



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ISABEL CRISTINA GUERRA GOMES

Caracterização molecular dos sorotipos da dengue e correlação dos índices pluviométricos e dos casos de dengue na Paraíba, no período de 2007-2015

João Pessoa – PB

2016

ISABEL CRISTINA GUERRA GOMES

Caracterização molecular dos sorotipos da dengue e correlação dos índices pluviométricos e dos casos de dengue na Paraíba, no período de 2007-2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima
Orientadora

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
Coorientador

João Pessoa – PB

2016

G633c Gomes, Isabel Cristina Guerra.

Caracterização molecular dos sorotipos da dengue e correlação dos índices pluviométricos e dos casos de dengue na Paraíba, no período de 2007-2015 / Isabel Cristina Guerra Gomes.- João Pessoa, 2016.

76f. : il.

Orientadora: Tatjana Keesen de Souza Lima

Coorientador: Ian Porto Gurgel do Amaral

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CB

1. Epidemiologia. 2. Dengue. 3. DENV. 4. Arbovírus.
5. Fatores climáticos. 6. Precipitação pluviométrica.

UFPB/BC

CDU: 616-036.22(043)

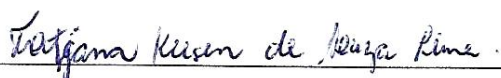
ISABEL CRISTINA GUERRA GOMES

Caracterização molecular dos sorotipos da dengue e correlação dos índices pluviométricos e dos casos de dengue na Paraíba, no período de 2007-2015

Dissertação de Mestrado apresentado a Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

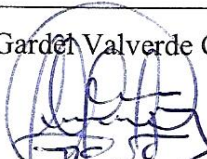
Aprovado em: 03 / 11 / 16

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª Dra. Tatjana Keesen de Lima Souza

Orientadora – UFPB


Dra. Joanna Garden Valverde Galvão


Prof. Dr. Edson Luiz Folador

À Deus, pois sei que esteve presente em todos os
momentos desta jornada, sem Ele nada seria.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ti, meu Deus, que me amaste antes mesmo que eu existisse! Pois foste Tu que nas alegrias caminhaste ao meu lado, nas dificuldades colocaste-me em Teus braços para que eu nada temesse. Que nessa nova etapa possa retribuir dignamente um pouco de tudo que Tu me ensinaste. Obrigado Pai, pois sem Ti nada seria!

Aos meus pais, Tiva e Kátia, meus primeiros professores, eternos amores de minha vida, que me ensinaram os primeiros passos, jamais poderei retribuir todo apoio, renúncias e sacrifícios, que bem sei foram muitos. Esta conquista é de vocês, viverei cada momento da minha vida de forma a honrá-los.

À minha irmã, Kilma, pelo companheirismo e amor incondicional. A toda à minha família por ter sonhado junto comigo, em especial, a minha vó Iraci, por sempre acreditar no meu potencial e a minha tia Sandra, por ter me acolhido em sua casa possibilitando essa nova conquista.

À minha orientadora, Tatjana Keesen, por me mostrar as possibilidades e ajudar-me a segui-las, por todo conhecimento compartilhado, pela confiança antes mesmo de me conhecer, pela dedicação e pela semente plantada do meu amor pela pesquisa. Obrigada por tornar realidade o que fora um dia uma mera fantasia.

Ao meu coorientador, Ian Amaral, pela disponibilidade e vontade sincera de ajudar sempre que necessário.

À família LABIDIC por terem me ajudado nessa caminhada, por terem tido paciência e me ensinado tudo, quando eu nada sabia, espero ter retribuído à altura. Aos colegas, amigos que nesse pequeno período de tempo tornaram-se irmãos, obrigada por tornarem mais suaves as dificuldades, afinal ninguém é autossuficiente, obrigada pelas palavras de apoio, pelo olhar de incentivo, e por compartilharam as mesmas angústias e aspirações. Amo todos incommensuravelmente!

Às minhas queridas amigas Bruna, Rephany, Juliana, Cinthia e Renata por serem a equipe ‘pós’ mais incrível que poderia existir, obrigada pelas planilhas analisadas, pelas noites e noites de experimento, pelas viagens em busca de amostras, por todos os momentos compartilhados nesta nossa luta conjunta, sendo eles de felicidade ou de desespero, e por terem me ensinado não só a respeitar nossas diferenças, mas também amá-las.

Ao professor Josélio Araújo, a todos do Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer da UFRN, especialmente Marília Farias, e ao professor

Celso Santos, pela presteza e disponibilidade para o ensino e realização das técnicas utilizadas nesse estudo.

Aos membros da banca Edson Luiz e Joanna Gardel que aceitaram fazer parte deste momento, pela disponibilidade e pelos comentários que tenham certeza só viram a engradecer esse trabalho.

À Secretaria de Saúde da Paraíba pela disponibilização dos dados da dengue e auxílio na comunicação com os hospitais para obtenção das amostras, em especial a Izabel Sarmiento e Anna Stella.

Aos pacientes que humildemente acreditaram nesse estudo, ensinaram-me a ser um ser humano melhor com essa humildade e paciência.

“Deus não perguntará quantas coisas boas você fez na vida, e sim quanto amor você colocou naquilo que fez.”

Madre Tereza de Calcutá

“É melhor tentar e falhar, que se ocupar a ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios, em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King

RESUMO

A dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e é uma infecção viral transmitida por mosquitos. A doença pode ser originada por qualquer um dos quatro sorotipos DENV que podem ser categorizados em: DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DEN-4. O principal vetor é o *Aedes aegypti*, seguido pelo *Aedes albopictus*, sendo a propagação da dengue atribuída à expansão de nichos dos vetores, bem como, pelo comércio global e aumento de viagens, a urbanização não planejada, e má gestão de resíduos e água. Dessa forma, o clima é considerado um fator importante na distribuição temporal e espacial das doenças transmitidas por vetores. Apesar de ser a arbovirose mais prevalente em todo o mundo, a dengue tem sido negligenciada nos últimos anos. Devido a recentes surtos epidêmicos de diferentes arbovírus, como zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) em todo o mundo, houve um alerta para as autoridades de saúde em relação a transmissão e propagação das arboviroses. Assim, este estudo avaliou a classificação e as características clínicas dos casos de dengue, obtidas a partir das fichas de notificação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). A incidência mensal de casos de dengue foi calculada pela população do ano/100.000 habitantes. A detecção e genotipagem dos sorotipos DENV utilizou a técnica *nested* RT-PCR, entre 2007-2015, e em 2016 para diagnóstico diferencial foi realizada a técnica PCR em tempo real (qPCR) para ZIKV e CHIKV. Além disso, este trabalho analisou a correlação entre a precipitação pluviométrica e casos de dengue entre 2007 e 2015, na cidade de João Pessoa - PB, Nordeste do Brasil. Os dados de precipitação foram coletados mensalmente através da sonda TRMM. A fim de identificar a influência dos casos de chuva e dengue, foram considerados diferentes modelos de defasagem distribuída. Os resultados mostraram que, em relação ao período de 2007 a 2015, foram notificados 55680 casos confirmados de dengue na Paraíba. Houve uma maior prevalência de infecção em indivíduos com idade entre 15-34 anos, em todos os anos estudados. Nossos resultados demonstraram a ocorrência da correlação ($r > 0.50$) entre a precipitação e casos de dengue, esses apresentaram um aumento nos primeiros meses após o período chuvoso, demonstrando, pois resultados mais significativos ao considerar um *lag* de três meses. O DENV-1 foi o vírus mais prevalente (80,48%) em todos os anos estudados e a co-circulação dos quatro sorotipos DENV foi observada em 2010, 2013 e 2014. Além disso, observou-se a circulação simultânea de casos de dengue, zika e chikungunya em 2016, demonstrando a predominância dos casos de zika, seguido dos casos de chikungunya. Portanto, a caracterização molecular e a análise de correlação entre número de casos de dengue e precipitação pluviométrica são ferramentas importantes no futuro desenvolvimento de predição não só de casos de dengue, como também das arboviroses emergentes no estado da Paraíba, como a zika e a chikungunya.

