral, sendo armazenadas a – 70°C até o momento da sua utilização.

Com a emergência do ZIKV na região Nordeste do Brasil e sua possível associação com o aumento do número de bebês nascidos com microcefalia, 12 amostras de soro e sangue total da mãe e amostras de LCR dos recém-nascidos, com perímetro cefálico igual ou inferior

a 32 cm, conforme recomendado pela OMS, foram coletados em Hospitais públicos e privados da cidade de Parnaíba. Sendo que em dois casos também foram coletadas as placentas, após o parto. Essas amostras foram armazenadas a -70°C no laboratório BIOMIC para análises posteriores pelo o grupo de pesquisa, a fim de confirmar a relação entre a infecção por ZIKV e a microcefalia nos recém-nascidos na cidade.

#### **4.2 Extração do RNA e Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)**

O RNA viral das amostras de soro e/ou LCR foram extraídos utilizando o QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A RT-PCR permite a detecção do RNA viral e é dividida em duas etapas: Transcrição Reversa (RT), para conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA) por ação da enzima Transcriptase reversa (Promega, Madison, USA) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para amplificação dos fragmentos de interesse por ação da enzima Taq DNA polimerase Ludwig, Biotec).

No presente estudo, foram utilizados protocolos para detecção e tipagem dos sorotipos do DENV, através da análise de três regiões de interesse distintas para amplificação dos produtos: os genes *C/prM*, *E* e *NS5*. Além da padronização de duas RT-PCR, uma para detecção do DENV 1-4 e SLEV, utilizando iniciadores específicos que amplificam a região do gene *NS5* e outra para detecção do ZIKV, amplificando a região pertencente ao gene *E*.

##### **4.2.1 Transcrição Reversa (RT)**

Para a reação da Transcrição Reversa (RT) foram utilizados iniciadores Random Hexamers (*Applied Biosystems*, Foster city, EUA) que correspondem a oligodesoxirribonucleotídeos de sequências curtas e aleatórias [d (N)<sub>6</sub>], que se ligam a qualquer região do RNA e permitem a síntese de cDNA. Para um volume final de 26 µl, a reação ocorreu em duas etapas: na primeira, 10 µl de RNA molde e 5 µl de Random Hexamers (50 µM) (*Applied Biosystems*, Foster City, USA) foram incubados a 25°C por 10 min e 70°C por 5 min; na segunda etapa foram adicionados 5 µl de Tampão da enzima (5X), 5 µl de dNTP (10mM) e 1 µl de MMLV (200U/ µl) incubados a 37°C por 60 min e 85°C por 5 min no termociclador *TProfessional Basic Thermocycler* (Biometra®). No intervalo entre as

duas etapas as amostras foram colocadas no gelo durante 2 min, a fim de evitar a formação de dímeros.

#### 4.2.2 PCR para a região dos genes *C/prM*

Conforme o método descrito por Lanciotti e colaboradores (1992), as amostras de soro e/ou LCR foram submetidas a duas reações de amplificação para identificação do DENV e seus sorotipos: RT-PCR e *Semi-Nested* PCR. Na primeira foram utilizados os iniciadores D1 (*forward*) e D2 (*reverse*) específicos para a região *C/prM*, conservada entre os quatro sorotipos virais, dessa forma amostras positivas amplificam a 511pb independente do sorotipo. Na segunda reação foram utilizados iniciadores sorotipos-específicos: TS1, TS2, TS3 e TS4, possibilitando a identificação individual dos sorotipos. Os iniciadores com sua localização e o tamanho dos seus produtos após a PCR, foram descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência dos iniciadores descritos por Lanciotti e colaboradores (1992) para amplificação da região de interesse junto aos genes *C/prM* do DENV, com sua localização e tamanhos do produto da reação de PCR.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' - 3')	POSIÇÃO	PRODUTOS
<i>C/prM</i>	<i>Forward</i> D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAACCG	134-161	511pb
	<i>Reverse</i> D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644	
	TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482pb
	TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252	119pb
	TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	288pb
	TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527	392pb

Após a reação de Transcrição Reversa (RT) utilizando *Random Hexamers*, foi realizada a reação de PCR. Para um volume final de 25 µl foram adicionados em tubo: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,4µl de dNTPs (10mM), 0,2µl de *Primer forward* – D1 (10 pM/ µl), 0,2µl de *Primer reverse* – D2 (10pm/µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 17,25µl de H<sub>2</sub>O estéril e 3,0µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador TProfessional Basic Thermocycler (Biometra®) e submetidos às etapas de: desnaturação inicial por 5min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 min; 58°C por 1 min; 72°C por 1 min) e de uma extensão final a 72°C por 10 min.

Para identificar os sorotipos virais foi realizada a segunda etapa da reação de amplificação (*Semi-Nested PCR*). Nesta foram utilizados 5 µl da diluição do produto da primeira reação de amplificação (RT-PCR). Nas amostras positivas, foram realizadas uma diluição de 1:20 em água estéril e nas amostras negativas de 1:5. Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 2µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,2µl de dNTPs (10mM), 0,2µl de D1 (10 pM/ µl), 0,2µl de TS1 (10 pM/ µl), 0,2µl de TS2 (10 pM/ µl), 0,2µl de TS3 (10 pM/ µl), 0,2µl de TS4 (10 pM/ µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 13,95µl de H<sub>2</sub>O estéril e 5 µl do template. As reações foram submetidas a 95°C por 3 minutos, com 30 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto; 58°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto), seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 min. As duas reações foram seguidas por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed® para visualização sob luz ultravioleta. Os produtos esperados para amplificação do gene *C/prM*, que corresponde à região flanqueada por cada par de iniciadores foram listados na Tabela 2.

#### 4.2.3 PCR para o gene *E*

Entre os *Flavivirus* o gene *E* é o que possui a mais alta taxa de mutação e para sua amplificação foram utilizados iniciadores sorotipo-específicos para o DENV, desta forma permitem a identificação dos sorotipos em uma única etapa. Os iniciadores utilizados foram listados na Tabela 3 e foram desenvolvidos por Barcelos Figueiredo e colaboradores (2014) e Rocha e colaboradores (2013).

**Tabela 3.** Sequência dos iniciadores para amplificação da região de interesse no gene E do DENV, com seus sorotipos específicos e tamanhos do produto da reação de PCR.

SOROTIPO	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
DENV-1	D13F	AGCCAAAATATCAAACACCAC	972 pb
	D14R	AAAGGTGGTTCTGTCTCAATG	
DENV-2	DEN2 3EF	G TTCACGGGACATCTCAA	651 pb
	DEN2 4ER	GTTCTTTATTTTTCCAGC	
DENV-3	DEN3 1EF	CAATGAGATGTGTGGGAG	1012 pb
	DEN3 2ER	CTTCTTTCTTCAACACAA	
DENV-4	DEN4E-F	TATAGGATCCCGATGCGTAGGAGTAGGAAAC	1212 pb
	DEN4E-R	AGCAAGCTTTTATGTGGACTCAAACATCTTGCC	

Para um volume final de 25 µl foram utilizados: 2,5µl de tampão (10x), 2,0µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de cada um dos iniciadores D13F, D14R, D23EF, D24ER, D31EF, D32ER, D4EF e D4ER (10pM/µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 14,35µl de H<sub>2</sub>O estéril e 3µl de cDNA. Posteriormente, foram incubadas no termociclador TProfessional Basic Thermocycler (Biometra®) e submetidas às seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 5min, 30 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 56°C por 1 min; 72°C por 1:30 min), seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos obtidos para amplificação do gene *E* foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com GelRed®.

Durante a execução desse trabalho também foi realizado no laboratório BIOMIC, da Universidade Federal do Piauí, a padronização da metodologia para o diagnóstico do ZIKV, amplificando a região pertencente ao gene *E*. O sobrenadante de cultura de célula e cDNA do vírus foram usados como controle positivo, cedidos pela Dr.<sup>a</sup> Erna Kroon do Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os iniciadores utilizados para detecção do ZIKV foram desenvolvidos por Faye e colaboradores (2008) e foram listados na tabela 4.

**Tabela 4.** Sequência dos iniciadores descritos por Faye e colaboradores (2008) para amplificação da região de interesse no gene *E* do ZIKV e o tamanho do produto após amplificação.

INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
ZIKVENVF	GCTGGDGCRGACACHGGRCT	364 pb
ZIKVENVR	RTCYACYGCCATYTGGRCTG	

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de ZIKVENVF (10 pM/ µl), 0,3µl de ZIKVENVR (10pm/µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 3µl de cDNA para cada amostra e 16,65µl de H<sub>2</sub>O estéril. Logo depois, as reações foram submetidas a 94°C por 3 minutos, com 45 ciclos de amplificação (94°C por 15 segundos; 57°C por 25 segundos; 72°C por 20 segundos), seguidos ao final a 72°C por 10 min. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com GelRed® e visualizados sob luz ultravioleta.

#### 4.2.4 PCR para o gene *NS5*

A proteína não estrutural *NS5*, possui na sua porção C-terminal o domínio RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que consiste na região mais conservada do genoma dos *Flavivirus* (CHAO et al., 2007). É também altamente conservada entre os quatro sorotipos do DENV (MANEEKAN et al., 2009). Diante disso, foram utilizados dois protocolos: um para detecção de *Flavivirus* e outro para detecção do DENV 1-4 e SLEV, a partir da amplificação dessa região. O segundo protocolo foi padronizado durante a execução desse trabalho e as amostras de cDNA dos vírus usadas como controle positivo, foram cedidas pelo Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para detecção dos *Flavivirus* foram utilizados os iniciadores desenvolvidos por Chao e colaboradores (2007), listados na tabela 5 com suas respectivas sequências e o tamanho do produto após amplificação.

**Tabela 5.** Sequência dos iniciadores descritos por Chao e colaboradores (2007) para amplificação da região de interesse no gene NS5 dos Flavivirus e o tamanhos dos produtos da reação de PCR.

INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' - 3')	PRODUTO
MFU1	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA	270 pb
CFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 2µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,3µl de dNTPs (10mM), 0,1µl de mFU1 (10 pM/ µl), 0,1µl de CFD2 (10pm/µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 5µl de cDNA para cada amostra e 17,25µl de H<sub>2</sub>O estéril. Logo depois, as reações foram submetidas a 94°C por 5 minutos, com 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto; 58°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto), seguidos ao final a 72°C por 10 min. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com GelRed®.

Os iniciadores utilizados para detecção do DENV 1-4 e SLEV foram desenvolvidos por Bronzoni e colaboradores (2005) e estão listados na tabela 6.

**Tabela 6.** Sequência dos iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005) para amplificação da região de interesse no gene NS5 do DENV 1-4 e SLEV e o tamanho dos produtos da reação de PCR.

INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' - 3')	PRODUTO
FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	958 pb
FG2	GTGTCC CATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	
nDEN 1	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472 pb
nDEN 2	GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC	316 pb
nDEN 3	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659 pb
nDEN 4	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222 pb
nSLE	ATT CTT CTC TCA ATC TCC GT	232pb

A reação foi dividida em duas etapas, a primeira consiste no anelamento dos iniciadores FG1 e FG2 na região do gene NS5 dos *Flavivirus* amplificando um produto de aproximadamente 958 pb. Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de *Primer forward* – FG1 (10 pM/ µl), 0,3µl de *Primer reverse* – FG2 (10pm/µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl),

16,95µl de H<sub>2</sub>O estéril e 3,0µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador TProfessional Basic Thermocycler (Biometra®) e submetidos as etapas de: desnaturação inicial por 5min a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação (94°C por 1 min; 58°C por 1 min; 72°C por 2 min) e de uma extensão final a 72°C por 5 min.

Para identificar os sorotipos virais do DENV e SLEV foram realizadas três reações distintas, uma para detecção simultânea do DENV 1, 2 e 3, uma para o DENV-4 e uma para o SLEV. Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de FG1 (10 pM/ µl), 0,3µl de nDEN1 (10 pM/ µl), 0,3µl de nDEN2 (10 pM/ µl), 0,3µl de nDEN3 (10 pM/ µl), 0,3µl de nDEN4 (10 pM/ µl), 0,3 de nSLE (10 pM/ µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 16,85µl de H<sub>2</sub>O estéril e 2,5 µl do produto da primeira reação de amplificação (RT-PCR). As reações foram submetidas a 94°C por 5 minutos, com 25 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto; 53°C por 1 minuto; 72°C por 2 minuto), seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 min. As duas reações foram seguidas por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed® para visualização sob luz ultravioleta. Os produtos esperados para amplificação do gene NS5 do DENV 1-4 e SLEV, que corresponde à região flanqueada por cada par de iniciadores estão listados na Tabela 6.

### 4.3 Sequenciamento e Análise Filogenética

#### 4.3.1 Purificação dos produtos da PCR

A purificação do DNA amplificado a partir do produto da PCR, foi realizado através do método de purificação por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e foram utilizados 45 µL do produto proveniente da PCR, ao qual foram adicionados 11,25 µL de EDTA (125 mM) e 135 µL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada, em seguida centrifugada a 12.000 g por 25 minutos, a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, e o sedimento homogeneizado em 120 µL de etanol 70%. A mistura foi homogeneizada por inversão, em seguida centrifugada a 12.000 g por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. Os tubos foram colocados a 37°C por 20 minutos para o etanol residual evaporar. Ao final, o DNA obtido foi homogeneizado em 10 µL de água de injeção, e armazenado a -20° C.