Palavras-chave: Epidemiologia, Dengue, DENV, Arbovírus, Fatores climáticos, Precipitação pluviométrica.

ABSTRACT

Dengue belongs to the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus* and is a mosquito-borne viral infection. Dengue can be originated by any of the four DENV serotypes that can be categorized into: DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4. The major vector is *Aedes aegypti* alongside with *Aedes albopictus*, and the spreading of dengue is attributed to the expansion in the niche of the vectors as well as by the global trade and travel increase, unplanned urbanization, and bad management of waste and water. Consequently, climate is considered an important factor in the temporal and spatial distribution of vector borne diseases. Despite being the most prevalent arbovirus disease worldwide, dengue has been neglected in the last years. Only through recent epidemic profile outbreaks of different arboviruses, such as zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) all around the world promoted an alert to health authorities towards those diseases. Thus, this study evaluated the clinical characteristics and classification obtained from Information System for Notifiable Diseases (SINAN) reporting files. The monthly incidence of dengue cases was calculated by year/100,000 inhabitants. The detection and genotyping of DENV was done using *nested* RT-PCR, between 2007-2015, and in 2016 differentiation diagnostic was performed with real time PCR (qPCR) for ZIKV and CHIKV. Besides, this study evaluated the correlation between rainfall precipitation and dengue cases from 2007 to 2015, in João Pessoa-PB, Brazil Northeast. Data of rainfall were collected monthly through TRMM probe. In order to identify the influence of rainfall and dengue cases different distributed lag models were considered. Concerning the period of 2007 to 2015, results showed 55680 confirmed cases of dengue were reported in Paraíba. There was a higher prevalence of infection in patients aged between 15-34 years in all studied years. Our results demonstrated that the correlation ($r > 0.50$) between rainfall and dengue cases occurrence increased in the first months after the rainy season, presenting more significant results considering a lag of three months. DENV 1 was the most identified virus (80.48%) in all studied years and co-circulation of the four DENV serotypes was observed in 2010, 2013 and 2014. Furthermore, we observed the simultaneous circulation of dengue, zika and chikungunya cases in 2016, and demonstrated a predominance of zika cases followed by chikungunya cases. Therefore, molecular characterization and correlation of dengue cases and rainfall data analyses may be useful for the future development of prediction technology towards dengue cases as well as others arboviruses, such as zika and chikungunya.

Keywords: Epidemiology, Dengue, DENV, Arbovirus, Climate factors, Pluviometric precipitation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas com risco de transmissão de dengue, 2009.....	18
Figura 2. Distribuição da epidemiologia da dengue no Brasil em 2012.....	19
Figura 3. Mosquitos do gênero Aedes.....	21
Figura 4. Organização genômica do vírus da dengue e suas proteínas resultantes.....	25
Figura 5. Classificação da dengue em níveis de gravidade de acordo com a Organização Mundial de Saúde.....	29
Figura 6. Respostas do vírus da dengue, antígenos e anticorpos utilizados no diagnóstico da dengue.....	30
Figura 7. Detecção e sorotipagem do vírus da dengue utilizando o teste de RT-PCR.....	39
Figura 8. Distribuição dos casos confirmados de dengue 2007-2015.....	43
Figura 9. Incidência de casos de dengue de 2007 a 2015.....	44
Figura 10. Distribuição mensal dos casos de dengue na Paraíba, o período de 2007-2015.....	45
Figura 11. Distribuição da precipitação pluviométrica (TRMM) no estado da Paraíba (2007–2014).....	46
Figura 12. Distribuição da incidência de dengue no estado da Paraíba (2007-2014).....	46
Figura 13. Hietograma com série temporal de chuva, de casos de dengue e função de correlação cruzada para o período de 2007-2015.....	49
Figura 14. Distribuição de gênero e faixa etária de casos confirmados de dengue na Paraíba, Brasil, 2007-2015.....	52
Figura 15. Soroprevalência de casos confirmados de dengue por anos na Paraíba, no período de 2007-2015.....	56
Figura 16. Soroprevalência de casos confirmados de dengue por gênero na Paraíba, no período de 2007-2015.....	56
Figura 17. Co-circulação de arboviroses na Paraíba no primeiro semestre de 2016.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para detecção e tipagem dos DENV.....	39
Tabela 2. Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).....	40
Tabela 3. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) para ZIKV.....	41
Tabela 4. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) para CHIKV.....	41
Tabela 5. Características clínicas de pacientes com dengue confirmada por ano na Paraíba de 2007-2015.....	52
Tabela 6. Sintomas apresentados em casos confirmados com dengue de 2007-2015.....	54
Tabela 7. Características de pacientes admitidos em hospitais com dengue confirmada na Paraíba de 2007-2015.....	55
Tabela 8. Testes de diagnóstico da dengue realizados na Paraíba de 2007 -2015.....	56
Tabela 9. Associação dos padrões clínicos dos pacientes com o sorotipo DENV na Paraíba de 2007-2015.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD: Anterior a dinastia de Han
Ae.: *Aedes*
BA: Bahia
pb: pares de base
C: Proteína estrutural do capsídeo viral
CHIKV: Vírus chikungunya
DENV: Vírus dengue
DENV-1: Sorotipo 1 dos vírus dengue
DENV-2: Sorotipo 2 dos vírus dengue
DENV-3: Sorotipo 3 dos vírus dengue
DENV-4: Sorotipo 4 dos vírus dengue
DcSA: Dengue com sinais de alarme
DsSA: Dengue sem sinais de alarme
DG: Dengue grave
E: Proteína estrutural do envelope
ELISA: Ensaio imunoenzimático indireto
FD: Febre da dengue
FHD: Febre hemorrágica da dengue
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
kDa: Quilodaltons
M: Proteína estrutural da membrana
NS: Proteína não estrutural do vírus
NS1: proteína não estrutural 1
NS2A: proteína não estrutural 2A
NS2B: proteína não estrutural 2B
NS3: proteína não estrutural 3
NS4A: proteína não estrutural 4A
NS4B: proteína não estrutural 4B
NS5: proteína não estrutural 5
OMS: Organização mundial de saúde
ORF: do Inglês *Open reading frame*

PB: Paraíba

PE: Pernambuco

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PrM: Proteína pré-membrana

RNA: Ácido ribonucleico

SCD: Síndrome do choque da dengue

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TRMM: do Inglês *Tropical Rainfall Measuring Mission*

ZIKV: Vírus Zika

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.2 VETOR.....	20
2.3 FATORES CLIMÁTICOS	22
2.4 AGENTE ETIOLÓGICO	23
2.4.1 Genoma do vírus da dengue	24
2.4.2 Replicação e patogênese do vírus da dengue	26
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	28
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	29
2.6.1 Teste sorológico	30
2.6.2 Detecção de antígeno – NS1	31
2.6.3 Transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) e isolamento viral	31
2.7 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	34
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
4.3 ÁREA DE ESTUDO	34
4.4 COLETA DE DADOS DE CASOS DE DENGUE	34
4.4.1 Critérios de elegibilidade de confirmados e suspeitos	35
4.4.2 Aperfeiçoamento dos dados notificados.....	35
4.5 OBTENÇÃO DE DADOS DE PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA.....	35
4.6 CORRELAÇÃO PRECIPITAÇÃO E CASOS DE DENGUE	36
4.7 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E BANCO DE AMOSTRAS.....	36
4.7.1 Obtenção de sangue total e soro para genotipagem.....	36
4.8 GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA DENGUE	37
4.8.1 Controles virais	37
4.8.2 RT-PCR (Reação de Polimerase em Cadeia por Transcrição Reversa).....	37
4.9 GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA ZIKA E CHIKUNGUNYA.....	39
4.9.1 qPCR (Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real) da Zika	40
4.9.2 qPCR (Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real) da Chikungunya	40