### 4.3.2 Sequenciamento

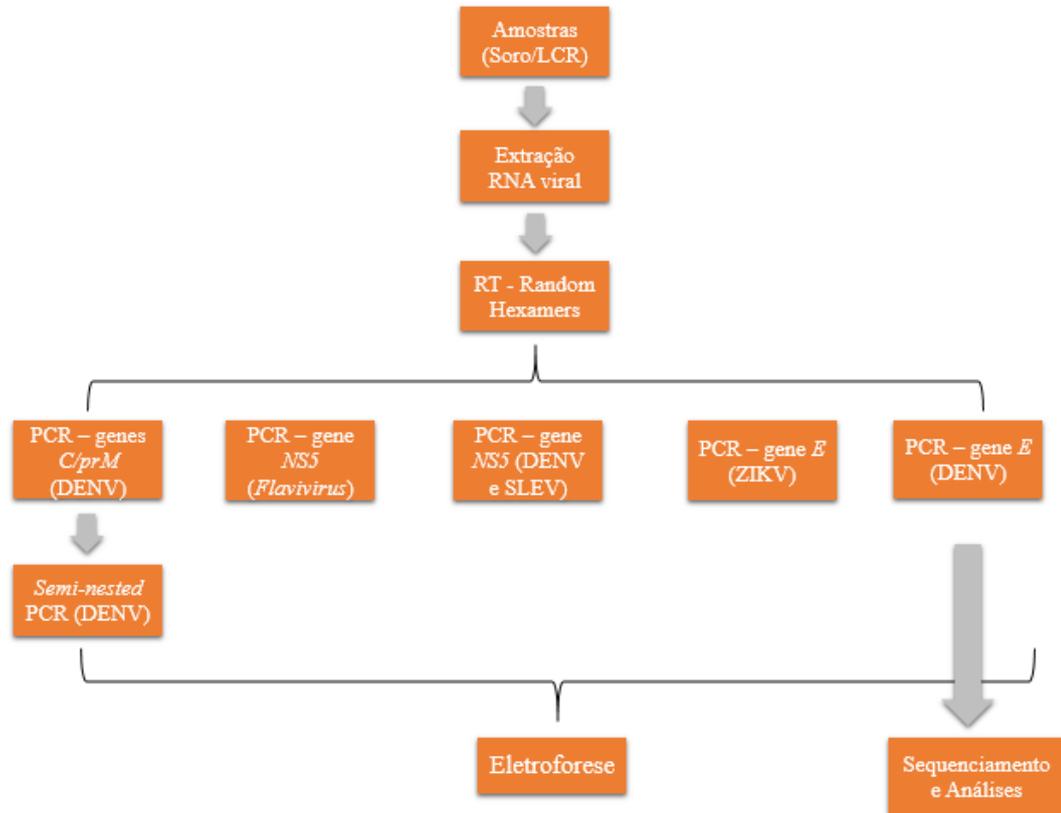
As amostras positivas na PCR foram sequenciadas conforme o método de dideoxi descrito por SANGER e colaboradores (1977). Em sequenciador automático capilar “ABI 3730 DNA Analyzer” (*Applied Biosystems*), usando o kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (*Applied Biosystems*), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Para cada sequência obtida a partir de uma amostra foram feitas duas reações de sequenciamento, uma para o iniciador senso e outra para o anti-senso. Para cada reação foi utilizada uma quantidade adequada de DNA purificado de acordo com o tamanho do fragmento amplificado na PCR, o iniciador na concentração final de 5 µM e água de injeção para completar o volume final da reação. A região que codifica o gene *E* foi o alvo do estudo, esta é descrita como informativa para estudos de filogenia e evolução (ARAÚJO 2009; LANCIOTTI et al., 1994).

### 4.3.3 Análise das sequências e filogenética

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa *Electropherogram quality analysis* Emprapa [<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>]. Paralelamente, elas também foram analisadas no programa *Sequence Scanner Software 2* (*Applied Biosystems* 2012) para garantir a sua qualidade. A sequência consenso foi montada utilizando o programa *CAP3 Sequence Assembly Program* [<http://doua.prabi.fr/software/cap3>]. Ao final, as sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], através da ferramenta *nucleotide BLAST* (nBLAST) do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990) [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

Além disso, as sequências nucleotídicas foram alinhadas usando o *Clustal W* implementado no programa Mega 6.0 (THOMPSON et al., 1994). O modelo de substituição de nucleotídeos Tamura- Nei, com variação gama (TAMURA; NEI, 1993) foi selecionado (usando ferramenta disponível no programa MEGA 6) e usado para reconstrução de árvore filogenética, pelo método de máxima verossimilhança executado pelo programa Mega 6.0. A confiabilidade de agrupamento dos ramos foi testada por análise de 1000 réplicas de bootstrap.

## 4.3.4 Fluxograma

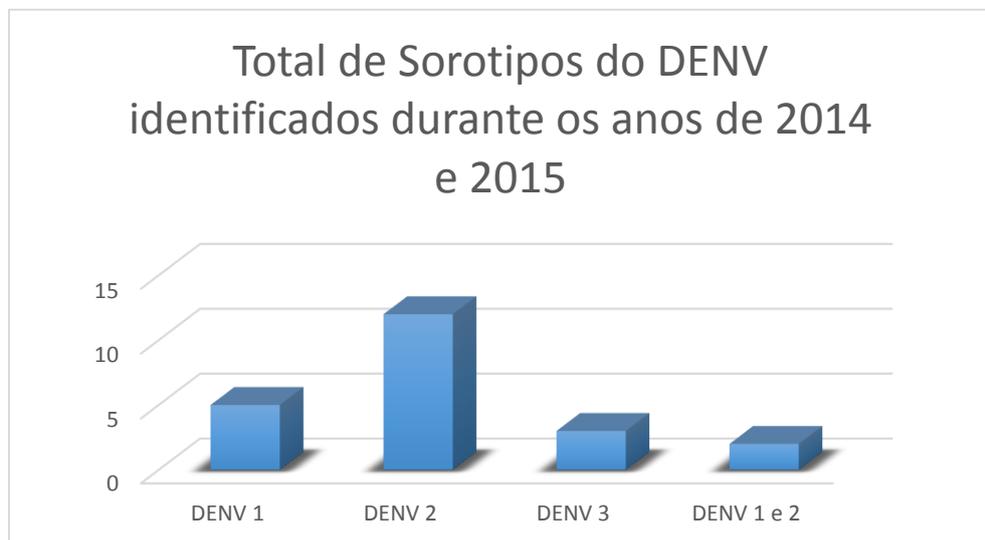


**Figura 8.** Representação esquemática das etapas realizadas para detecção molecular do DENV, ZIKV e SLEV.

## 5 RESULTADOS

Foram analisadas no total 128 amostras, sendo que 114 correspondem a soro e 14 a LCR. A maioria é referente a 2015, pois algumas amostras de 2014 foram desconsideradas desse estudo, devido à falta de armazenamento correto e perda da viabilidade do RNA viral, antes de serem enviadas ao laboratório BIOMIC para análise. Do total das amostras testadas por RT-PCR, 22 amostras de soro (17%) foram positivas e nas amostras de LCR o vRNA não foi detectado. Dentre as amostras positivas, oito (PI-97, PI-532, PI-717, PI-752, PI-753, PI-755, PI-778 e PI-885) correspondem ao soro de pacientes com suspeita clínica de dengue, coletados até o 5º dia após o início dos sintomas, advindos de um hospital público da cidade de Parnaíba, que foram negativos quando testados por métodos sorológicos para detecção de anticorpos IgM/IgG.

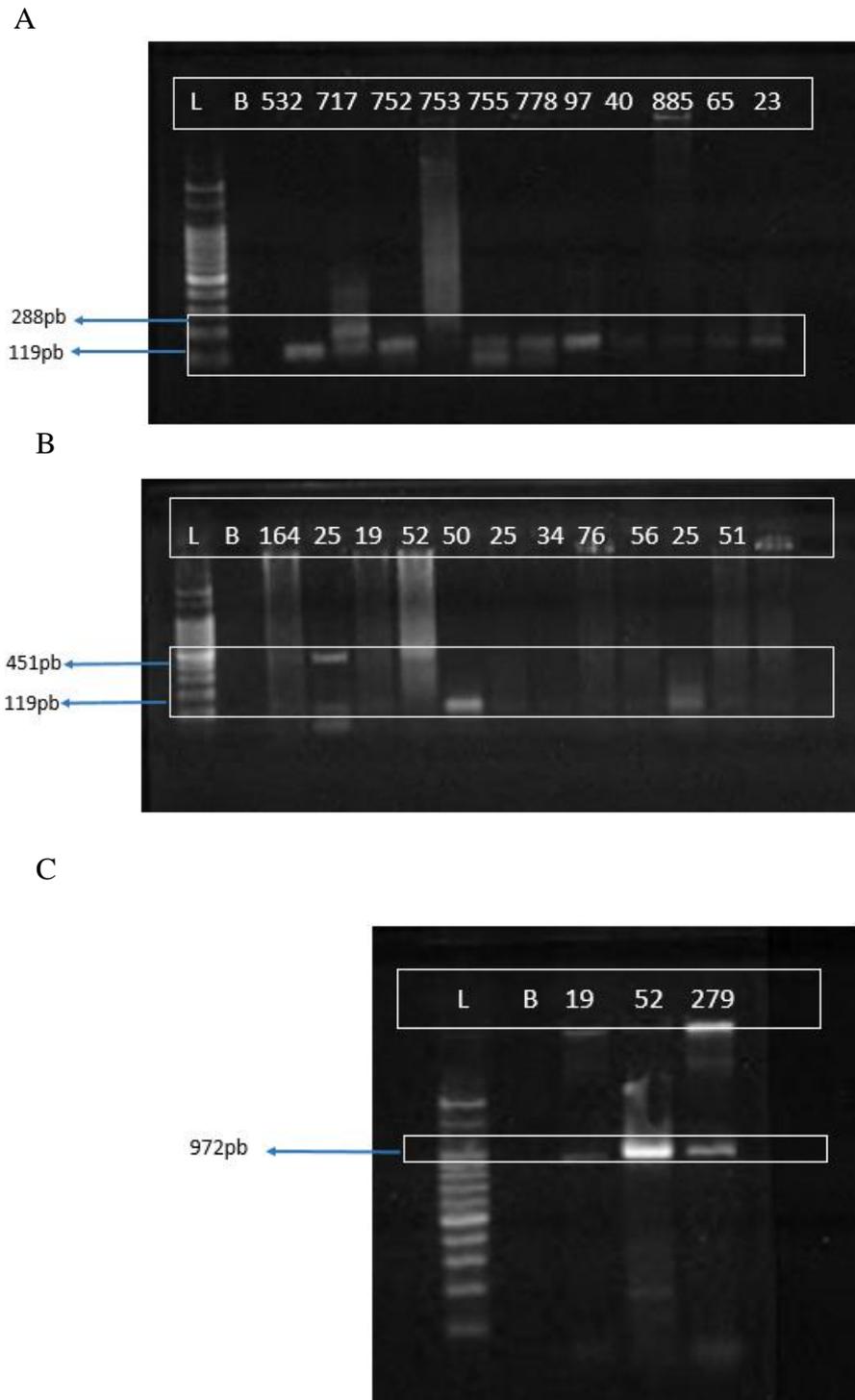
Dos quatro sorotipos virais do DENV identificados por RT-PCR o DENV-1, DENV-2 e DENV-3, além de dois casos de co-infecções, ou seja, a presença de mais de um sorotipo viral, sendo as co-infecções pelo DENV-1 e 2. O DENV-2 foi o mais prevalente, representando 54,5% das identificações, seguido do DENV-1 com 22,7% e do DENV-3 com 13,6% (Figura 9).



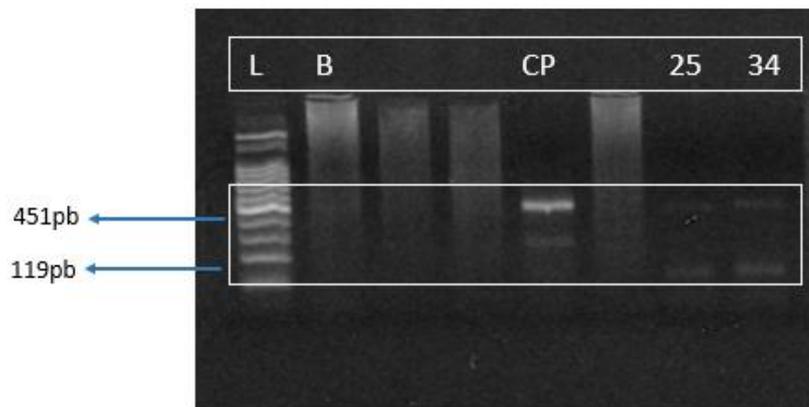
**Figura 09.** Representação gráfica dos sorotipos do DENV identificados durante o período de 2014-2015.

As análises das amostras positivas por RT-PCR durante os anos de 2014-2015 foram realizadas através da amplificação de três regiões distintas do genoma do DENV, a região junto aos genes *NS5*, *C/prM* e *E*. A primeira permite a detecção de *Flavivirus* em geral e as duas últimas permitem a detecção do DENV. Enquanto a amplificação do gene *E* é capaz de identificar os sorotipos em uma única etapa, na amplificação do gene *C/prM* são necessárias

duas etapas. Os sorotipos DENV 1, 2 e 3 foram identificados através da amplificação dos genes *C/prM* (Figura 10), enquanto as amplificações do gene *E* identificaram amostras correspondentes apenas ao DENV-1 (Figura 11). Sendo que as amostras PI-19 e PI-279 também foram positivas a partir da amplificação do gene *NS5*.

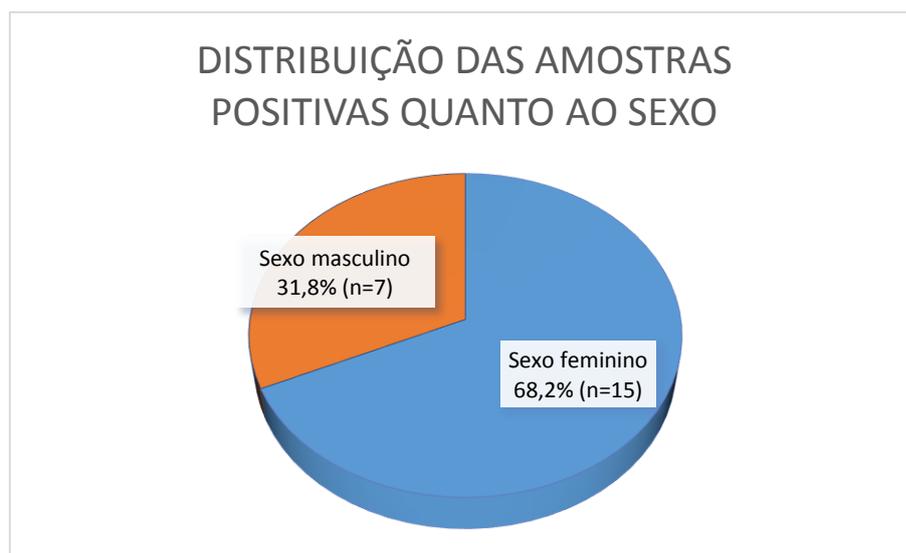


**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do DENV obtido na Semi-nested PCR junto a junção dos genes *C/prM*, gerando fragmento com comprimento de 119pb (DENV-2) e 288pb (DENV-3) (Figura 11A); 451pb (DENV-1) e 119pb (DENV-2) (Figura 11B e C); L: marcador de peso molecular. B: branco.



**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produto de amplificação do DENV obtido na PCR para o gene *E*, gerando fragmento com comprimento de DENV-1 (972pb), DENV-2 (651pb), DENV-3 (1012pb) e DENV-4 (1212 pb). L: marcador de peso molecular. B: branco.

As amostras positivas (n=22) foram classificadas quanto ao sexo, sendo que 68,2% (n=15) dos casos correspondem ao feminino e 31,8% (n= 7) ao masculino (Figura 12). Em relação a idade, a média foi de 32,5 anos e 18,2% (n=4) dos casos ocorreram em crianças com idade inferior ou igual a 15 anos, sendo que em dois casos (PI-52 e PI-279) foi registrada a presença de manifestações hemorrágicas. A descrição das amostras clínicas positivas por RT-PCR está ilustrada na tabela 7.



**Figura 12.** Representação gráfica da distribuição das amostras positivas quanto ao sexo durante o período de 2014-2015.

Quanto às manifestações clínicas, 45,5% (n=10) das amostras positivas apresentaram sintomas característicos de dengue clássica, os mais relatados foram febre, cefaleia, mialgia e artralgia. Além disso, 18,2% (n=4) apresentaram manifestações hemorrágicas, 13,6% (n=3) alterações neurológicas e em 22,7% (n=5) dos casos as fichas clínicas não foram disponibilizadas. Das amostras analisadas em 2014, três (PI-50, PI-51 e PI-52) corresponderam a pacientes internados por apresentarem quadro de agravamento por dengue, dois desses casos evoluíram para óbito (PI-50 e PI-51), um deles apresentando acometimento neurológico com paresia dos membros inferiores e superiores.

Além disso, também foram analisadas amostras pareadas de soro e LCR de pacientes com acometimento neurológico, sendo que duas dessas amostras (PI-23 e PI-25) foram positivas para DENV por RT-PCR no soro, no entanto não amplificaram no LCR. Estas amostras foram previamente testadas por inibição de hemaglutinação para arbovírus, sendo positivas para *Flavivirus* em ambos os espécimes clínicos e positivas para DENV no soro através da detecção de anticorpos IgM. Considerando a cocirculação de múltiplos sorotipos do DENV e a gravidade dos quadros clínicos, quatro dessas amostras (PI-50, PI-51, PI-52 e PI-279) foram selecionadas para o sequenciamento.

**Tabela 7.** Descrição das amostras clínicas positivas (n=22) por RT-PCR, quanto a idade, manifestações clínicas, outros testes como IgG, NS1, sorotipo identificado e origem das amostras. NR= não realizado; (+) = positivo; (-) = negativo; NI = não informado; THE = Teresina; PHB = Parnaíba.

Amostra	Idade	Manifestações clínicas	IgM	NS1	RT-PCR	Sorotipo	Origem
PI-01	44	Febre e mal estar	+	NR	+	DENV 1 e 2	THE
PI-19	25	NI	NR	NR	+	DENV-1	THE
PI-23	39	Febre, cefaleia, mialgia, artralgia, exantema, vômito, náusea, dor abdominal e retro-orbitária, fraqueza muscular, prostração, tremores nas extremidades.	+	NR	+	DENV-2	THE
PI-25	27	Cefaleia, artralgia, mialgia, vômito, náusea, fraqueza muscular e paralisia	+	NR	+	DENV-2	THE
PI-34	14	NI	-	NR	+	DENV 1 e 2	THE
PI-40	76	NI	+	NR	+	DENV-2	THE
*PI-50	78	Astenia, hipotensão, dor abdominal e plaquetopenia.	NI	NI	+	DENV-2	PHB

*PI-51	54	Mialgia, paresia dos membros inferiores e superiores	NI	NI	+	DENV-2	PHB
*PI-52	8	Febre, cefaleia, mialgia e hemorragia conjuntival	+	+	+	DENV-1	PHB
PI-56	47	NI	-	NR	+	DENV-1	THE
PI-65	23	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, exantema e prurido	NR	NR	+	DENV-2	THE
PI-76	15	Febre, cefaleia intensa, vômito e dor lombar	-	NR	+	DENV-2	THE
PI-97	43	Febre, cefaleia, calafrios, mialgia, dispneia e náuseas	-	NR	+	DENV-2	THE
PI-164	05 meses	Febre, erupções cutâneas e prurido	-	NR	+	DENV-1	PHB
*PI-279	04	Cefaleia, náuseas, mialgia, vômitos, exantema, dor abdominal e manifestações hemorrágicas	NR	+	+	DENV-1	PHB
PI-532	29	Febre, exantema com prurido, cefaleia, mialgia e artralgia	-	NR	+	DENV-2	PHB
PI-717	50	Cefaleia, mialgia, calafrios e exantema	-	NR	+	DENV-3	PHB
PI-752	27	Cefaleia, artralgia, mialgia e prova do laço +	-	NR	+	DENV-2	PHB
PI-753	40	Cefaleia, artralgia, dor retro-orbitária, exantema, calafrios e sangramento	-	NR	+	DENV-3	PHB
PI-755	22	Astenia, febre, cefaleia, mialgia, calafrios e dor retro-orbitária	-	NR	+	DENV-2	PHB
PI-778	33	Mialgia, exantema e sangramento gengival	+	NR	+	DENV-2	PHB
PI-885	18	NI	NR	NR	+	DENV-3	PHB

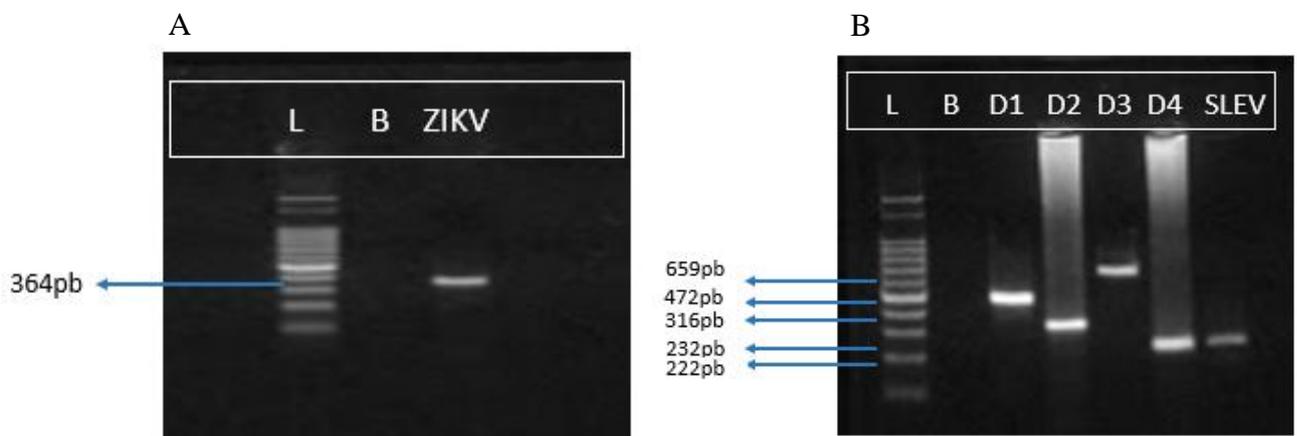
\*Amostras enviadas para sequenciamento do genoma viral.

O sequenciamento das amostras foi realizado a partir da região do gene *E*, que é considerada ideal para estudos de filogenia e evolução. Das quatro amostras enviadas para o sequenciamento, duas (PI-50 e PI-51) terão a reação repetida. As amostras PI-52 e PI-279 que correspondem ao sorotipo DENV-1 produziram uma sequência de 836 e 833 nucleotídeos, respectivamente. As amostras foram alinhadas através do BLAST, e a PI-52 apresentou 99% de homologia, com amostras brasileiras de Goiânia (GO) e Belém (PA), depositadas no

GenBank em 2015 e 2011 sob número de acesso KP858116.1 e HM450101.1, respectivamente. E a amostra PI-279, também apresentou 99% de homologia, com amostras brasileiras de Goiânia (GO) e de Buenos Aires, depositadas no GenBank em 2015 e 2014 sob número de acesso KP858101.1 e KC692514, respectivamente.

Uma árvore filogenética foi gerada pelo método de máxima verossimilhança, através do programa MEGA versão 6.0 (Figura 15). De acordo com essa árvore, as amostras identificadas no Piauí agruparam-se dentro do genótipo V, no entanto em linhagens diferentes. A amostra PI-279 corresponde a linhagem 1 e apresenta relação com amostras isoladas no Brasil, estado de Pernambuco, Rio de Janeiro, Minas Gerais e outros países como Venezuela e Colômbia. Enquanto a amostra PI-52 pertence a linhagem 6 e está relacionada com amostras Brasileiras, dos estados de Pernambuco, Pará, Espírito Santo e Rio de Janeiro.

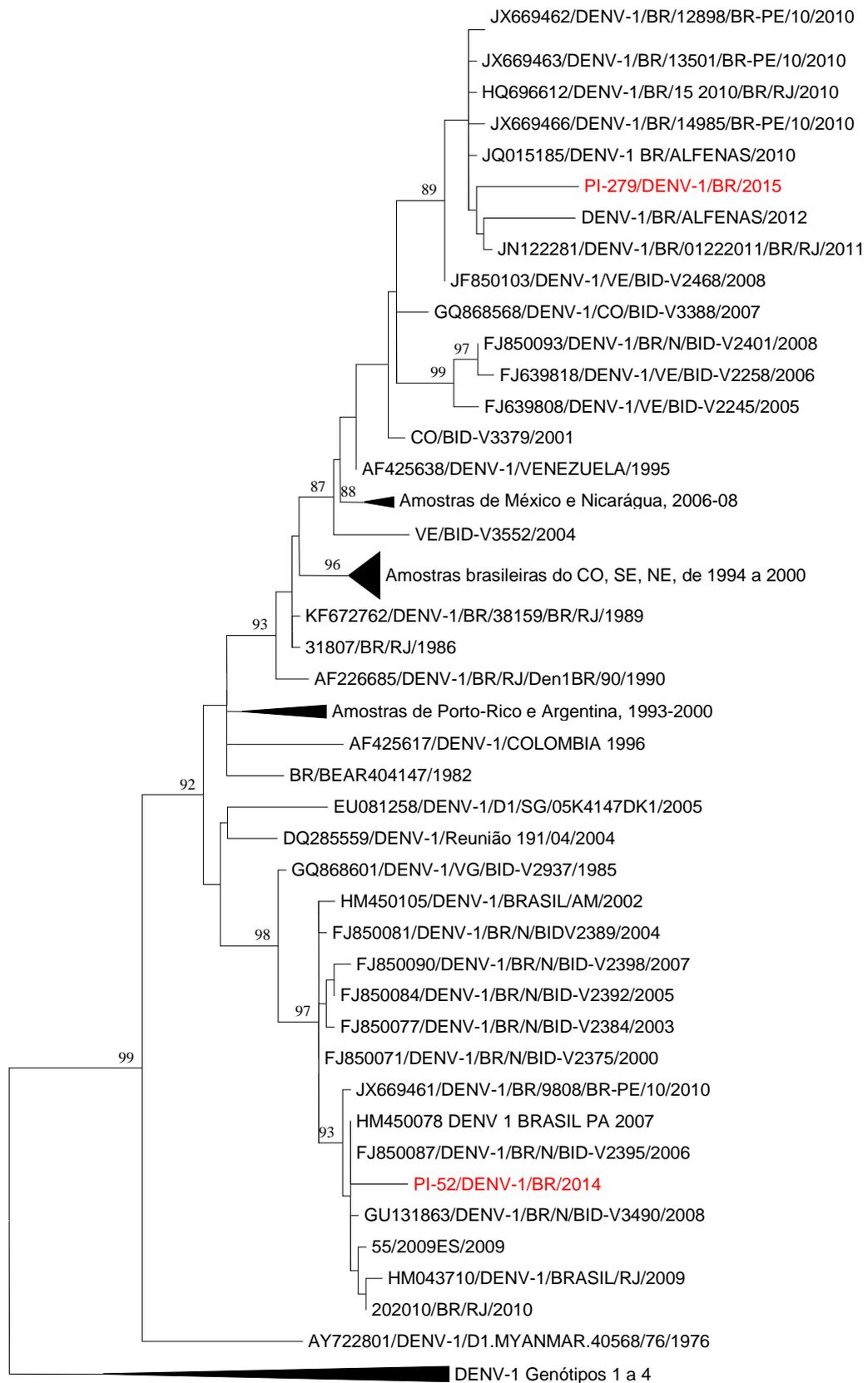
No estado do Piauí além da cocirculação dos múltiplos sorotipos do DENV, em 2014 foi descrito o primeiro caso de meningoencefalite em humanos associado ao WNV. Em 2015, o ZIKV foi responsável por um grande surto de doenças exantemáticas no Brasil, principalmente na região Nordeste, disseminando-se para outros estados e países das Américas. Diante disso, o grupo de pesquisa vem trabalhando na padronização de novas metodologias, a fim de ampliar o diagnóstico dessas arboviroses no estado. Foram utilizados controles positivos de WNV, ZIKV, DENV 1-4 e SLEV para auxiliar nessa etapa. Duas novas metodologias foram padronizadas durante a execução desse trabalho, uma delas tem como alvo a detecção do ZIKV a partir da amplificação do gene *E* (Figura 14A) e a outra permite a detecção dos quatro sorotipos do DENV e do SLEV, a partir do gene *NS5* (Figura 14B). A metodologia usada para detecção de WNV não obteve resultado satisfatório e continuará como objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa.



**Figura 13.** A. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de amplificação do ZIKV obtido na RT-PCR para o gene *E*, gerando fragmento com comprimento de 364pb a partir do controle positivo (cDNA do vírus) cedido pela Laboratório de Vírus da UFMG. B. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do DENV e SLEV obtido na RT-PCR para o gene *NS5*, gerando fragmento com comprimento de D1 (472pb), D2 (316pb), D3 (659pb), D4 (222pb) e SLEV (232pb). L: marcador de peso molecular; B: branco.