4.10 ANÁLISE DOS DADOS	41
5 RESULTADOS	42
5.1 CASOS CONFIRMADOS DE DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015.....	42
5.2 INCIDÊNCIA DOS CASOS DE DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015	43
5.3 DISTRIBUIÇÃO MENSAL DOS CASOS DE DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015	44
5.4 CORRELAÇÃO DOS CASOS DE DENGUE COM PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA EM JOÃO PESSOA NO PERÍODO DE 2007-2015.....	45
5.5 PERFIL CLÍNICO DOS CASOS DE DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015	49
5.6 SINTOMAS ASSOCIADOS COM A GRAVIDADE DA DOENÇA NO PERÍODO DE 2007-2015.....	51
5.7 HOSPITALIZAÇÕES POR DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015.....	53
5.8 EXAMES LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO NO PERÍODO DE 2007-2015.....	53
5.9 SOROTIPOS CIRCULANTES POR ANO, IDADE E GÊNERO NO PERÍODO DE 2007-2015.....	54
5.10 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA NO ANO DE 2016	56
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	73
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (UFPB)	73
ANEXO B - FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE DENGUE (SINAN) ANTIGA CLASSIFICAÇÃO DA OMS (1997).....	74
ANEXO C - FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE DENGUE (SINAN) COM A NOVA CLASSIFICAÇÃO DA OMS (2009).....	75

1 INTRODUÇÃO

O vírus da dengue, DENV, é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo (ENDY, 2014). Além disso, a dengue é a patologia mais amplamente disseminada nos países tropicais (ex: Sudoeste da Ásia, Nordeste da Austrália, Caribe, América Latina) e causa habitualmente epidemias tanto em áreas urbanas como de periferia, infectando anualmente cerca de 100 milhões de pessoas (GUZMAN et al., 2010).

No Brasil a dengue vem se tornando um problema de saúde crescente uma vez que a ocorrência dessas epidemias tem sido cada vez mais frequente em diversas cidades por todo o país (BARRETO e TEIXEIRA, 2008). Assim sendo, pesquisas têm sido realizadas de forma a esclarecer a epidemiologia e a circulação dos diferentes sorotipos da dengue no país (OLIVEIRA et al., 2010; GIBSON et al., 2013; GIBSON et al., 2014).

Embora a dengue seja uma entidade única de doença, ela possui várias apresentações clínicas e comumente apresenta uma patogenia e prognósticos imprevisíveis (WHO, 2009). A patogenia que caracteriza a gravidade da dengue ainda não é completamente entendida (LÜHN et al., 2007). Complicando o quadro existente, atualmente além da dengue está ocorrendo uma epidemia emergente sem precedentes de zika e chikungunya, como um novo risco para a saúde pública desde 2015. O problema no surgimento dessas arboviroses é que, apesar de possuírem peculiaridades que as distinguem da dengue, também compartilham sinais e sintomas que dificultam o diagnóstico diferencial clínico com precisão (MOULIN et al., 2016).

O vírus da dengue permanece na natureza em ciclos complexos envolvendo um ou mais vertebrados-reservatórios que podem ser humanos ou animais domésticos e insetos vetores (FARFAN et al., 1997). O principal vetor é o *Aedes aegypti* que se dissemina auxiliado pelo aumento de viagens e importações, urbanização sem planejamento, má administração de detritos e água, bem como a presença de reservatórios de água abertos ou fechados inadequadamente, os quais produzem o ambiente ideal para a produção da forma adulta do mosquito (GIBSON et al., 2014).

A distribuição de doenças transmitidas por vetores é determinada por uma complexa interação entre esses fatores sociais e ambientais, tais como chuva e temperatura (MESSINA et al., 2015). Por esta razão, alguns estudos têm analisado a influência de mudanças climáticas na dispersão de casos futuros de doenças transmitidas por vetores, como por exemplo, a dengue (ROGERS e RANDOLPH, 2006; BANU et al., 2011), zika e chikungunya (MOULIN et al., 2016).

Portanto, o presente estudo, tendo em vista a realidade da dengue no Brasil e no mundo e ao elevado número de indivíduos infectados ou passíveis de infecção, teve como objetivo central caracterizar molecularmente os sorotipos circulantes no estado da Paraíba nos anos de 2007 a 2015. Além disso, visou investigar a presença de outros arbovírus circulantes no estado após a emergência de casos em 2015 e avaliar a espacialização dos casos de dengue, com o auxílio de geotecnologias, e sua possível correlação com as variações pluviométricas.

O presente trabalho pode possibilitar a criação de estratégias diferenciadas, que permitam a prevenção da dengue através de um modelo de predição de casos futuros, direcionando a tomada de decisão de órgãos competentes no controle do vetor. Ademais, proporcionará o estudo da patogênese do vírus nos organismos humanos nos diversos sorotipos, contribuindo para o desenvolvimento de políticas públicas, procedimentos e atendimento específico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Os primeiros sintomas compatíveis com a dengue foram descritos na Enciclopédia médica chinesa em 992 AD (GUBLER, 2006). Durante o século 19, a dengue era considerada uma doença esporádica, causando epidemias com longos intervalos de tempo (WHO, 1999).

Contudo, mudanças drásticas nesse padrão têm ocorrido e, atualmente, o vírus da dengue é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo (ENDY, 2014), sendo a patologia mais amplamente disseminada nos países tropicais (ex: Sudoeste da Ásia, Nordeste da Austrália, Caribe, Latina América) (Figura 1) e habitualmente causa epidemias tanto em áreas urbanas como de periferia, infectando anualmente cerca de 100 milhões de pessoas (GUZMAN et al., 2010).



Figura 1. Áreas com risco de transmissão de dengue, 2009 (WHO, 2009).

Surto de dengue são registrados desde 1864, com relatos no Rio de Janeiro e com prováveis ocorrências no Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil durante o século 19 (FIGUEIREDO, 2000).

Nas décadas de 50 e 60 não houve mais relatos de mosquitos vetores da dengue no Brasil, graças a uma campanha de combate ao vetor da Febre Amarela que englobou os países da América Central e do Sul (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Porém, na década de 70, o *Ae. aegypti* voltou a ser encontrado no Brasil no município de Salvador (BA), e como o mosquito

se alastrou por países vizinhos, essa nova infestação não pôde ser eliminada (TAUIL, 2001; TAUIL, 2002).

Entre 2001 e 2007, aproximadamente 4 milhões de casos de dengue foram notificados na Américas, e mais de 75% desses casos foram notificados no Brasil (TEIXEIRA et al., 2013). A dengue vem se tornando um problema de saúde crescente no Brasil uma vez que a ocorrência dessas epidemias tem se tornado cada vez mais frequente em diversas cidades por todo o país (Figura 2) (BARRETO e TEIXEIRA, 2008). Pesquisas têm sido realizadas de forma a esclarecer a epidemiologia e a circulação dos diferentes sorotipos da DENV no país (OLIVEIRA et al., 2010; GIBSON et al., 2013; GIBSON et al., 2014).



Figura 2. Distribuição da epidemiologia da dengue no Brasil em 2012 (Ministério da Saúde, 2012).

A região Nordeste do Brasil ainda é uma região cujas condições socioeconômicas e ambientais favorecem a prevalência de um grande número de casos dessa doença (FREIRE, 2012). Em 1994, doze estados do Brasil documentaram casos da doença: Tocantins, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal, com a maior taxa de incidência na região Nordeste (112,2 casos / 100.000 habitantes) (FARES et al., 2015).

Uma pesquisa epidemiológica transversal de sorologia realizada em 2006, em Recife-PE, um estado do Nordeste do Brasil, mostrou prevalência de IgG do vírus da dengue em 80% da população, demonstrando que a maioria dos habitantes tinha sido infectada pelo menos uma vez por algum dos sorotipos do DENV (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011).

No Estado da Paraíba, durante o período de 1995 a 2012, um total de 229.922 casos de dengue foram notificados, com um total de 33 óbitos. O maior número de casos no ano de 2013 ocorreu nos municípios de João Pessoa, Campina Grande, Sousa, São João do Cariri, Santana de Mangueira, Remígio, Itaporanga, Santa Rita e Uiraúna. De 1º de janeiro a 30 de abril de 2014 foram notificados 2.052 casos suspeitos de dengue, dentre eles 05 classificados como dengue grave e 09 como dengue com sinais de alarme. (SECRETARIA DA SAÚDE DA PARAÍBA, 2014).