Durante a fase final do trabalho houve um aumento do número de casos de doenças exantemáticas associadas ao ZIKV registrados em todo o Brasil, dez amostras de soro de pacientes negativos para dengue por RT-PCR também foram testados para detecção do ZIKV. Essas amostras correspondem as coletadas no Pronto Socorro Municipal de Parnaíba, durante o período de maio a junho de 2015. Foram coletadas até o 5<sup>a</sup> dia após o início dos sintomas e todos os pacientes apresentaram febre, cefaleia, mialgia, artralgia e exantema com prurido.

Após resultados negativos por RT-PCR para o dengue através da análise dos gene *C/prM*, *E* e *NS5*, essas amostras foram investigadas para detecção do ZIKV na amplificação do gene *E*. Vários protocolos foram implementados até a chegada do controle positivo, em sobrenadante de cultura, bem como DNA complementar desse vírus o que auxiliou na padronização da reação molecular. Apesar dos sintomas característicos, a coleta ocorrer no período adequado e da reação amplificar o vírus controle, as amostras não amplificaram para detecção do ZIKV.



**Figura 14.** Árvore filogenética construída pelo método da Máxima Verossimilhança através do programa MEGA v.6.0, mostrando a identificação do genótipo V para as amostras de DENV 1 identificadas no Piauí (grifadas em vermelho), sendo que a amostra PI-279 corresponde a linhagem 1 e está relacionada com amostras brasileiras, da Venezuela e Colômbia e a PI-52 corresponde a linhagem 6 e está relacionada com amostras brasileiras.

## 6 DISCUSSÃO

As amostras de soro e/ou LCR analisadas durante a realização desse trabalho foram previamente testadas por métodos sorológicos nas instituições pelas quais foram cedidas. Os métodos sorológicos são os mais utilizados na rotina para o diagnóstico de dengue, principalmente devido a rapidez, ao fácil manuseio e baixo custo, no entanto, são menos específicos que os métodos moleculares (BAHT et al., 2015; PEELING et al., 2010). Os anticorpos IgM/IgG são detectados até 5 dias após o início dos sintomas (SANTIAGO et al., 2013), e a utilização dessa metodologia durante a fase aguda pode resultar em resultados falso negativos, o que contribui para o elevado número de subnotificação dos casos e um inadequado manejo clínico do paciente. A escolha do método ideal para o diagnóstico de dengue e outras arboviroses depende de alguns fatores, entre eles o período de coleta (BALE, 2015; HUTAMO et al., 2010; POERSCH et al., 2004; SANTIAGO et al., 2013).

É importante ressaltar que os testes sorológicos possuem limitações, devido à reatividade cruzada com outros Flavivírus, o que dificulta o diagnóstico correto (BRONZONI et al., 2005; GUZMAN et al., 2010). No Brasil, além da cocirculação dos quatro sorotipos do DENV (1-4), outros arbovírus têm sido descritos (FIGUEIREDO, 2015). Entre eles o ZIKV, responsável por um elevado número de casos de doenças exantemáticas em 2015 na região Nordeste (CAMPOS, SARDI, 2015; MUSSO et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). O WNV associado ao primeiro caso de meningoencefalite em humanos no Brasil, em 2014 (VIEIRA et al., 2015; WHO, 2014). E ainda o SLEV, responsável por surtos ocorridos na região Sudeste do país e recentemente teve seu primeiro genoma completo sequenciado a partir de uma amostra brasileira (MONDINI et al., 2007; TERZIAN et al., 2011; VEDOVELLO, 2015).

Os métodos diretos, como RT-PCR, utilizados para detecção do RNA viral ou antígenos solúveis, como o NS1 para diagnóstico de dengue, são mais eficientes durante a fase aguda da doença, que corresponde aos primeiros cinco dias após o início dos sintomas, quando os níveis de viremia são elevados (LANCIOTTI, 2003; LOW et al., 2011; SANTIAGO et al., 2013; WHO, 2009). Esses métodos possuem um elevado grau de sensibilidade e especificidade (CHIEN et al., 2006; HUE et al., 2011; JOHNSON et al., 2005; MUNOZ-JORDAN et al., 2009).

No entanto, os arbovírus são vírus de RNA, extremamente termolábeis e requerem condições específicas de armazenamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  (BANGS et al., 2007; KUMARIA, CHAKRAVARTI, 2005; WHO, 2009). Fatores como acondicionamento incorreto, congelamento/descongelamento repetido e baixa carga viral do paciente, devido à períodos de

coleta inadequado podem ocasionar degradação do material genético, inviabilizando a reação e podendo gerar resultados falso-negativos (SA-NGASANG et al., 2003; WHO, 2009). Apesar disso, foram identificadas amostras positivas por RT-PCR que foram negativas nas demais metodologias, o que reafirma a eficiência desse método. As análises por RT-PCR foram positivas em 22 amostras de soro (17%), resultados semelhantes foram descritos por Gurukumar (2009), Santos (2012) e Vale (2015). As amostras de LCR não amplificaram, e uma das dificuldades encontradas está associada ao período de coleta inadequado, pois foram coletadas sete dias após o início dos sintomas. Geralmente, os pacientes procuram o sistema de saúde apenas quando ocorre agravamento do caso, e na maioria das vezes esse período já não corresponde a fase aguda, dificultando a detecção de antígenos e do RNA viral (ARAÚJO et al., 2011; SOARES et al., 2006). Após o quinto dia dos sintomas, o diagnóstico é realizado através da detecção de anticorpos IgM, embora os níveis desse anticorpo e do antígeno NS1 sejam baixos, quando comparado a amostras de soro (ARAÚJO et al., 2011; CHEN et al., 1991; PUCCIONI-SHOLER et al., 2009). A melhor ferramenta para o diagnóstico de infecções por arbovírus, associadas a manifestações exantemáticas e neurológicas é representado pelo uso combinado de RT-PCR e ensaios imunológicos (BALE, 2015; LAUGHLIN et al., 2012; PUCCIONI-SOHLER et al., 2001; SOARES et al., 2006).

Essas amostras foram analisadas a partir de três regiões do genoma viral, que correspondem a junção dos genes *C/prM*, na qual foi utilizado a metodologia proposta por Lanciotti e colaboradores (1992), que é bem caracterizada e amplamente utilizada para determinação dos sorotipos virais. Durante a realização desse estudo, esse método mostrou-se altamente eficaz, embora alguns autores tenham relatado resultados falso-negativos, possivelmente associados a alterações genômicas do DENV (CHIEN et al., 2006; REYNES et al., 2003; STEINHAEUER et al., 1992). A região do gene *E*, possui a maior taxa de mutação entre os *Flavivirus*, isso ocorre porque ela interage diretamente com o sistema imune do hospedeiro e por isso sofre forte pressão evolutiva, sendo utilizada para estudos de filogenia e evolução viral (ARAÚJO et al., 2009; CHEN et al., 2003; DETTOGNI et al., 2012; LANCIOTTI et al., 1994). E a região do gene *NS5*, corresponde a região mais conservada entre os Flavivírus, inclusive entre os quatro sorotipos do DENV, portanto análises dessa região permitem monitorar a inserção de novos Flavivírus em determinadas áreas geográficas (BRONZONI et al., 2005; CHAO et al., 2007; MANEEKAN et al., 2009).

Ao analisar a distribuição das amostras positivas por RT-PCR quanto ao gênero, foi observado que houve maior incidência no sexo feminino, representando 68,2% dos casos. Resultados similares foram descritos em outras regiões do país (ALVES et al., 2011;

CARDOSO et al., 2011; CORDEIRO et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009, OLIVEIRA et al., 2012). Esse fenômeno pode ser justificado pelo elevado número de mulheres que procuram os serviços de saúde e/ou por passarem mais tempo em suas residências, estando mais expostas ao *Aedes aegypti* (ALVES et al., 2011; CARDOSO et al., 2011; FLAUZINO et al., 2009).

Em relação a idade, a média foi de 32,5 anos e quanto à classificação final da doença, predominaram as formas clínicas brandas, que correspondem a Febre do dengue (FD). Outros estudos também descrevem esse padrão (CAVALCANTI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; SIQUEIRA JR et al., 2011). Esses resultados refletem o que ocorre nas Américas, incluindo o Brasil, onde a dengue afeta principalmente a população adulta e está associada a formas menos severas (FD). E este perfil difere do encontrado no Sudeste Asiático, onde predominam as formas graves da doença (FHD) em lactentes e crianças (HALSTEAD, 2006; SIQUEIRA JR et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005). Alguns fatores como os possíveis casos de subnotificação das formas graves nas Américas e a teoria da infecção viral dinâmica, em que as crianças tornam-se a população susceptível após os adultos terem sido infectados e estarem imunes, podem ser usadas para explicar as diferenças entre os padrões epidemiológico dessas duas regiões (ARGOLO et al., 2013; FERGUSON et al., 1999; HALSTEAD, 2006).

Nos últimos anos, países da América relataram um aumento significativo na incidência de formas graves da dengue, no número de hospitalizações e morte entre crianças assemelhando-se ao descrito no Sudeste Asiático (ARGOLO et al., 2013; BHATT et al., 2013; HASLSTEAD et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2013; VILLABONAS-ARENAS et al., 2013; WHO, 2012). No Brasil, esse fenômeno tem sido descrito ao longo dos anos de 2007-2008 e acredita-se que este aumento esteja relacionado à reintrodução do DENV-2 no país (BARCELOS-FIGUEIREDO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2013). Vários estados brasileiros observaram essa mudança, no entanto ela foi mais perceptível na Região Nordeste, onde em 2007 as crianças foram responsáveis por 65% do total de casos de FHD, principalmente nos estados do Maranhão, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará e Piauí (ARGOLO et al., 2013; BRANCO et al., 2014; BRASIL, 2007; CAVALCANTI et al., 2011; GARCÊS et al. (manuscrito em preparação) (SANTOS, 2012; TEIXEIRA et al., 2008).

Durante o período analisado, dentre os pacientes que apresentaram manifestações hemorrágicas, dois correspondem a crianças do sexo feminino (PI-52 e PI 279) com 8 e 4 anos, respectivamente. Um dos casos que evoluíram para óbito corresponde a uma mulher de 78 anos que apresentou hipotensão grave, provavelmente devido ao extravasamento

plasmático, característico de choque causado pela dengue. Segundo diretrizes nacionais e internacionais as crianças são consideradas um grupo de risco para o desenvolvimento de formas severas, estas estão associadas ao aumento da permeabilidade vascular, que pode levar a hipotensão e choque (ARGOLO et al., 2013; GUZMAN et al., 2010; POTHAPREGADA et al., 2016; VERHAGEN, GROOT, 2014; WHO, 2009).

O desenvolvimento de formas graves da dengue (FHD e SCD) são mais comuns em infecções secundárias, isso ocorre devido ao fenômeno da resposta exacerbada dependente de anticorpo (ADE) (GUPTA et al., 2006; HASLSTEAD, 2006; POTHAPREGADA et al., 2016; WICHMANN et al., 2004). No entanto, alguns pacientes desenvolvem formas graves em uma infecção primária, destacando o papel dos fatores do vírus e do hospedeiro (MISRA et al., 2015). Crianças menores de 1 ano de idade com infecção primária pelo DENV, nascidas de mães que tenham sido previamente infectadas pelo vírus também podem desenvolver formas graves da doença (KLIKIS et al., 1988). Leite (2014) em um estudo com gestantes no Nordeste Brasileiro, relatou em 95% dos casos a presença de anticorpos IgG no sangue materno e no cordão umbilical, sugerindo que muitos recém nascidos possuem anticorpos anti-dengue transitórios e caso adquiram infecção no primeiro ano de vida, esses anticorpos podem favorecer ao desenvolvimento de formas graves devido o fenômeno ADE (HALSTEAD et al., 2002; HAUSE et al., 2016; KLIKIS et al., 1988; SIMMONS et al., 2007; VERHAGEN, GROOT, 2014).

Em relação aos pacientes que apresentaram alterações neurológicas, dois (PI-23 e PI-25) correspondem ao sexo feminino, possuem 39 e 27 anos, respectivamente. Em ambos os casos foram avaliadas por RT-PCR as amostras de soro e LCR, no entanto apenas as amostras de soro amplificaram. Segundo o estudo de Soares e colaboradores (2008), amostras de soro e LCR também foram analisadas para detecção do DENV, sendo que nenhuma delas amplificou e o diagnóstico foi baseado na detecção de anticorpos IgM, como a PCR normalmente é positiva na primeira semana da infecção, o período de coleta e a baixa viremia em amostras de LCR podem ter influenciado o resultado.

O outro paciente (PI-51) corresponde a um homem de 54 anos que apresentou paresia dos membros superiores e inferiores, posteriormente diagnosticada como Síndrome de Guillain Barré (SGB), cujo quadro evoluiu para óbito. Conforme Misra e colaboradores (2015), pacientes infectados pelo DENV com envolvimento do SNC, geralmente desenvolvem formas graves da doença, com um pior prognóstico e que pode levar ao óbito. O DENV-2 foi o sorotipo associado a esses três casos de alterações neurológicas e segundo Puccioni-Sohler e Rosadas (2015), esse sorotipo junto com o DENV-3 são os principais responsáveis por essas

manifestações (DOMINGUES et al., 2008; LUM et al., 1996; PUCCIONI-SOHLER, ROSADAS, 2015; SOARES et al. 2010; SOLOMON et al., 2000).

Alterações neurológicas associadas ao DENV e outros arbovírus estão se tornando frequentes, principalmente em locais endêmicos, segundo Carod-Artral e colaboradores (2013) a associação entre FD e alterações neurológicas varia entre 0,5% e 5,4% no Sudeste Asiático e chega a 21% no Brasil. Entre essas alterações destaca-se encefalopatia, encefalite, disfunção muscular e síndrome de Guillain Barré (SGB) (CAROD-ARTRAL et al., 2013; DOMINGUES et al., 2008; PUCCIONI-SOHLER, ROSADAS, 2015; SOARES et al., 2011; WHO, 2009). Essa última é caracterizada por uma neuropatia inflamatória desmielinizante, que pode se desenvolver após infecções, sobretudo virais, destacando-se o DENV e mais recentemente o ZIKV (BRASIL, 2015; CALVET et al., 2016; CAROD-ARTRAL et al., 2013; CHEN, LEE, 2007; FERREIRA, 2005; OEHLER et al., 2012; OEHLER et al., 2013; ORSINI et al., 2010; PINTO JUNIOR et al., 2015). Simom e colaboradores (2016) registraram a ocorrência simultânea da SGB e infecção pelo DENV, anteriormente descrita em apenas dois casos (SHARMA et al., 2011; SOARES et al., 2008). Como nas duas doença são encontrados os mesmos mediadores inflamatórios, acredita-se que a relação entre a infecção pelo DENV e o desenvolvimento da SGB estejam associados a resposta imune do hospedeiro, embora os mecanismos ainda não sejam totalmente compreendidos (SULEKHA et al., 2014).