Recentemente, a circulação epidêmica de outras arboviroses, como Zika e Chikungunya, que apresentam sinais e sintomas semelhantes aos da dengue, tem dificultado ainda mais o diagnóstico clínico diferencial dessas doenças (MOULIN et al., 2016).

2.2 VETOR

Mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis*) possuem um importante papel na transmissão da dengue. O principal vetor é o *Aedes aegypti*, podendo o *Ae. albopictus* (Figura 3) agir como vetor dependendo da localização geográfica (WHO, 1999).

O *Ae. aegypti* é uma espécie antropofílica que se adaptou de forma excepcional ao ambiente urbano, sendo encontrado em locais próximos a habitações humanas. Acredita-se que tenha origem nas selvas africanas, e provavelmente foi disseminado mundialmente através do comércio de escravos durante os séculos XVII ao XIX. É um vetor eficiente do DENV devido à sua preferência para a deposição de ovos em recipientes artificiais e permanecendo no interior das residências, onde tem acesso ao seu hospedeiro ideal (RODHAIN e ROSEN, 1997).

O *Aedes albopictus* é um vetor secundário, e anteriormente a 1979, essa espécie era encontrada apenas na Ásia, sendo disseminada para o resto do mundo nas décadas recentes. Ao contrário do *Aedes aegypti*, é típico de áreas rurais e peridomiciliares. Preferem os ocos de árvores e recipientes naturais para depositar seus ovos, possuindo hábitos alimentares diurnos (GRATZ, 2004).

A disseminação dos vetores é auxiliada pelo aumento de viagens e importações, urbanização sem planejamento, má administração de detritos e a presença de reservatórios de água abertos ou fechados inadequadamente (GIBSON et al., 2014).

Os mosquitos apresentam um complexo ciclo de vida e durante seu desenvolvimento mudam de formas e habitats. As fêmeas geralmente depositam seus ovos em recipientes com água e suas larvas geralmente eclodem depois de uma precipitação de chuva. A larva evolui para pupa em cerca de uma semana, e para um mosquito em dois dias. (CDC, 2012).

Por isso, aumentos significantes nas populações de larvas são observados durante épocas chuvosas. Podendo ser esta uma das razões para a coincidência de epidemias de dengue e temporada de chuvas (THAVARA et al., 2001). Ademais, temperatura e umidade relativa afetam a propagação viral nos mosquitos (THU, AYE e THEIN, 1998). No entanto, existe uma importante adaptação dos vetores da dengue que dificultam o controle de suas populações. Em períodos de seca, os ovos conseguem resistir a um período de dessecação por vários meses (CDC, 2012).



Figura 3. Mosquitos do gênero *Aedes*. (Disponível em: <http://blogbiodna.blogspot.com.br/2015/01/febre-chikungunya-nova-epidemia-no.html>)

A existência da transmissão transovariana do vírus da dengue em fêmeas infectadas, permite a propagação do vírus para sua progênie. Este processo permite que a deposição de ovos funcione como um reservatório para manutenção do vírus em períodos inter-epidêmicos (JOSHI, MOURYA e SHARMA, 2002).

O ciclo de transmissão no vetor inicia-se através do repasto sanguíneo da fêmea do *A. aegypti* em um humano infectado. O vírus replica-se inicialmente no intestino médio do mosquito, seguido da hemocele e a hemolinfa do mosquito, e atingindo finalmente diversos tecidos do inseto. Após a replicação viral nas glândulas salivares, o mosquito infectado pode transmitir o vírus para outro ser humano (MALAVIGE et al., 2004).

2.3 FATORES CLIMÁTICOS

A distribuição de doenças transmitidas por vetores é determinada através de uma complexa interação entre fatores ambientais e sociais (MESSINA et al., 2015). Alguns estudos têm analisado a influência de mudanças climáticas na dispersão de casos futuros de doenças transmitidas por vetores, como por exemplo, a dengue (ROGERS e RANDOLPH, 2006; BANU et al., 2012), zika e chikungunya (MOULIN et al., 2016).

Por isso, estes estudos utilizam-se do fato que vários aspectos biológicos dessas doenças possuem um processo quantificável dependente de fatores meteorológicos específicos (MESSINA et al., 2015). Por exemplo, os maiores números de dengue no mundo são em regiões tropicais e subtropicais, devido às grandes variações de precipitação, temperatura e umidade do ar durante o ano (TIPAYAMONGKHOLGUL e LISAKULRUK, 2011).

O Brasil é considerado um país tropical, pois está localizado em zonas de baixa latitude, no qual climas quentes e úmidos prevalecem, com temperaturas médias em torno de 20°C. A variabilidade climática do Brasil ocorre devido à dimensão territorial, o tamanho da faixa costeira, variação de altitude e, principalmente, à presença de diferentes massas de ar que modificam as condições de temperatura e umidade das cinco regiões (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul). Por esta razão, o clima do país varia de climas muito quentes e úmidos provenientes de massas de ar equatorial, como é o caso de grande parte da região amazônica, para climas semiáridos, típica do sertão do Nordeste (MENDONÇA e DANNI-OLIVEIRA, 2007).

Fatores influenciadores na transmissão de doenças por vetores são: urbanização inadequada; alta densidade populacional; clima, como chuva, umidade e temperatura (MESSINA et al., 2015). A expansão urbana desordenada desencadeia o desenvolvimento de comunidades com pouca infraestrutura, incluindo os sistemas de água, esgoto e gestão de resíduos deficientes. Além disso, essas condições permitem o acúmulo de pneus e recipientes plásticos no ambiente urbano, potenciais reservatórios de água após as chuvas (TRAN et al., 2010; GUBLER, 2011). O ser humano é hospedeiro para o vírus da dengue, assim sendo a probabilidade de transmissão aumenta proporcionalmente com o aumento da densidade populacional (GUBLER, 1998).

Quanto aos fatores climáticos, a umidade possibilita a fecundidade do *Aedes*, enquanto a chuva preenche recipientes naturais e artificiais, produzindo locais ideais para a reprodução dos vetores. O aumento da temperatura, por sua vez influencia no desenvolvimento do vírus e na sobrevivência do vetor. Além disso, em altos níveis de temperatura e umidade, o tempo

necessário para o desenvolvimento viral diminui e consequentemente a transmissão é muito mais eficiente (CANYON, HII E MÜLLER, 1999).

Devido à inviabilidade de vacinas e tratamentos efetivos para o controle da dengue, talvez a melhor forma para minimizar o impacto da doença seja focando em medidas de controle do vetor, tais como, predizendo locais potenciais, destruindo locais de reprodução e aplicação de inseticidas (KHORMI e KUMAR, 2014).

Métodos de detecção de agrupamento tempo-espaço, sinalizados por uma alta densidade de ocorrência de eventos em determinados pontos do espaço e do tempo, são técnicas dinâmicas que são essenciais para determinação de quando, onde e em qual nível a doença está presente. Assim, essas técnicas são úteis na priorização na vigilância da dengue e controle do vetor (DEMPSEY et al., 2009; SOLANO et al., 2014). No entanto, o impacto de mudanças sócio-demográficas e climáticas na transmissão da dengue em áreas aglomeradas ainda necessita ser elucidada mais profundamente (JEEFOO et al., 2011; BANU et al., 2012).

2.4 AGENTE ETIOLÓGICO

Os vírus da dengue (DENV) estão inclusos na família Flaviviridae que é composta por três gêneros: O gênero *Flavivirus* (no qual estão agrupados os quatro sorotipos dos Vírus Dengue (DENV 1-4), Zika vírus (MOULIN et al., 2016), Vírus da Febre Amarela, Vírus do Oeste do Nilo e da Encefalite Japonesa), o gênero *Pestivirus* na qual inclui-se os vírus da diarreia bovina e da peste suína clássica, e o gênero *Hepacivirus*, no qual encontramos agrupados os vírus das hepatites C e G (HALSTEAD, 1988; GUBLER, 1998). Enquanto o vírus da chikungunya pertence à família Togaviridae, gênero *Alphavirus* (LANCIOTTI et al., 2007). A infecção por dengue pode ocorrer por qualquer um dos sorotipos da DENV que podem ser categorizados em 4: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUHA-SAPIR e SCHIMMER, 2005).

As diferenças genéticas entre os sorotipos da dengue são tão exacerbadas que podem até ser considerados espécies diferentes e apresentarem um comportamento patológico distinto (WHITEHORN e SIMMONS, 2011). A gravidade das infecções pelo vírus da dengue é geralmente mais associada ao DENV-2, seguido pelo DENV-1 e DENV-3, com o DENV-4 sendo raramente associado com quadros graves da doença (KYLE e HARRIS, 2008).

Também podem ser classificados em diferentes genótipos com base na variação de nucleotídeos, e essas diferenças genéticas podem ser associadas aos diferentes níveis de virulência (COLOGNA E RICO-HESSE, 2003), além disso, o genoma da DENV pode evoluir durante epidemias (CHEN et al., 2008).

Através de estudos filogenéticos constatou-se a existência de diferentes genótipos em cada sorotipo. O DENV-1 possui cinco genótipos circulantes, o genótipo I (Sudeste Asiático, China e África Oriental), o genótipo II (Tailândia), genótipo III (Malásia), o genótipo IV (Pacífico Sul) e do genótipo V (América/África) (KUKRETI et al., 2008). Desses genótipos, apenas o V possui evidências de circular no Brasil (CARNEIRO et al., 2012).

O DENV-2 possui cinco genótipos circulantes, sendo um silvestre e quatro urbanos (TWIDDY et al., 2002). Os genótipos urbanos são o “genótipo americano” (cepas isoladas na América Latina e outras isoladas entre os anos de 1950 e 1970 na Índia, no Caribe e Ilhas do Pacífico); o “genótipo cosmopolita” com ampla distribuição geográfica, estando presentes na Austrália, Ilhas do Pacífico, Sudeste Asiático, Índia, Ilhas do Oceano Índico, Oriente Médio e África; o “genótipo asiático/americano” (amostras oriundas da América Latina, Caribe, Vietnã e Tailândia e dois genótipos asiáticos); o “genótipo asiático 1”, (cepas isoladas na China, Filipinas, Sri Lanka, Taiwan e Vietnã) e o “genótipo asiático 2” (cepas oriundas da Malásia e Tailândia) (TWIDDY et al., 2002).

Também agrupando cinco genótipos está o sorotipo DENV-3. O genótipo I (vírus provenientes da Indonésia, Malásia, Filipinas e do Sul do Pacífico), o genótipo II (vírus da Tailândia, Bangladesh, Malásia e Mianmar) e o genótipo III (vírus do Sri Lanka, Índia, Samoa, África e das Américas). Já os genótipos IV e V possuem menor importância epidemiológica por serem compostos por cepas antigas oriundas de Porto Rico (GIV), Filipinas, Japão e China (GV) (LANCIOTTI et al., 1994; ARAÚJO et al., 2009).

O DENV-4 apresenta três genótipos, o Genótipo-1 (vírus das Filipinas, Tailândia e Sri Lanka), o genótipo-2 (vírus da Indonésia, Nova Caledônia, Taiti, Caribe e América do Sul) e o genótipo III (exclusivamente no ambiente silvestre da Malásia) (LANCIOTTI, GUBLER e TRENT, 1997).

2.4.1 Genoma do vírus da dengue

O vírus compreende uma partícula esférica, 40 – 50 nm em diâmetro, envolvido por um envelope de lipossacarídeo. Possui um genoma de RNA fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 11kb de comprimento, e uma única janela aberta de leitura (Open Reading Frame) que codifica três proteínas estruturais – capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E) – e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 4). Propriedades biológicas importantes dos vírus da dengue, incluindo ligação

de receptores, hemaglutinação de eritrócitos, indução de anticorpos neutralizantes e a resposta imune protetora estão associadas com a glicoproteína E (HALSTEAD, 2008).

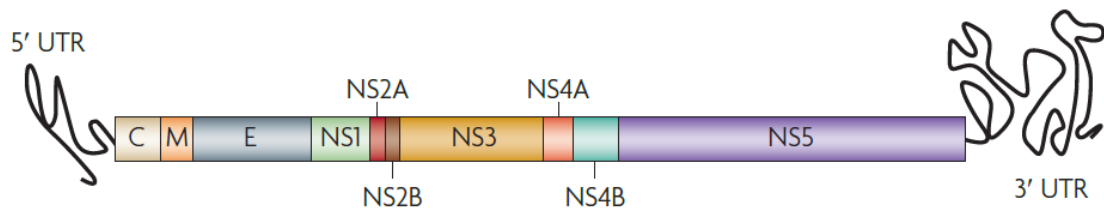


Figura 4. Organização genômica do vírus da dengue e suas proteínas resultantes (GUZMAN et al., 2010).

O capsídeo (C), proteínas do envelope (E) e a membrana precursora da proteína M (prM) estão localizadas na porção N-terminal da poliproteína, seguida pelas proteínas não-estruturais NS1-NS5 (NITSCHKE et al., 2014), sendo a proteína NS5 a que apresenta sequências nucleotídicas mais conservadas (MENDEZ et al., 2010).

O primeiro polipeptídeo sintetizado durante a tradução é a proteína C que tem peso molecular de aproximadamente 13,5 kDa. A proteína M (8 kDa) é produzida durante o processo de maturação da partícula viral na via secretora pela proteína precursora prM (21 kDa) (LINDENBACH et al., 2007).

A maior proteína do envelope do vírus é a glicoproteína de envelope (E) com 53 kDa, a qual tem papel fundamental na penetração do vírus na célula e montagem das partículas virais, além de ser o principal determinante antigênico dos vírus dengue (LINDENBACH et al., 2007; GUZMÁN e KOURÍ, 2004).

As funções das proteínas não-estruturais são parcialmente conhecidas. Mais significativamente, NS3 contém um domínio de protease, geralmente denotada como NS3pro, e um domínio de helicase. NS5 contém um metiltransferase de RNA e um domínio de RNA polimerase. Outras proteínas não estruturais provavelmente são parte do complexo de replicação (NITSCHKE et al., 2014).

Por exemplo, a proteína NS1 atua na fase inicial da infecção viral e sua interação com a proteína NS4A é essencial para atividade da replicase viral (LINDENBACH et al., 2007). A forma secretada é um alvo da imunidade humoral, assim como a glicoproteína E, e pode ter um papel essencial na patogênese da doença (CLYDE, KYLE, HARRIS, 2006).

Portanto, o vírus da dengue contém um genoma de RNA fita simples, que é replicado através de mecanismos de tradução do hospedeiro em conjunto com o RNA viral dependente de RNA polimerase. Em outros vírus de RNA, particularmente aqueles que não necessitam de

um vetor para a transmissão, como o vírus da hepatite C (VHC) que também pertence a família *Flaviviridae*, a baixa fidelidade da polimerase de RNA conduz a uma taxa extremamente elevada de mutação e uma grande diversidade genética do vírus. Embora esse efeito também tenha sido inicialmente previsto para o vírus da dengue, estudos recentes demonstraram que a estabilidade genética do vírus dengue é maior que a esperada (THAI et al., 2012; ROMANO et al., 2013).

No contexto do desenvolvimento de medicamentos, isto significa que as proteínas virais da dengue como potenciais alvos de drogas provavelmente terá uma menor tendência mutacional, causadoras de resistência, que a apresentada no vírus da hepatite C (NITSCHKE et al., 2014).

2.4.2 Replicação e patogênese do vírus da dengue

O processo de replicação tem início através da ligação e entrada do vírus nas células hospedeiras por endocitose, sendo esta mediada por receptores celulares específicos para proteínas do envelope viral. As primeiras células do hospedeiro suscetíveis ao vírus da dengue são as células dendríticas e outras células do sistema imune (JESSIE et al., 2004).