As amostras positivas por RT-PCR, analisadas entre o período de 2014-2015 indicaram a cocirculação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 no estado do Piauí. Outras regiões também apresentaram resultados similares, como o estado do Ceará (ARAÚJO et al., 2011). Segundo Santos (2012) e Vale (2015), durante o período entre 2006 e 2012, os quatro sorotipos do DENV foram isolados no estado. A introdução do DENV-4 no Piauí em 2011 foi detectada através de RT-PCR, pelo nosso grupo de pesquisa e representa um importante marco epidemiológico, considerando que cada sorotipo produz imunidade duradoura apenas contra si e proteção heterotípica transitória, a introdução destes em uma população susceptível leva ao desenvolvimento de epidemias e casos graves (CARDOSO et al., 2011; GUZMAN et al., 2010). Essa amostra foi enviada para sequenciamento e através de análise da região junto aos genes *C/prM*, identificou-se que o DENV-4 circulante no estado do Piauí pertence ao genótipo II, de acordo com o cenário nacional (ACOSTA et al., 2011; NAVECA et al., 2012; NUNES et al., 2012; SOUZA et al., 2011; VALE, 2015).

Dois casos de co-infecções pelo DENV 1 e 2 foram registrados durante o período entre 2014-2015. Essa é uma situação comum em regiões hiperendêmicas, como o estado do Piauí,

onde circulam múltiplos sorotipos do DENV. Resultado similar foi descrito no estado em 2012, conforme Santos (2012) e Vale (2015) e em outras regiões do país (ARAÚJO et al., 2006; BASTOS et al., 2012; BONA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 2011; ROCCO et al., 1998)

Durante a realização desse trabalho, quatro amostras referentes ao período entre 2014-2015 foram enviadas para sequenciamento (PI-50, PI-51, PI-52 e PI-279), todas correspondem a pacientes que desenvolveram formas graves da doença, sendo que dois evoluíram para óbito. Os resultados dos sequenciamentos referentes as amostras PI-50 e PI-51 não foram satisfatórios e estas serão reenviadas para repetição. Através do sequenciamento do gene *E* das amostras PI-52 e PI-279, identificamos que as amostras de DENV-1 circulantes no estado do Piauí pertencem ao genótipo V (Figura 14) e as linhagens 6 e 1, respectivamente. Conforme Carneiro e colaboradores (2012) esse genótipo é encontrado no Brasil desde 1982 e é o único que circula no país até o momento (BONA et al., 2012; CARNEIRO et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2011; DRUMOND et al., 2012; PIRES NETO et al., 2005; VILLABONA-ARENAS, ZANOTTO, 2013). Este representa a maioria dos genótipos descritos para o DENV-1 encontrado nas Américas (CHEN, VASILAKIS, 2011; VILLABONA-ARENAS, ZANOTTO, 2013.).

O DENV-1 foi introduzido na América Latina em 1966, em Porto Rico (DRUMOND et al., 2012; VILLABONA-ARENAS, ZANOTTO, 2013). Desde então tem sido descrito em diversos países, na Bolívia esse sorotipo foi identificado em 1987, com surtos anuais desde 1999. No Paraguai, foi descrito desde 1988 e no Chile desde 2002 (DICK et al., 2012; ROCA et al., 2009; TITTARELI et al., 2014). No Brasil, um surto do DENV-1 foi relatado na região Norte em 1981, com circulação restrita a esse local. Provavelmente esse sorotipo foi reintroduzido no país em 1984-1985 e um surto foi identificado no Rio de Janeiro em 1986, disseminando-se por todo o território brasileiro (DOS SANTOS et al., 2002; DRUMOND et al., 2012; DRUMOND et al., 2016; TITTARELI et al., 2014). Após circulação silenciosa, em 2009 o DENV-1 re-emergiu na região Sudeste, causando uma grande epidemia no país em 2010-2011 (DOS SANTOS et al., 2011). Análises filogenéticas do vírus isolado no Rio de Janeiro em 1986 sugeriram que ele é descendente de um único ancestral recombinante, entre o genótipo IV (Jamaica) e genótipo I (Singapura) (HOLMES et al., 1999; HOLMES, BURCH, 2000).

Estudos filogenéticos de isolados brasileiros do DENV-1, realizado por Dos Santos e colaboradores (2011) registram a circulação de múltiplas linhagens deste sorotipo no Brasil, gerando um aumento na diversidade genética deste vírus (DOS SANTOS et al., 2011;

DRUMOND et al., 2012; CARNEIRO et al., 2012). Resultados similares também foram descritos na Ásia e em outras regiões das Américas (KUKRETI et al., 2009; MENDEZ et al., 2010). No Brasil, três linhagens foram reconhecidas, entre as quais se aglomeram todos os isolados das Américas e estas foram introduzidas no país em eventos diferentes (CARNEIRO et al., 2012; DRUMOND et al., 2012). A linhagem II que corresponde a vírus brasileiros (1986), a linhagem I (2001), sugere origem asiática e a linhagem III, isolada entre 2010 e 2011, sugere origem Latino-americana (DOS SANTOS et al., 2011). Estudos realizados por Drumond e colaboradores (2012) detectaram uma possível nova linhagem recombinante do vírus, derivada de duas linhagens distintas. Com isso, é possível observar que o DENV-1 foi introduzido no Brasil a partir de diferentes países e em períodos divergentes, levando a substituição das linhagens ou a cocirculação das mesmas, podendo estar associado ao longo período de circulação do DENV 1, no Brasil. E sua reemergência, pode estar associada ao elevado número de casos e a ocorrência de formas graves (DOS SANTOS et al., 2011; DRUMOND et al., 2012; CARNEIRO et al., 2012).

A amostra PI-279 apresentou uma relação próxima com amostras isoladas no Brasil, nos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro e Minas Gerais e com outros países da América, como Venezuela e Colômbia. Resultado semelhante foi descrito por Drumond e colaboradores em (2016) em estudo realizado no Sul de Minas Gerais, onde foi isolado o DENV-1 de um paciente com manifestações hemorrágicas e após análises filogenéticas foi confirmado o genótipo V, linhagem 1 o qual está no mesmo ramo da árvore dos vírus da Venezuela e do Brasil, provavelmente originado a partir do Rio de Janeiro.

Enquanto a amostra PI-52 pertence a linhagem 6 e está relacionada com amostras Brasileiras, dos estados de Pernambuco, Pará, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Conforme Drumond e colaboradores (2012) em estudo realizado com 59 sequências de genoma completo e diferentes linhagens do DENV-1, observou que atualmente os isolados brasileiros agrupam-se nas linhagens 1, 3 e 6. A linhagem 6 corresponde a amostras brasileiras e isoladas entre os anos de 2000-2008, a partir de regiões Norte e Sudeste do país. Esta linhagem está estreitamente relacionada com amostras das Ilhas Virgens, Singapura e Ilha Reunion que com os outros isolados do Brasil e América Latina, estando em outro ramo da árvore como mostra a figura 15.

Acredita-se que estes vírus possam ter sido introduzidos no Brasil através da rota Caribenha, a qual é conhecida como uma importante via de entrada de novos vírus na América do Sul e conseqüentemente no Brasil, incluindo outros sorotipos do DENV (ARAÚJO et al., 2012; BARCELOS-FIGUEIREDO, 2014; DRUMOND et al., 2012;

NUNES et al., 2014). A linhagem 1 compreende três amostras brasileiras, duas foram isoladas do Rio de Janeiro e são intimamente relacionadas entre si, mas não apresentam relação com o terceiro isolado que corresponde a amostra da região Norte, isolada em 2008. Essa amostra compartilha um ancestral comum com duas linhagens, uma da Colômbia e outra da Venezuela, isoladas em 2004/2005. Enquanto os isolados do Rio de Janeiro compartilham um ancestral comum com amostras da Venezuela datada de 2006. A linhagem 6 foi provavelmente introduzida na região Norte do Brasil em 1998/1999, circulando de forma restrita nessa área. Só então em 2006/2007 esse vírus foi transportado para região Sudeste. Diante disso, é possível observar que essas linhagens foram introduzidas no Brasil através de diferentes regiões e eventos paralelos, sendo que atualmente ambas evoluem de forma independente (DRUMOND et al., 2012).

A inserção de novos sorotipos e/ou genótipos e linhagens do DENV em novas áreas constituem um importante fator de risco para o desenvolvimento de surtos da dengue e aumento da diversidade genética da população (DRUMOND et al., 2016). Geralmente a entrada de novos vírus no Brasil é descrita a partir da região Norte e Sudeste, entretanto Barcelos Figueiredo e colaboradores (2014) sugerem uma nova rota de entrada através do estado do Piauí. Análises filogenéticas das amostras de DENV-2 circulantes no estado durante o período de 2006 e 2007 agruparam-se próximo aos isolados no Rio de Janeiro, que é sugerido como local de entrada do vírus no país entre anos 2007 e 2008 (DRUMOND et al., 2013). Entretanto, as amostras de DENV-2 já circulavam no Nordeste entre 2006 e 2007, o que sugere que esse vírus foi inserido e circulou na região Nordeste, especificamente no Piauí, anterior a região Sudeste. É importante ressaltar a importância de análises filogenéticas dos vírus circulantes na região, a fim de avaliar a inserção e evolução do DENV e seu impacto na população durante uma epidemia.

Devido a cocirculação de diferentes arbovírus, o diagnóstico diferencial para DENV, ZIKV e CHIKV é imprescindível (PINTO JUNIOR et al., 2015). E ainda o WNV e SLEV que estão associados principalmente a alterações neurológicas. Diante disso, com o propósito de auxiliar no diagnóstico de doenças febris exantemáticas e alterações neurológicas no estado do Piauí, o nosso laboratório foi responsável pela padronização de uma reação de RT-PCR para amplificação do ZIKV bem como para detecção de DENV 1-4 e SLEV. Foram feitos também alguns testes para padronização da reação capaz de detectar o WNV, utilizando os iniciadores descrito por Anderson e colaboradores (2001) (dados não mostrado) e controle positivo cedido pela Dr.<sup>a</sup> Erna Kroon do Laboratório de Vírus da UFMG, no entanto os resultados não foram positivados. A inclusão dessa metodologia no Piauí é essencial,

principalmente devido a detecção desse vírus associada ao primeiro caso de meningoencefalite em humanos, em 2014 no estado (VIEIRA et al., 2015).

Como o ZIKV, o SLEV e o WNV pertencem ao gênero *Flavivirus*, a utilização de testes sorológicos para detecção de anticorpos é limitada, devido a reatividade cruzada (BRONZONI et al., 2005; DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2007; MANSFIED et al., 2011; PINTO JUNIOR et al., 2015). Infecções causadas por esses e outros arbovírus não possuem sintomas clínicos específicos e muitos deles cocirculam no mesmo local. A RT-PCR pode ser uma ferramenta útil para a detecção desses vírus, entretanto em alguns casos apresenta limitações como na detecção do ZIKV, devido à baixa viremia restrita aos 2-3 dias após o início dos sintomas. Amostras de urina e saliva também têm sido utilizadas para detecção desses vírus e se destacado com uma alternativa viável, devido à facilidade para obtenção das amostras, elevada carga viral e a detecção por um período mais longo (10-20 dias após o início dos sintomas), no caso da urina (GINIER et al., 2016; GOURINAT et al., 2015; MUSSO et al., 2015).

A região do gene *NS5* é altamente conservada entre os *Flavivirus*, devido a presença do domínio RdRp na sua porção C-terminal, e também entre os quatro sorotipos do DENV (CHAO, 2007; MANEEKAN et al., 2009). Diante disso, uma nova abordagem foi padronizada no BIOMIC para detecção e identificação rápida dos Flavivírus, também pode ser utilizada para detecção de Alphavírus. Essa técnica funciona como uma ferramenta de diagnóstico rápido e diferencial das amostras clínicas, evitando a necessidade de testar várias amostras através de métodos isolados de PCR (BRONZONI et al., 2005).

Baseado nos dados descritos, observamos que no estado do Piauí circularam os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 entre o período de 2014-2015, entretanto os quatro sorotipos foram identificados durante o período de 2006-2012, caracterizando o estado como uma região hiperendêmica, o que predispõe ao desenvolvimento de epidemias e formas severas da doença. Em 2011, o DENV-4 foi introduzido no estado e análises filogenéticas realizadas por colaboradores do nosso grupo de pesquisa identificaram que ele pertence ao genótipo II, semelhante ao descrito no território brasileiro. Amostras do DENV-1 (PI-52 e PI-279) identificadas durante a realização desse trabalho também foram caracterizadas filogeneticamente e pertencem ao genótipo V, que segundo estudos é o único que circula no Brasil desde 1982, no entanto diversas linhagens já foram descritas. Devido à circulação dos múltiplos sorotipos do DENV e de outros arbovírus associados a doenças exantemáticas e alterações neurológicas é necessário a implantação de um programa de monitoramento eficaz, a fim de auxiliar a vigilância epidemiológica do estado.