Os vírus da dengue são então internalizados em pontos da membrana ricos em clatrina e trafegam para o compartimento pré-lisossomal endocítico, onde o pH ácido promove a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma da célula (MODIS et al., 2004).

Com o genoma viral livre no citoplasma, inicia-se a replicação, que é encaminhada ao retículo endoplasmático rugoso para ser processado e iniciar a síntese de RNA, que consiste em partículas virais imaturas. Posteriormente, o amadurecimento das partículas virais ocorre durante a passagem através das vesículas do complexo de Golgi, onde é feita a glicosilação da glicoproteína-E e a prM é clivada por uma proteína do tipo furina, resultando na formação de partículas maduras, isto é, infecciosas. Por fim, estas são liberadas da célula através da exocitose (LINDENBACH et al., 2007).

A patogênese dos vírus dengue no organismo humano ainda é pouco compreendida. Após o repasto de uma fêmea de *Aedes aegypti* infectada, as partículas virais penetram através da pele do hospedeiro seguindo para os linfonodos regionais e subsequentemente atingindo a circulação sanguínea causando viremia, que é caracterizada pela ocorrência de febre (LUPU et al., 2007).

A partir do quarto dia de infecção, anticorpos da classe IgM podem ser encontrados no soro de indivíduos infectados, caracterizando uma informação importante para a realização de

testes diagnósticos rápidos. Ainda durante a primeira semana de infecção, os anticorpos da classe IgG, responsáveis pela imunidade específica, já podem ser detectados e permanecem detectáveis por muitos anos (LUPI et al., 2007). A presença de anticorpos específicos (IgG) explica o fato de um indivíduo só poder ser infectado uma única vez por cada um dos sorotipos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A combinação de fatores individuais de riscos pode ser atribuída a progressão da dengue, tais como infecção secundária, idade, etnia, doenças crônicas, entre outras (GUZMAN et al., 2010; OLIVEIRA et al. 2010). Por exemplo, crianças muito jovens são menos capazes de compensar vazamento capilar que adultos, portanto, são mais prováveis de adquirir um tipo de dengue mais grave (WHO, 2009). Sendo assim, o resultado da infecção provavelmente depende do balanço favorável ou não da resposta imune, genética do paciente, fatores virais e aspectos individuais do paciente.

Estudos sugerem que as células T podem auxiliar no controle da infecção pelos diferentes tipos de vírus da dengue devido a sua multifuncionalidade na resposta imune e talvez a perda dessa multifuncionalidade celular em infecções pode contribuir para o aumento da patogênese e consequente gravidade da doença (MATHEW, TOWNSLEY e ENNIS, 2014).

Durante a infecção ocorre ativação da imunidade celular e humoral, caracterizadas pela ativação de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e produção de anticorpos específicos a proteínas constituintes do envelope viral (LANCIOTTI et al., 1992). O papel protetor de células T durante infecções virais já está bem caracterizado. Geralmente, células T $CD8^+$ controlam a infecção viral pela produção de citocinas como o $IFN\gamma$ e o $TNF\alpha$ e por sua capacidade citotóxica. As células T $CD4^+$ podem também auxiliar no combate aos vírus devido a múltiplos mecanismos como ativação das células T $CD8^+$ e células B, além de contribuir com a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e respostas de memória (MATHEW, TOWNSLEY e ENNIS, 2014; WEISKOPF e SETTE, 2014).

Indivíduos com infecção primária por um sorotipo desenvolve proteção imunológica contra o mesmo sorotipo. Infecções secundárias dadas por outro sorotipo do vírus da dengue podem ocorrer e reativar células T e B de memória da infecção anterior o que pode levar a maior gravidade da doença (MATHEW, TOWNSLEY e ENNIS, 2014; WEISKOPF e SETTE, 2014).

Esse fenômeno é conhecido como *Antibody Dependent Enhancement* (ADE). Essa teoria sugere que anticorpos produzidos por uma infecção prévia são incapazes de neutralizar outro sorotipo em uma infecção secundária. A resposta imunológica durante uma infecção

secundária formaria imunocomplexos através de receptores Fc de monócitos e macrófagos. Estas células endocitariam os receptores permitindo a replicação livre do vírus. Dessa forma, observa-se uma otimização do processo de replicação viral (HALSTEAD 2003).

A grande maioria dos estudos tem focalizado o papel das células T na patogênese da dengue, poucos são os estudos que tem examinado o papel das células T na proteção da doença (CHATUVERDI et al., 2007). Dentro desse contexto, estudos demonstraram que polimorfismos nos genes do TNF α , podem estar associados com a dengue hemorrágica (FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004) e que polimorfismos de um único nucleotídeo do gene da IL-10, associados com baixos níveis de IL-10, se correlacionam com quadros hemorrágicos da dengue. Pesquisadores sugerem que alto TNF/baixo IL-10 ajuda a mediar a gravidade da dengue (PEREZ, et al., 2010).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A Organização Mundial de Saúde, com o objetivo de categorizar as manifestações comuns da dengue, desenvolveu um sistema de classificação, um guia com protocolos para controle, diagnóstico, classificação clínica e tratamento, este que foi inicialmente proposto em 1975 e revisado em 1997. As classificações eram agrupadas em: dengue clássica, febre hemorrágica da dengue (DHF) e síndrome do choque da dengue (DSS) (WHO, 1997).

No entanto, provou-se que em áreas endêmicas aplicar essa classificação era inviável, por isso, a OMS realizou um estudo para avaliar as limitações dessa classificação (BARNIOL et al., 2011). Em 2009, com os dados obtidos deste estudo, foi criada uma nova classificação que consiste em: dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Essa nova classificação, em níveis de gravidade, auxilia os médicos na tomada de decisão do curso e intensidade do tratamento do paciente (Figura 5) (WHO, 2009). O Brasil adotou esta classificação revisada da dengue a partir de janeiro de 2014.

De acordo com a WHO (2009), manifestações clínicas como febre entre 2 a 7 dias, náusea, vômitos, exantema, mialgia, artralgia, cefaleia, dor retro-orbital, petéquias e leucopenia podem ser considerados sintomas da dengue em pessoas que residem em regiões endêmicas ou tenham viajado nos últimos 14 dias para área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue ou tenha a presença do vetor. Ressalta-se que também pode ser considerado caso suspeito toda criança proveniente ou residente em área com transmissão de dengue, com quadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 dias, e sem foco de infecção aparente (WHO, 2009).

Em relação à dengue com sinais de alarme, os pacientes podem apresentar dor abdominal intensa e contínua, ou dor à palpação do abdômen; vômitos persistentes; acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural (lipotímia), hepatomegalia maior do que 2 cm, aumento progressivo do hematócrito, durante o período de defervescência da febre. Por último, a dengue grave deverá ser considerada quando o paciente apresentar um ou mais dos seguintes resultados: choque devido ao extravasamento grave de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior a três segundos, pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mmHg, hipotensão arterial e fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória, sangramento grave, segundo a avaliação do médico, comprometimento grave de órgãos tais como: dano hepático importante, sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos (WHO, 2009).

Essas manifestações clínicas específicas são causadas por uma série de alterações fisiopatológicas como aumento da permeabilidade vascular, lesões imunopatológicas nas paredes dos vasos e queda significativa no número de plaquetas (WHO, 1997).

Apesar de, na maioria dos casos, a administrações de fluidos intravenosos se mostrarem suficiente para o reestabelecimento das funções normais do paciente, é de extrema importância o monitoramento do mesmo, pois o quadro pode evoluir de forma rápida para um quadro mais grave (RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

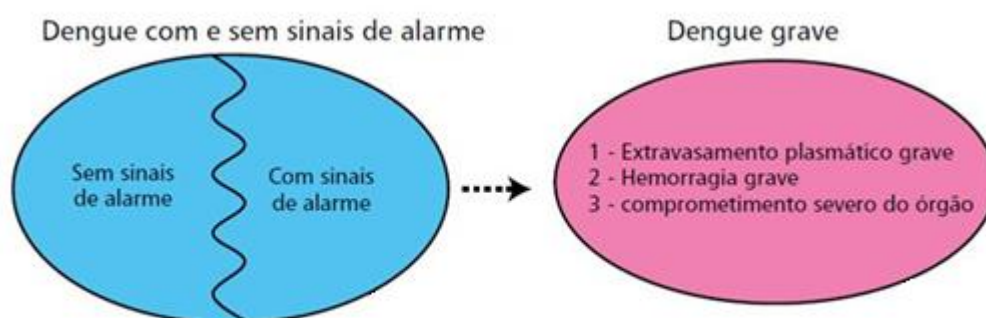


Figura 5. Classificação da dengue em níveis de gravidade de acordo com a Organização Mundial de Saúde (adaptado de WHO, 2009).

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A confirmação laboratorial da infecção pelo vírus da dengue é crucial, uma vez que o amplo espectro de apresentações clínicas (GUZMAN et al., 2010) e a co-circulação de diversos arbovirus com sinais e sintomas semelhantes (MOULIN et al., 2016) torna o diagnóstico clínico preciso bastante difícil (GUZMAN et al., 2010).

A preferência do método é diretamente relacionada à sua finalidade (diagnóstico clínico, vigilância epidemiológica, desenvolvimento de vacinas), do período de coleta da amostra, do laboratório onde serão realizadas as análises, dos profissionais e dos custos financeiros. Os métodos de diagnóstico da dengue compreendem a detecção do vírus, do material genético viral (RNA), de antígenos virais (ex: NS1) ou anticorpos (IgM ou IgG) (Figura 6) (NOGUEIRA et al., 1999; WHO, 2009).

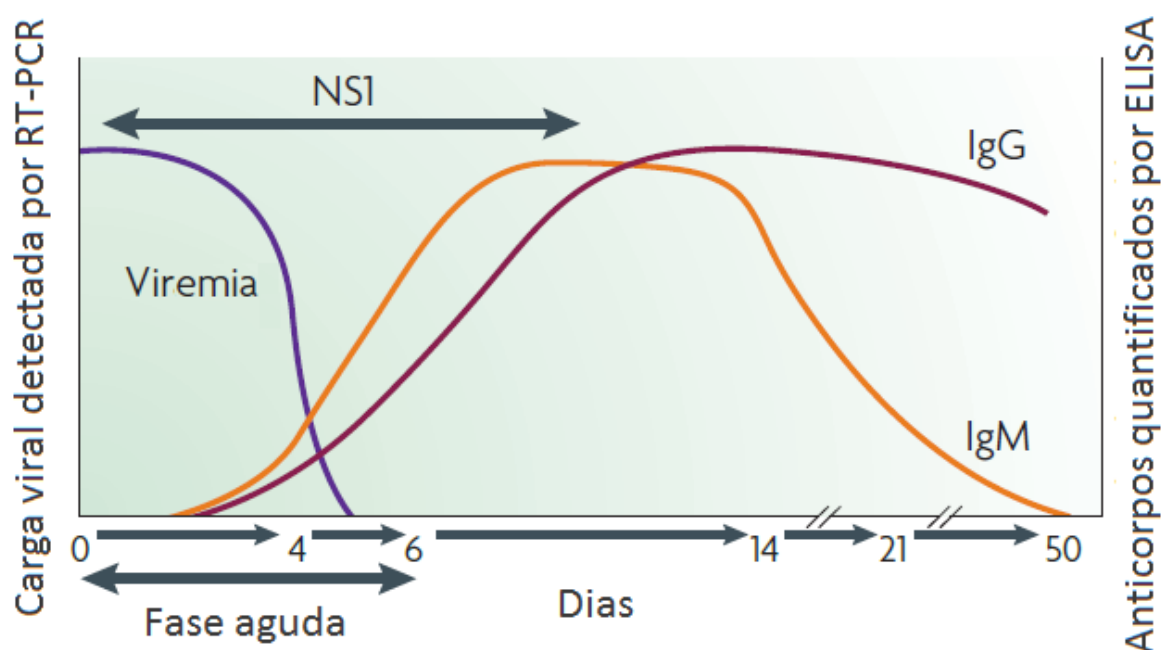


Figura 6. Respostas do vírus da dengue, antígenos e anticorpos utilizados no diagnóstico da dengue (Guzman et al., 2010).

2.6.1 Teste sorológico

Os testes sorológicos são mais comumente usados para o diagnóstico da infecção por vírus da dengue, já que são relativamente mais econômicos e fáceis de serem realizados em comparação com a cultura ou métodos baseados em ácidos nucleicos. Quando uma infecção por dengue ocorre em indivíduos que tenham sofrido uma infecção anterior, uma resposta imune secundária ocorre, o que gera níveis elevados de IgG através da estimulação de células B de memória, bem como uma resposta de IgM para a infecção atual (GUZMAN et al., 2010).

Entre os testes sorológicos utilizados estão: MAC-ELISA; IgG ELISA; razão de IgM:IgG: podendo ser utilizado para diferenciação entre infecção primária e secundária. A razão entre IgM:IgG em uma infecção primária é maior que 1.2 ou 1.4, em diluições do soro

do paciente, respectivamente, 1:100 e 1:20. Enquanto em infecções secundárias essas proporções devem ser menores que 1.2 ou 1.4 (SHU et al., 2003).

2.6.2 Detecção de antígeno – NS1

NS1 é uma glicoproteína produzida por todos os flavivírus, essencial para replicação e viabilidade viral. Por ser liberada na corrente sanguínea, testes foram criados para o diagnóstico de infecção por DENV utilizando NS1. Contudo os kits não são capazes de diferenciar entre os diferentes sorotipos DENV (XU et al., 2006).

2.6.3 Transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) e isolamento viral

O teste de RT-PCR mais comumente utilizado é a versão *nested*. A reação de PCR *nested* envolve uma reação inicial de transcrição reversa e amplificação que utiliza *primers* de regiões conservadas do genoma do vírus da dengue, seguido por uma segunda amplificação que é específica para os sorotipos. Os resultados dessa reação são separados através da eletroforese em géis de agarose, onde os sorotipos podem ser diferenciados em relação ao tamanho dos pares de bases (LANCIOTTI et al., 1992).

Recentemente surgiu a técnica de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), um teste de passo único que permite a titulação do vírus, através de sondas fluorescentes, sendo confirmada em aproximadamente 1 hora (CHIEN et al., 2006). Uma das vantagens do uso dessa técnica é a habilidade de titulação do nível viral, o qual pode ser relacionado com a gravidade da doença (VAUGHN et al., 2000).

A linhagem celular C6/36 do *Aedes albopictus* é o método de escolha para o isolamento viral do DENV, apesar de outras linhagens de mosquitos ou mamíferos também poderem ser utilizados. Identificação viral é realizada usando PCR e anticorpos monoclonais específicos para dengue em testes de imunofluorescência (GUBLER et al., 1985).

2.7 JUSTIFICATIVA

Devido ao exposto, o presente estudo visou descrever a incidência da dengue do estado da Paraíba, e analisar a influência das variações climáticas sazonais na distribuição dos casos de dengue no município de João Pessoa. Dessa forma, a utilização de tecnologias que avaliam a variabilidade climática associada aos casos de dengue pode proporcionar a criação de estratégias que permitam a prevenção da dengue através de um modelo de predição de

casos futuros, direcionando a tomada de decisão de órgãos competentes no controle do vetor, tendo em vista as adaptações do mosquito transmissor da dengue aos fatores abióticos.