## 7 CONCLUSÃO

- A técnica molecular aumentou a capacidade de detecção viral em amostras consideradas negativas quando testadas por outras metodologias.
- Durante o período de 2014-2015, ocorreu a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 no estado do Piauí. Casos de co-infecções também foram registrados, o que reflete a situação de hiperendemicidade da região.
- O aumento do número de formas graves, incluindo alterações neurológicas tem ocorrido com maior frequência no Brasil, inclusive no Piauí, esse fato pode estar associado à múltipla circulação de arbovírus.
- A padronização da técnica de RT-PCR para detecção do ZIKV amplificou a região do gene *E* e a de DENV 1-4 e SLEV amplificou o gene *NS5*, ambas visam auxiliar no diagnóstico molecular diferencial dessas doenças e monitorar a inserção de novos Flavivírus no estado.
- Após caracterização molecular, o sorotipo DENV-1 circulante no estado do Piauí foi agrupado com o genótipo V, corroborando conforme descrito na literatura no cenário nacional. No entanto, as duas amostras foram caracterizadas em linhagens distintas: a amostra PI-279 - linhagem 1 e a PI-52 - a linhagem 6.
- As análises filogenéticas do DENV fornecem informações sobre a evolução e dinâmica viral e são essenciais para uma melhor compreensão da sua epidemiologia nas diversas regiões geográficas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, P. O. A.; et al. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1979-1981, out. 2011.
- ALERA, M. T.; et. al. Zika virus infection, Philippines, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p.722-724, abr. 2015.
- ALVAREZ, D. E.; et al. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, n. 1, p. 120-132, 2006.
- ALVES, J. A. B.; et al. Epidemiological aspects of dengue in Aracaju, State of Sergipe, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 670-673, nov/dez. 2011.
- ANDAYI, F.; et al. A Sero-epidemiological Study of Arboviral Fevers in Djibouti, Horn of Africa. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1-13, dez. 2014.
- ARAÚJO, F. M.; et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceara, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 925-928, dez. 2006.
- ARAÚJO, F. M. C.; et al. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods**, v. 177, n. 1, p. 128-131, out. 2011.
- ARAÚJO, J. M.; Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1-10, set. 2012.
- ARAÚJO, J. M. G.; et al. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 716-725, jul. 2009.
- ARGOLO, A. F. L. T.; et al. Prevalence and incidence of dengue virus and antibody placental transfer during late pregnancy in central Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 254, p. 1-7, mai. 2013.
- ARYEE, A; THWAITES, G. Viral encephalitis in travellers. **Clinical Medicine**, v. 15, n. 1, p. 86-90, 2015.
- 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. 709-715, jul. 2009.
- AVIRUTNAN, P.; et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 793-806, abr. 2010.
- BACK, A.T.; LUNDKVIST, A. Dengue viroses – an overview. **Infection, Ecology & Epidemiology**, v. 3, n. 1, ago. 2013.

BALE JR, J. F. Virus and Immune-Mediated Encephalitides: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Pediatric Neurology**, v. 53, n. 1, p. 3-12, jul. 2015.

BANGS, M. J.; PUDIANTARI, R.; GIONAR, Y. R. Persistence of dengue virus RNA in dried *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to natural tropical conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p.163-167, jan. 2007.

BARNIOL, J. et al: Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, p. 1-12, 2011.

BARONTI, C.; et al. Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. 500-514, mai/jun. 2014

BARZON, L.; et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 7, p. 1086-1092, out. 2013.

BARZON, L.; et al. Genome sequencing of West Nile Virus from human cases in Greece, 2012. **Viruses**, v. 5, n. 9, p. 2311-2319, set. 2013.

BARZON, L.; et al. Isolation of West Nile Virus from Urine Samples of Patients with Acute Infection. **Journal of Clinical Microbiololy**, v. 52, n. 9, p. 3411-3413, set. 2014.

BASTOS, M. S.; et al. Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus Infection in Patients with suspected Central Nervous System Viral Infection in the Western Brazilian Amazon. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 9, p. 1522-1527, 2014.

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, jul/ago. 2011.

BEASLEY, D. W.; BARRETT, A. D. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. **Journal of Virology**, v. 76, n. 24, p.13097-13100, dez. 2002.

BESNARD, M.; et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 13, p. 1-4, abr. 2014.

BHATT, S.; et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, abr. 2013.

BLITVICH, B. J. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 1, p. 71-86, jun. 2008.

BONA, A. C.; TWERDOCHLIB, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 297-300, jun. 2012.

BORDI, L.; et al. Chikungunya virus isolates with/without A226 V mutation show different sensitivity to IFN- $\alpha$ , but similar replication kinetics in non human primate cells. **New Microbiologica**, v. 34, p. 87-91, 2011.

BOSCH, I.; et al. West Nile virus, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n. 4, p. 651-653, abr. 2007.

BOWEN, R. A. Flaviviridae. In: MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J., editors. **Fenner's veterinary virology**. Oxford: Elsevier; 2011. p.467-481.

BRANCO, M. R. F. C.; et al. Risk factors associated with death in Brazilian children with severe dengue: a case-control study. **Clinics**, v. 69, n. 1, p. 55-60, jan. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. **Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 372 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. **Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 100 p.

BRASIL.. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue : diagnóstico e manejo clínico – Adulto e Criança. 3ª ed, 28pp. Brasília : **Ministério da Saúde**, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: manual de enfermagem – adulto e criança**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Microcefalia – Casos suspeitos chegam a 4.107 em todo o país**. 2016. Disponível em:  
< <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/22295-casos-suspeitos-chegam-a-4-107-em-todo-o-pais>>. Acesso em 29 fev. 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Microcefalia – Ministério da Saúde divulga boletim epidemiológico**. 2015. Disponível em:  
< <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/20805-ministerio-da-saude-divulga-boletim-epidemiologico>>. Acesso em 29 fev. 2016.

BRINTON, M. A. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the 554 western hemisphere. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 371-402, 2002.

- BRONZONI, R. V. 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, fev. 2005.
- BUATHONG, R.; et al. Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 380-383, ago. 2015.
- CALISHER, C. H. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. **Acta Virologica**, v. 32, n. 5, p. 469-478. 1988.
- CALISHER, C. H.; GOULD, E. A. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. In: MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F. A.; SHATKIN, A. J. (Editors). **Advances in virus research**. San Diego: Academic Press, 2003. v. 59, p. 1-19.
- CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N. Arbovirus serogroups: Definition and geographic distribution. In: MONATH, T. P. (Editor). **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Florida: Boca Raton, CRC Press, 1988. v. 1, p. 19-57.
- CALISHER, C. H.; POLAND, J. D. Laboratory diagnosis. In: MONATH, T. P. (Editor). **St. Louis Encephalitis**. Washington, DC: American Public Health Association, 1980. p. 571-601.
- CALISHER, C. H.; et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 1, p. 37-43. 1989.
- CALVET, G.; et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet/Infectious Diseases**, p. 1-8, fev. 2016.
- CÂMARA, F. P.; CARVALHO, L. M.; GOMES, A. L. Demographic profile of sylvatic yellow fever (SYF) in Brazil from 1973 to 2008. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 107, n. 5, p. 324-327, mai. 2013.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S.I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n.10, p. 1885-1886, out. 2015
- CARDOSO, C. W.; et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274-2276, dez. 2015.
- CARDOSO, I. M.; et al. Dengue: clinical forms and risk groups in a high incidence city in the southeastern region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 430-435, jul/ago. 2011.
- CARNEIRO, A. R.; et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 805-812, set. 2012.

CAROD-ARTAL, F. J.; et al. Neurological complications of dengue virus infection. **The Lancet/Neurology**, v.12, n. 9, p. 906-919, set. 2013.

CASSEB, A. R. et al. Diagnosis of arboviruses using indirect sandwich IgG ELISA in horses from the Brazilian Amazon. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 29, p. 1-4, 2014.

CASTRO, J. A. F.; et al. Dengue viroses activity in Piauí, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p.1021-1023. 2003.

CAVALCANTI, L. P.; et al. Change in age pattern of persons with Dengue Northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n. 1, p. 132-134, jan. 2011.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Epidemic/epizootic West Nile virus in the United States: guidelines for surveillance, prevention, and control**, 3rd revision. 2003. Disponível em: <<http://www.contracostamosquito.com/PDF/wnvguidelines2003.pdf>>. Acesso em 28 fev. 2016.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Transcript for CDC Telebriefing: Zika Virus Travel Alert. 2016**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/media/releases/2016/t0116-zika-virus-travel.html>>. Acesso em 28 fev. 2016.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **West Nile virus disease cases and deaths reported to CDC by year and clinical presentation, 1999-2013. 2013**. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/cummulative/99\\_2013\\_CasesAndDeathsClinicalPresentationHumanCases.pdf](http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/cummulative/99_2013_CasesAndDeathsClinicalPresentationHumanCases.pdf)>. Acesso em 28 fev. 2016.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Zika Virus. 2016**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/zika/>>. Acesso em 28 fev. 2016.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Information for vector control programs. 2015**. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV\\_VectorControl.pdf](http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_VectorControl.pdf)>. Acesso em 28 fev. 2016.

CHAMBERS, T. J.; et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649-688, 1990.

CHANCEY, C.; et al. The global ecology and Epidemiology of West Nile Virus. **Biomed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 1-20, 2015.

CHANG, G. J. Molecular biology of dengue viruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Editors). **Dengue and dengue haemorrhagic fever**. New York: CAB International, 1997.

CHAO, D. Y.; DAVIS, B. S.; CHANG, G. J. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.2, p. 584-589, fev. 2007.

- CHAU, T. N. B.; et al. Dengue in Vietnamese Infants - Results of Infection-Enhancement Assays Correlate with Age-Related Disease Epidemiology, and Cellular Immune Responses Correlate with Disease Severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 4, p. 516-524, ago. 2008.
- CHÁVEZ, J. H.; et al. Production and diagnostic application of recombinant domain III of West Nile envelope protein in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 97-99, jan/fev.2013.
- CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue - quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562-1608, set. 2011.
- CHEN, T. Y.; LEE, C. T. Guillain-Barré syndrome following dengue fever, **Annals of Emergency Medicine**, v. 50, n. 1, p. 94-95, 2007.
- CHEN, W. J.; HWANG, K. P.; FANG, A. H. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 22, n. 4, p.659-663, dez. 1991.
- CHIEN, L. J.; et al. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1295-1304, abr. 2006.
- CHRISTO, P. P. Encephalitis by dengue and other arboviroses. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 73, n. 8, p. 641-643, ago. 2015.
- CHU, J. J.; NG, M. L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrinmediated endocytic pathway. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10543-10555, 2004.
- CHUNGUE, E.; et al. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. **The Journal of General Virology**, v. 76, n. 7, p. 1877-1884, jul. 1995.
- CICCOZZI, M.; et al. Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. **Infections, Genetics & Evolution**, v. 17, n. 1, p. 46-50, jul. 2013.
- CLETON, N.; et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.
- 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. 11418-11431, dez. 2006.
- COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 853-859, jan. 2005.
- DASH, A. P.; et al. Emerging and re-emerging arboviral diseases in Southeast Asia. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 50, n. 2, p. 77-84, jun. 2013.

- DEEN, J. L.; et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 170-173, jul. 2006.
- DETTOGNI, R. S.; LOURO, I. D. Phylogenetic characterization of Dengue virus type 2 in Espírito Santo, Brazil. **Molecular Biology Reports**, v.39, n. 1, p. 71-80, jan. 2012.
- DIAZ, L. A.; et al. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1752-1754, nov. 2006.
- DIAZ, L.A. et al. West Nile virus in birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 689-691, abr. 2008.
- DICK, G.W.; KITCHEN, S.F.; HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, p. 509-520, set. 1952.
- DICK, O. B.; et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584- 593, out. 2012.
- DOBLER, G. Arboviruses causing neurological disorders in the central nervous system. **Archives of Virology (Supplementum)**, v. 11, n. 1, p. 33-40, 1996.
- DOMINGUES, R. B.; et al. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **Jornal of the Neurological Sciences**, v. 267, n. 1-2, p. 36-40, abr. 2008.
- DOS SANTOS, C. L.; et al. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 11-16, jan/fev. 2003.
- DOS SANTOS, C. N.; et al. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the nonstructural proteins. **Virus Research**, v. 90, n. 1-2, p. 197-205, dez. 2002.
- DOS SANTOS, F. B.; et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology Journal**, v. 8, n. 387, p. 1-4, ago. 2011.
- DUFFY, M.R.; et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536-2543, jun. 2009.
- DRUMOND, B. P.; et al. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-10, mar. 2013.
- DRUMOND, B. P. et al. Phylogenetic analysis of Dengue virus 1 isolated from South Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 251-258, jan/mar. 2016.

- DRUMOND, B. P.; et al. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by cocirculation and strain/lineage replacement. **Archives of Virology**, v. 157, n. 11, p. 2061-2073, nov. 2012.
- FAGGIONI, G.; et al. Rapid molecular detection and genotyping of West Nile Virus lineages 1 and 2 by real time PCR and melting curve analysis. **Journal of Virological Methods**, v. 207, n. 1, p. 54-59, out. 2014.
- FANG, S.; et al. Recent Advances in DENV Receptors. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 1, p. 1-6, abr. 2013.
- FARIA, N. R. C.; et al. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1-8, mar. 2013.
- FAYE, O.; et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-10, jan. 2014.
- FAYE, O.; et al. One-Step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 96-101, set. 2008.
- FAYE, O.; et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology Journal**, v. 10, n. 311, p. 1-8, out. 2013.
- FERREIRA, G. P.; et al. Climbing the steps of viral atomic force microscopy: visualization of Dengue virus particles. **Journal of Microscopy**, v. 231, n. 1, p. 180-185, jul. 2008.
- FERREIRA, M. L. B.; et al. Manifestações Neurológicas de Dengue: Estudo de 41 casos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n. 2, p. 488-493, jun. 2005.
- FIGUEIREDO, I. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v.2, p. 1643-1649. 2000
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviroses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, mar/abr. 2007.
- FIGUEIREDO, R. M.; et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n. 4, p. 667-669, 2008
- FIGUEIREDO, M. L.; et al. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil. **Virology Journal**, v. 10, n. 60, p. 1-4, fev. 2013.
- FIGUEIREDO, M. L. G; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677-683, nov/dez. 2014.
- FIGUEIREDO, M. L. G; FIGUEIREDO, L. T. M. Review on Infections of the Central Nervous System by St. Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flaviviruses in Brazil, 2004-2014. **Advances in Microbiology**, v. 4, n. 13, p. 955-961, out. 2014.

FIGUEIREDO, L. B.; et al. Dengue virus 2 American-Asian genotype identified during the 2006/2007 outbreak in Piauí, Brazil reveals a Caribbean route of introduction and dissemination of dengue virus in Brazil. **PLOS One**, v. 9, n. 8, p. 1-11, ago. 2015.

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n .3, p. 233-234, mai/jun. 2015.

FLAUZINO, R. F.; et al. Heterogeneidade espacial da dengue em estudos locais, Niterói, RJ. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 6, p. 1035-1043. 2009.

FOORD, A. J.; et al. Flavivirus detection and differentiation by a microsphere array assay. **Journal of Virological Methods**, v. 203, n. 1, p. 65-72, jul. 2014.

FOY, B. D.; et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880-882, mai. 2011.

FREDERICKS, A. C.; FERNANDEZ-SESMA, A. The Burden of Dengue and Chikungunya Worldwide: Implications for the Southern United States and California. **Annals of Global Health**, v. 80, n. 6, p. 466-475, nov/dez. 2014.

GINIER, M.; et al. Zika without symptoms in returning travellers: What are the implications? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 1, p. 16-20, jan/fev. 2016.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B. R.; LEE, C. K. Zoonotic encephalitides caused by arboviroses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 1, p. 58-77, jan. 2014.

GOLLINS, S.W.; PORTERFIELD, J. S. The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: effects of pH and ammonium chloride. **The Journal of General Virology**, 67, n. 9, p. 1941-1950, set. 1986.

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

GONZÁLEZ, G.; BENAVIDES, A.; FERNÁNDEZ, J. Manifestaciones Neurológicas del Dengue. **Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria**, v. 41, n. 1, p. 18-19, 2003.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500-09, fev. 2008.

GOULD, L. H.; FIKRIG, E. West Nile virus: a growing concern? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 8, p. 1102-1107, abr. 2004.

GOURINAT, A. C.; et al. Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84-86, jan. 2015.

GRANGE, L.; Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. **Frontiers in Immunology**, v.5, n. 280, p. 1-10, jun. 2014.

- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, jul. 1998.
- GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 3-11, dez. 2011.
- GUBLER, D. J. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases as Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, jul/ago. 2002.
- GUBLER, D. J.; et al. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2007.
- GUPTA, E.; DAR, L.; KAPOOR, G.; BROOR, S. The changing epidemiology of dengue in Delhi, India, **Virology Journal**, v. 3, n. 92, p. 1-5, nov. 2006.
- GURUKUMAR, K. R.; et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. **Virology Journal**, v. 6, n. 10, p. 1-8, jan. 2009.
- GUY, B.; et al. Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7100-7111, dez. 2015.
- GUZMAN, M.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet - Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, jan. 2002.
- GUZMAN, M.G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-65, jan. 2015.
- GUZMAN, M. G.; et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 7-16, dez. 2010.
- GUZMAN, M. G.; et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 9, p. 793-799, nov. 2000.
- HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, nov. 2007.
- HALSTEAD, S. B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 20, n. 6, p. 407-415, dez. 2006.
- HALSTEAD, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Editors). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Wallingford, UK: **CAB International**, 1997. p: 23-44.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, jan. 1988.
- HALSTEAD, S. B.; et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1474-1479, dez. 2004.
- HAMER, G. L.; et al. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 1, p. 125-128, jan. 2008.

- HANLEY, K.A.; WEAVER, S. C. Arbovirus Evolution. In: DOMINGO, E.; PARRISH, C.R.; HOLLAND, J.J. (Editors). **Origin and Evolution of Viruses**. Oxford: Elsevier, 2008. p. 351-392.
- HAUSE, A. M.; et al. Epidemiology of Dengue among Children Aged < 18 Months-Puerto Rico, 1999–2011. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 404-408, fev. 2016.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa, **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, set. 2009.
- HAYES, E. B.; GUBLER, D. J. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. **Annual Review Medicine**, v. 57, n. 1, p. 181-194, 2006.
- HAYES, E. B.; O'LEARY, D. R. West Nile virus infection: a pediatric perspective. **Pediatrics**, v. 113, n. 5, p. 1375-1381, may. 2004.
- HAYES, E. B.; et al. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infections Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1167-1173, ago. 2005.
- HEINEN, L. B. S.; et al. Saint Louis Encephalitis virus in Mato Grosso, Central – Western Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 215-220, mai/jun. 2015.
- HEINZ, F. X; ALLISON, S. L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Advances in Virus Research**, v. 59, n. 1, p. 63-97, 2003.
- HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301-4306, jun. 2012.
- HOLLIDGE, B. S.; GONZÁLEZ-SCARANO, F.; SOLDAN, S. S. Arboviral Encephalitides: Transmission, Emergence, and Pathogenesis. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 428-442, set. 2010.
- HOLMES, E. C.; BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 74-77, fev. 2000.
- HOLMES, E.C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 3, p. 405-409, mar. 1999.
- HORSTICK, O. et al. Reviewing the development, evidence base, and application of the revised dengue case classification. **Patholog Glob Health**, v. 106, n. 2, p. 94-101, 2012.
- HUE, K. D.; et al. Validation of na internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. **Journal of Virological Methods**, v. 177, n. 2, p.168-173, nov. 2011.
- IOOS, S.; et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302-307, jul. 2014.

ISHIKAWA, T.; YAMANAKA, A.; KONISHI, E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. **Vaccine**, v. 32, n. 12, p. 1326-1337, mar. 2014.

IWAMOTO, M.; et al. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 22, p. 2196-2203, mai. 2003.

JACKSON, S. T.; et al. Dengue infection in patients presenting with neurological manifestations in a dengue endemic population. **The West Indian Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 373-376, set. 2008.

JOHNSON, B. W.; RUSSEL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 4977-4983, out. 2005.

KARABSTOS, N. **International catalogue of arthropod-borne viruses**. 3 ed. San Antonio: American Society for Tropical Medicine and Hygiene, 1985.

KATZELNIC, L. C.; et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. **Science**, v. 349, n. 6254, p. 1338-1343, set. 2015.

KEIGHLEY, C. L.; et al. Viral exanthems. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, p. 139-150, abr. 2015.

KILPATRICK, A. M. Globalization, land use and the invasion of West Nile virus. **Science**, v. 334, n. 6054, p. 323-327, out. 2011.

KLIKS, S. C.; et al. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 2, p. 411-419, mar. 1988.

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. 2341-2355, dez. 2001.

KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. **Annual Review Entomology**, v. 53, n. 1, p. 61-81, 2008.

KUHN, R. J.; et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, mar. 2002.

KUKRETI, H.; et al. Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. **J Virol**, v.6, n.1. 2009.

KUMARIA, R.; CHAKRAVARTI, A. Molecular detection and serotypic characterization of dengue viruses by single-tube multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, n. 4, p. 311-316, ago. 2005.

KUNO, G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. In: MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F. A.; SHATKIN, A. J. (Editors). **Advances in virus research**. San Diego: Academic Press, 2003. p. 3-65.

KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviroses. **Journal of Virological Methods**, v. 72, n. 1, p. 27-41, mai. 1998.

KURANE, I.; ENNIS, F. E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Seminars in Immunology**, v. 4, n. 2, p. 121-127, abr. 1992.

LAI, C. Y.; et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **Journal of Virology**, v. 82, n. 13, p. 6631-6643, jul. 2008.

LANCIOTTI, R. S. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 61, n. 1, p. 67-99, 2003.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **The Journal of General Virology**, v. 78, n. 9, p. 2279-2286, set. 1997.

LANCIOTTI, R. S.; et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 96-105, jun. 2002.

LANCIOTTI, R. S.; et al., Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, ago. 2008.

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, mar. 1992.

LAROQUE, P. O.; et al. Levantamento soropidemiológico para arbovírus em macaco-prego-galego (*Cebus flavius*) de vida livre no Estado da Paraíba e em macaco-prego (*Cebus libidinosus*) de cativeiro do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 462-468, mai. 2014.

LAUGHLIN, C. A.; et al. Dengue research opportunities in the Americas. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 7, p. 1121-1127, out. 2012.

LEITE, R. C.; et al. Dengue infection in pregnancy and transplacental transfer of anti-dengue antibodies in Northeast, Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 60, n. 1, p. 16-21, mai. 2014.

LEITMEYER, K. C.; et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, jun. 1999.

LEVI, J. E. et al. Real-time symptomatic case of transfusion-transmitted dengue. **Transfusion**, v. 55, n. 5, p. 961-4, may. 2015.

- LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviroses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes and Infections**, v. 4, n. 3, p. 1-5, mar. 2015.
- LIBRATY, D. H.; et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infections Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165-1168, out. 2002.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Editors). **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1101-1152.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, n. 1, p. 23-61, 2003.
- LINKE, S.; et al. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. **Journal of Virology Methods**, v. 146, n. 1-2, p. 355–358, dez. 2007.
- LIU, W. J.; et al. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. **Journal of Virology**, v. 79, n. 3, p. 1934-1942, fev. 2005.
- LONG, M. T. West Nile Virus and Equine Encephalitis Viruses New Perspectives. **The Veterinary Clinics of North America – Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 523-542, dez. 2014.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. S. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
- LOW, J. G.; et al. The early clinical features of dengue in adults: challenges for early clinical diagnosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. 1-9, mai. 2011.
- LUM, L. C.; et al. Dengue encephalitis: a true entity? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 3, p. 256-259, mar. 1996.
- LUO, D.; VASUDEVAN, S. G.; LESCAR, J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. **Antiviral Research**, v. 118, n. 1, p. 148-158, jun. 2015.
- MACKENZIE, J. S.; GLUBER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 98-109, dez. 2004.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139-144, mar. 1954.
- MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 33-40, jan. 2013.

- MAIA, F. G.; et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 96-97, set. 2014.
- MALAVIGE, G. N.; et al. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 948, p. 588-601, out. 2004.
- MANEEKAN, P. et al. Development of single-tube mutiplex RT-PCR for dengue virus typing. *Southeast Asian Journal of Tropical Medine and Public Health*, v. 40, n. 6, p. 1254-1258, nov. 2009.
- MANN, B. R.; et al. Continued evolution of West Nile virus, Houston, Texas, USA, 2002-2012. **Emerging Infections Diseases**, v. 19, n. 9, p. 1418-1427, set. 2013.
- MANSFIELD, K. L.; et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **The Journal of General Virology**, v. 92, n. 12, p. 2821-2829, dez. 2011.
- MARANO, G.; et al. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. **Blood Transfusion**, v. 5, n. 1, p. 1-6, nov. 2015.
- MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2015. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822015005003102&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822015005003102&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 29 fev. 2016.
- MARKOFF, L. 5'- and 3'- noncoding regions in flavivirus RNA. **Advances in Virus Research**, v. 59, n. 1, p. 177-228, 2003.
- MARTELL, M.; et al. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 327-332, fev. 1999.
- MARTIN, D. A.; et al. Use of immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 544-549, mai. 2002.
- MATTAR, S.; et al. West Nile virus antibodies in Colombian horses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1497-1498, set. 2005.
- MAY, F. J.; et al. Biological, antigenic and phylogenetic characterization of the flavivirus Alfuy. **The Journal of General Virology**, v. 87, n. 2, p. 329-337, fev. 2006.
- MCMULLEN, A. R.; et al. Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. **The Journal of General Virology**, v. 94, n. 2, p. 318-325, fev. 2013.
- MENDEZ, J. A.; et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. **J Virol**, v. 7. 2010.
- MEERTENS, L.; et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 4, p. 544-557, out. 2012.

- 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. 1073-1075, 2012.
- MENDONZA, L. P.; et al. Viral infections of the central nervous system in Brazil. **Journal of Infection**, v. 54, n. 6, p. 589-596, jun. 2007.
- MEULEN, K. M.; PENSAERT, M. B.; NAUWYNCK, J. West Nile virus in the vertebrate world. **Archives of Virology**, v. 150, n. 4, p. 637-657, abr. 2005.
- MIAGOSTOVICH, M. P.; et al. Molecular Typing of Dengue Virus Type 2 in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 1, p.17-21, jan/fev. 2003.
- MILLER, S.; et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8873-8882, mar. 2007.
- MISRA, U. K.; et al. Central nervous system and muscle involvement in dengue patients: A study from a tertiary care center. **Journal of Clinical Virology**, v. 72, n. 1, p. 146-151, nov. 2015.
- MODIS, Y.; et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-319, jan. 2004.
- MONACO, F.; et al. Re-Emergence of West Nile Virus in Italy. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 7-8, p. 476-486, dez. 2010.
- MONATH, T. P.; HEINZ, F. X. Flaviviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Editors), **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia-New York: Raven Publishers, 1996. p. 961-1034.
- MONDINI, A.; et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging Infection Diseases**, v. 13, n. 1, p. 176-178, jan. 2007.
- MONDINI, A.; et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 40, n. 1, p. 84-86, 2007.
- MONTEIRO, E. S. C.; et al. Aspectos epidemiológicos e vetoriais da dengue na cidade de Teresina, Piauí – Brasil, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 4, p. 365-374, dez. 2009.
- MORALES, M. A. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p.1559-1561, out. 2006.
- MORITA, K.; et al. Rapid detection of virus genome from imported dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 44, n. 1, p. 54-58, 1994.
- MOSTASHARI, F.; et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. **Lancet**, v. 358, n. 9278, p. 261-264, jul. 2001.

- MOURÃO, M. P. G.; et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 20-26, jun. 2015.
- 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, jan. 2005.
- MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, v. 98, n. 2, p. 192-208, mai. 2013.
- MUÑOZ-JORDAN, J. L.; et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 100, n. 24, p. 14333-14338, nov. 2003.
- MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 299-309, ago. 2013.
- MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243-244, jul. 2015.
- MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. 595-596, out. 2014.
- MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, v. 68, n. 1, p. 53-55, jul. 2015.
- MUSSO, D.; et al., Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 14, p. 20761, abr. 2014
- MUSSO, D.; et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359-361, fev. 2015.
- MUSTAFA, M. S.; et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, jan. 2015.
- NARVAEZ, F. et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2011.
- NASH, D.; et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1807-1814, jun. 2001.
- NASSAR, E. S.; et al. Human disease caused by an arbovirus closely related to Ilheus virus: Report of five cases. **Intervirology**, v. 40, n. 4, p. 247-252, 1997.
- NAVECA, F. G.; et al. Complete genome sequence of a Dengue virus serotype 4 strain isolated in Roraima, Brazil. **Journal of Virology**, v. 86, n. 3, p. 1897-1898, fev. 2012.

NATURE, 2011. [http://www.nature.com/nature\\_education](http://www.nature.com/nature_education) (Figura estrutura do DENV).

NEERAJA, M.; et al. Unusual and rare manifestations of dengue during a dengue outbreak in a tertiary care hospital in South India. **Archives of Virology**, v. 159, n. 7, p. 1567-1573, jul. 2014.

NOGUEIRA, R. M.; EPPINGHAUS, A. L. F. 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. 255-256, mai. 2011.

NOGUEIRA, R. M.; ARAUJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 22, n. 5, p.358–363, nov. 2007.

NOGUERIA, R. M.; et al. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiology and Infection**, v. 111, n. 1, p. 163-170, ago. 1993.

NOGUEIRA, R. M.; et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1376-1381, set. 2005

NORMILE, D. **First New Dengue Virus Type in 50 Years**. Science. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/news/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>>. Acesso em 29 fev. 2016.

NUNES, M. R.; et al. Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 1-13, abr. 2014.

OEHLER, E.; LE HENAFF, O.; GHAWCHE, F. Neurological manifestations of dengue, **Presse Médicale**, v. 41, n. 10, p. 547-552, out. 2012.

OEHLER, E.; et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveillace**, v. 19, n. 9, p. 20720, mar. 2014.

OHAINLE, M.; et al. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. **Science Translational Medicine**, v.3, n. 114, p. 114-128, dez. 2011.

OLIVEIRA, M. F.; et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 576-578, mar. 2010.

OLIVEIRA MELO, A. S.; et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6-7, jan. 2016.

OLSON, J. G.; et al. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389-393, 1981.

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. 723-730, nov. 2013.

ORSINI, M.; et al. Síndrome de Guillain-Barré pós infecção por dengue: Relato de caso. **Revista de Neurociências**, v. 18, n. 1, p. 24-27, 2010.

OSANAI, C. H.; et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, jan/fev.1983.

PAHO - Pan American Health Organization. **Question and Answers: Zika and pregnancy**. 2016. Disponível em:  
<[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11552&Itemid=41672&lang=en.causes](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11552&Itemid=41672&lang=en.causes)>. Acesso em 29 fev. 2016.

PAPA, A.; et al. Detection of West Nile virus lineage 2 in Culex mosquitoes, Greece, 2012. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 9, p. 682–684, set. 2013.

PATEL, P.; et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, v. 10, n. 58, p. 1-11, 2013.

PATIL, J. A.; et al. Influence of evolutionary events on the Indian subcontinent on the phylogeography of dengue type 3 and 4 viruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1759-1769, dez. 2012.

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. 467-474, jun. 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. 1-11, fev. 2014.

PAZ, S. Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. **Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sciences**, v. 370, n. 1665, p. 1-11, fev. 2015.

PEELING, R. W.; et al. Evolution of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 30-38, dez. 2010

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369-377, ago. 2008.

PETERSEN, E. E.; et al. Interim guidelines for pregnant women during a Zika virus outbreak United States, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 2, p. 30-33, jan. 2016.

PETERSEN, E. E.; et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 1, p. 11-15, fev. 2016.

- PETERSEN, L. R.; HAYES, E. B. West Nile virus in the Americas. **The Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 6, p. 1307-1322, nov. 2008.
- PETERSEN, L. R.; HAYES, E. B. Westward ho? - The spread of West Nile virus. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 22, p. 2257-2259, nov. 2004.
- PETERSEN, L. R.; BRAULT, A. C.; NASCI, R, S. West Nile Virus: Review of the literature. **The Journal of American Medical Association**, v. 310, n. 3, p. 308-315, jul. 2013.
- PHOTAPREGADA, S.; KAMALAKANNAN, B.; THULASINGAM. Clinical Profile of Atypical Manifestations of Dengue Fever. *Indian Journal of Pediatrics*, v. 1, n. 1, p. 1-7, jan. 2016.
- PIAUI. Secretaria de Saúde do Piauí. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico de janeiro a outubro de 2012. **SINAN online**. SESAPI, 2012.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 2, p. 168-175, abr. 2012.
- PINHEIRO, F. P.; et al. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 30, n. 1, p. 145-148, jan. 1981.
- PINTO JUNIOR, V. L.; et al. Zika Virus: A Review to Clinicians. **Acta Medica Portuguesa**, v. 28, n. 6, p. 760-765, nov/dez. 2015.
- PIRES NETO, R. J.; Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 6, p. 843-852, jun. 2005.
- POERSCH, C. O.; et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 4, p. 272-277, abr. 2005.
- PUCCIONI-SOHLER, M.; ROSADAS, C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 73, n. 8, p. 698-703, ago. 2015.
- PUCCIONI-SOHLER, M.; et al. Diagnosis of HAM/TSP based on CSF proviral HTLV-I DNA and HTLV-I antibody index. **Neurology**, v. 57, n. 4, p. 725-727, ago. 2001.
- PUCCIONI-SOHLER, M.; et al. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. **Neurology**, v. 73, n. 17, p. 1413-1417, out. 2009.
- RAINWATER-LOVETT, K.; et al. Variation in dengue virus plaque reduction neutralization testing: systematic review and pooled analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 233, p. 1-15, 2012.
- REISEN, W. K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. **Advances in Virus Research**, v. 61, n. 1, p. 139-183, 2003.

- REYNES, J. M.; et al. Improved Molecular Detection of Dengue Virus Serotype 1 Variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3864-3867, ago. 2003.
- RICO-HESSE, R. Dengue virus evolution and virulence models. **Clinical Infection Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1462-1466, jun. 2007.
- RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue virus. **Advances in Virus Research**, v. 59, n. 1, p. 315-341, 2003.
- RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, n. 2, p. 479-493, fev. 1990.
- RICO-HESSE R.; et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244-251, abr. 1997
- RIGAU-PÉREZ, J. G.; et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-7, set. 1998.
- ROCA, Y.; et al. Molecular epidemiological analysis of dengue fever in Bolivia from 1998 to 2008. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 3, p. 337-344, jun. 2009.
- ROCCO, I. M.; BARBOSA, M. L.; KANOMATA, E. H. Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 151-154, mai/jun. 1998.
- 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 Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281-285, 2005.
- ROCHA, E. S.; et al. Recombinant envelope protein-based enzyme immunoassay for IgG antibodies is comparable to neutralization tests for epidemiological studies of dengue infection. **Journal of Virological Methods**, v. 187, n. 1, p. 114-120, jan. 2013.
- 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. 1, p. 2420-2427, out. 2010.
- 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. 1-8, nov. 2013.
- ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 946-951, abr. 2004.
- ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 257, n. 1, p. 1-6, abr. 1999.
- RUDOLPH, K. E.; et al. Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 882-891, mai. 2014.

- RUIZ, M. O.; et al. Local impact of temperature and precipitation on West Nile virus infection in *Culex* species mosquitoes in northeast Illinois, USA. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 19, p. 1-16, mar. 2010.
- RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, n. 3, p. 130-151, set. 2012.
- SABINO, E. C. et al. Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, p. 694-702, mar. 2016
- SA-NGASANG, A.; et al. Evaluation of RT-PCR as a tool for diagnosis of secondary dengue virus infection. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 56, n. 5-6, p. 205-209, out/dez. 2003.
- SALVADOR, F. S.; FUJITA, D. M. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. **Travel Medicine and Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 49-51, jan/fev. 2015.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, dez. 1977.
- SANTIAGO, G. A.; et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 1-15, jul. 2013.
- SANTOS, L. S. **Vigilância epidemiológica e análise molecular do Dengue virus no Piauí: busca de sorotipos atualmente circulantes**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.
- SANTOS, N. O. S.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 532 p.
- SCHATZMAYR, H. G. ; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 245-246, abr/jun. 1986.
- SCHLESINGER, J. J.; BRANDRISS, M. W.; WALSH, E. E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. **The Journal of General Virology**, v. 68, n. 3, p. 853-857, mar. 1987.
- SCHULER-FACCINI, L.; et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59-62, jan. 2016.
- SHARMA, C. M.; et al. Guillain-Barre syndrome occurring during dengue fever. **Journal of the Indian Medical Association**, v. 109, n. 9, p. 675-682, set. 2011.

- SHEPARD, D. S.; et al. Economic impact of dengue illness in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200-207, fev. 2011.
- SHIRYAEV S. A.; et al. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 9, p. 2081-2085, set. 2009.
- SILVA, J. R.; et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central – West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921-923, nov. 2013.
- SILVA, J. R. et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n.4, p. 414-417, jul. 2014.
- SIMON, O.; et al. Early Guillain–Barré Syndrome associated with acute dengue fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 77, n. 1, p.29-31, fev. 2016.
- SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, abr. 2012.
- SIMMONS, C. P.; et al. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 3, p. 416-424, ago. 2007.
- SIPS, G. J.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Neuroinvasive flavivirus infections. **Reviews in Medical Virology**, v. 22, n. 2, p. 69-87, mar. 2012.
- SIQUEIRA, J. B.; et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48-53, jan. 2005.
- SOARES, C. N.; et al. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 249, n. 1, p. 19-24, nov. 2006.
- SOARES, C. N.; et al. Oligosymptomatic dengue infection: a potential cause of Guillain Barre syndrome. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 66, n. 2, p. 234-237, jun. 2008.
- SOARES, C. N.; et al. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: Report of a case. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 150-152, fev. 2010.
- SOARES, C. N.; et al. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 303, n. 1-2, p. 75-79, abr. 2011.
- SOLOMON, T.; et al. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1053-1059, mar. 2000.
- SPINSANTI, L. I.; et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 1, p. 27-33, mai. 2008.

SPINSANTI, L. I.; et al. Risk factors associated with St. Louis encephalitis seroprevalence in two populations from Córdoba, Argentina. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 12, p. 1248-1252, dez. 2007.

SRIHONGSE, S.; JOHNSON, C. M. The first isolation of Bussuquara virus from man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p. 541-542, 1971.

STANDISH, K.; et al. High dengue case capture rate in four years of a cohort study in Nicaragua compared to national surveillance data. **PLOS Neglected of Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1-5, mar. 2010.

STEINHAUER, D. A.; DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. **Gene**, v. 122, n. 2, p. 281-288, dez. 1992.

STRAMER, S. L.; et al. West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 5, p. 451-459, ago. 2005.

TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 895-907, ago. 2012.

TEIXEIRA, M.G. et al Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, set/out. 2005.

TEIXEIRA, M.G. Recent Shift in Age Pattern of dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n. 10, p.1663, 2008.

TEIXEIRA, M. G.; et al. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000–2010): a systematic literature search and analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. 1-13, dez. 2013.

TEMPORÃO, J. G.; et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 938-940, mai. 2011.

TERZIAN, A. C. B.; et al. Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 3, p. 291-300, mar. 2011.

TERZIAN, A. C. B.; et al. Isolation and characterization of Mayaro virus from a human in Acre, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 401-404, fev. 2015.

TITTARELLI, E.; MISTCHENKO, A. S.; BARRERO, P. R. Dengue Virus 1 in Buenos Aires from 1999 to 2010: Towards Local Spread. **PLOS One**, v. 9, n. 10, p. 1-10, out. 2014.

TOGNARELLI, J.; et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665-668, nov. 2015.

TONRY, J. H.; et al. West Nile Virus Detection in Urine. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 8, p. 1294-1296, ago. 2005.

TURTLE, L.; GRIFFITHS, M. J.; SOLOMON, T. Encephalitis caused by flaviviruses. **QJM – An International Journal of Medicine**, v. 105, n. 3, p. 219-223, mar. 2012.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, C. E. A. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 2, p. 429-440, fev. 2003.

VALE, V. S. **Análise Molecular e Considerações Filogenéticas sobre o *Dengue virus***. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2015.

VAMVAKAS, E. C.; et al. The development of West Nile virus safety policies by Canadian blood services: guiding principles and a comparison between Canada and the United States. **Transfusional Medicine Reviews**, v. 20, n. 2, p. 97-109, abr. 2006.

VASCONCELOS, P. F. C.; et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 253-255, mai/jun. 1995.

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. (Editors). **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring Countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 72-99.

VASCONCELOS, P. F. C.; et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saude Publica**, v. 17, n. 1, p. 155-164, 2001.

VASILASKIS, N. The Daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in Southeast Asia. **3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**, Bangkok, Thailand 2013.

VASILAKIS, N.; et al. Evolutionary processes among sylvatic dengue type 2 viruses. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 9591–9595, set. 2007.

VEDOVELLO, D.; et al. First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. **Archives of Virology**, v. 60, n. 5, p. 1189-1195, mar. 2015.

VERHAGEN, L. M.; GROOT, R. Dengue in children. **The Journal of Infection**, v. 69, n. 1, p. 77-86, nov. 2014.

VIEIRA, M. A.; et al. Case report: West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 377-379, ago. 2015.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; ZANOTTO, P. M. A. Worldwide spread of Dengue virus type 1. **PLOS One**, v. 8, n. 5, p. 1-11, mai.2013.

- VU, T. T.; et al. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in Viet Nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. 1-11, jul. 2010.
- WAN, S. W.; et al. Current progress in dengue vaccines. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 1, p. 20-37, jun. 2013.
- WASAY, M.; KHATRI, I. A.; ALLAH, F. A. Arbovirus infections of the nervous system: current trends and future threats. **American Academy of Neurology**, v. 84, n. 4, p. 421-423, jan. 2015.
- WEAVER, S. C.; BARRET, A. D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews – Microbioly**, v. 2, n. 10, p. 789-801, out. 2004.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231-1239, mar. 2015.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, fev. 2010.
- WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 523-540, jul. 2009.
- WEBSTER, L. T.; FITE, G. L. A virus encountered in the study of material from cases of encephalitis in the St. Louis and Kansas city epidemics of 1933. **Science**, v. 78, n. 2019, p. 463-465, nov. 1933.
- WELSCH, S.; et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, p. 365-375, abr. 2009.
- WHITEHEAD, S. S.; et al. Prospects for a Dengue virus vaccine. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, jul. 2007.
- WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7221-7228, set. 2011.
- WHITLEY, R. J.; GNANN, J. W. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. **Lancet**, v. 359, n. 9305, p. 507-513, fev. 2002.
- WHO – World Health Organization. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New Edition. Geneva: World Health Organization, 2009.
- WHO – World Health Organization. **Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020**. Geneva: World Health Organization, 2012.
- WHO – World Health Organization. **WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations**. 2016.

Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/>>. Acesso em 29 fev. 2016.

WICHMANN, O.; et al. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. **Tropical Medicine & International Health**, v. 9, n. 9, p. 1022–1029, set. 2004.

WILLS, B. A.; et al. Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 9, p. 877-889, set. 2005.

WONG, P. S.; et al. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): A Potential Vector of ZIKV in Singapore. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. 1-5, ago. 2013.

XIE, X.; et al. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. **Journal of Virology**, v. 87, n. 8, p. 4609-4622, abr. 2013.

YU, L.; TAKEDA, K.; MARKOFF, L. Protein–protein interactions among West Nile non-structural proteins and transmembrane complex formation in mammalian cells. **Virology**, v. 446, n. 1-2, p. 365-377, nov. 2013.

YU, I. M., et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1834-1837, mar. 2008.

ZANLUCA, C.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, jun. 2015.

ZHANG, C.; et al. Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence. **Journal of Virology**, v. 79, n. 24, p. 15123–15130, dez. 2005.