Além disso, objetivou identificar a ocorrência dos sorotipos da dengue na Paraíba no período de 2007 a 2015, e co-circulação com outras arboviroses, como a zika e a chikungunya através de técnicas de caracterização molecular. Dessa forma, essa análise poderá auxiliar a saúde pública da Paraíba, diante do momento crítico relacionado a epidemias de Zika vírus e sua relação com a microcefalia (LIUZZI et al., 2016), assim como casos crescentes de Chikungunya (FARIA et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Distinguir os sorotipos co-circulantes da dengue (DENV 1-4) na cidade de João Pessoa e no Estado da Paraíba, entre 2007 a 2015, e correlacionar a precipitação de chuva com os casos de dengue, assim como identificar a co-circulação de outras arboviroses no ano de 2016.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as taxas de incidência anual da dengue na Paraíba e em João Pessoa entre 2007 e 2015;
- Avaliar as taxas de incidência da infecção em relação ao gênero e faixa etária;
- Relacionar os casos de dengue conforme classificação clínica e evolução da doença;
- Analisar a correlação entre os índices pluviométricos e os casos de dengue na Paraíba entre 2007 e 2015;
- Caracterizar molecularmente e monitorar os sorotipos circulantes, além de identificar o sorotipo predominante na Paraíba entre 2007 e 2015;
- Investigar a presença de outros arbovirus circulantes no estado da Paraíba no primeiro semestre de 2016.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo molecular e de geoprocessamento da dengue e outras arboviroses, descritivo e observacional do estado da Paraíba no período de 2007 a 2015.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi devidamente submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Número do Parecer: 862.521, na data 24/11/2014, CAAE: 36522414.2.0000.5183 (ANEXO A). O estudo foi realizado em parceria com a Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba.

4.3 ÁREA DE ESTUDO

O estado da Paraíba, região Nordeste do Brasil, consiste de uma área de 56.469,778 km² e possui uma população de 3.914.421 habitantes, 76% representados nas áreas urbanas, e densidade demográfica de 66,70 hab/km² (IBGE 2013). O estado está localizado a leste da Região Nordeste do Brasil, fazendo divisa com os estados do Rio Grande do Norte (norte), de Pernambuco (sul) e do Ceará (a oeste) e o Oceano Atlântico (a leste). A Paraíba está localizada entre as latitudes 6°S–8°S e longitudes 35°W–39°W, e sua situação climática é diretamente influenciada pela meso escala e grande escala de sistemas meteorológicos. A distribuição de precipitação de chuva na Paraíba é caracterizada por grandes variabilidades espaciais e temporais.

4.4 COLETA DE DADOS DE CASOS DE DENGUE

A dengue é considerada uma doença de notificação compulsória de acordo com o decreto nº104 do Ministério Brasileiro de Saúde. Por isso, fichas de notificação de casos suspeitos de dengue são obrigatoriamente preenchidas e computadas pelo Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) (ANEXO B e C). Obtivemos, através da Secretaria de Saúde da Paraíba, os dados compreendidos no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2015.

4.4.1 Critérios de elegibilidade de confirmados e suspeitos

Casos suspeitos incluem pessoas que vivem ou viajaram para áreas endêmicas de dengue que apresentaram sintomas clínicos (no período de 14 dias). Casos confirmados foram selecionados baseados na classificação de dengue (sinais e sintomas clínicos), e/ou através de confirmação laboratorial, tais como, sorologia (IgG e IgM), teste do NS1 e RT-PCR.

4.4.2 Aperfeiçoamento dos dados notificados

A nova taxonomia proposta pela Organização Mundial de Saúde (2009) para classificação da dengue só foi introduzida no Sistema de Saúde Brasileiro em 2014. Além disso, devido a dificuldades de classificação de casos graves, uma classificação intermediária foi criada no Brasil, dengue com complicações (DCC).

Assim, no presente estudo, ambas as nomenclaturas propostas pelo sistema de saúde brasileiro antes e depois de 2014 foram utilizadas e agrupadas na análise dos dados com base na similaridade das classificações. Portanto, agrupou-se: Febre da dengue (FD)/Dengue sem sinais de alarme (DsSA); Febre hemorrágica da dengue (FHD)/Dengue com sinais de alarme (DcSA)/Dengue com complicações (DCC); Síndrome do choque da dengue (SCD)/Dengue grave (DG).

As fichas de notificação apresentavam falhas de preenchimento, por isso, revisões manuais foram realizadas objetivando alcançar a precisão dos dados. Dados duplicados foram excluídos e parâmetros com falhas de digitação foram retificados.

4.5 OBTENÇÃO DE DADOS DE PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA

Dados referentes à precipitação foram estimados através do produto 3B42 V7 derivado do sensor a bordo do satélite TRMM e obtido através do Sistema de Visualização e Análise Online do TRMM, mantido pela NASA, disponível em: <http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/precipitation/tovas>. O 3B42 V7 cobre as regiões tropicais e subtropicais entre 50°N e 50°S com uma resolução temporal diária, ajustada a cada três horas e uma resolução espacial de 0.25° por 0.25°.

4.6 CORRELAÇÃO PRECIPITAÇÃO E CASOS DE DENGUE

A incidência mensal de casos de dengue foi calculada pela população do ano/100.000 habitantes, dados obtidos pelo IBGE. Para analisar a associação entre o índice pluviométrico e a incidência de casos de dengue utilizou-se o coeficiente de correlação das duas variáveis.

Obtivemos com isso uma covariância normalizada, assim o coeficiente de correlação de qualquer par de variáveis aleatórias fica restrito ao intervalo de (-1, +1). A normalização do resultado permite que diversos pares de variáveis sejam medidas na mesma escala (adimensional) e sejam comparadas diretamente. Coeficientes de correlação maiores que zero representam uma correlação positiva, enquanto menores que zero uma correlação negativa. Variáveis estatisticamente independentes têm coeficiente de correlação igual a zero (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001).

Fatores como: período de desenvolvimento embrionário, tempo de eclosão de larvas, tempo de desenvolvimento das formas imaturas e período de incubação (extrínseco e intrínseco); contribuem para explicar a necessidade de considerar o intervalo de tempo (*time lag*) na busca de associações entre as variáveis. Por isso, diversos modelos de distribuições de lag foram testados utilizando uma distribuição binominal negativa.

4.7 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E BANCO DE AMOSTRAS

As amostras foram selecionadas (n=47) de pacientes com até cinco dias do início do aparecimento dos sinais e sintomas compatíveis com infecção por dengue, provenientes do Hospital da Polícia Militar General Edson Ramalho (Hpmger) em João Pessoa e Hospital Materno Infantil João Marsicanano em Bayeux nos anos de 2015 e 2016. Um banco de dados foi criado para cada amostra, que recebeu um código de identificação para o controle interno (ex: DENG00). A participação nesta pesquisa ocorreu de forma voluntária, os indivíduos envolvidos foram esclarecidos sobre o objetivo e importância do estudo e assinaram o termo de consentimento esclarecido (TCLE).

4.7.1 Obtenção de sangue total e soro para genotipagem

As amostras foram acondicionadas em tubos com heparina e sem anticoagulante, e em fluxo estéril, foi transferido 1 mL de sangue total e soro, respectivamente, para eppendorfs identificados com código de controle interno. As amostras foram então congeladas no -20°C *overnight*, seguido do -80°C no dia posterior. As amostras foram mantidas a -80°C até o

momento da utilização. As informações disponíveis nas fichas de notificação e os resultados de diagnóstico foram armazenados em planilhas nos programas Microsoft Excel.

4.8 GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA DENGUE

4.8.1 Controles virais

O estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, que possui os controles virais de todos os sorotipos (DENV 1 – 4), previamente isolados através de materiais biológicos de pacientes com dengue confirmada nos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte.

4.8.2 RT-PCR (Reação de Polimerase em Cadeia por Transcrição Reversa)

Para realização da técnica de RT-PCR foi extraído o RNA viral das amostras de soro através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), seguindo protocolo predeterminado pelo fabricante. A detecção e genotipagem do DENV foi realizada através da metodologia previamente descrita por Lanciotti et al.(1992), uma vez que este protocolo detecta simultaneamente os quatro sorotipos.

De forma geral, foram utilizados primers consensuais (D1 - upstream e D2 - downstream) para anelar qualquer um dos quatro sorotipos após a síntese do DNA complementar (cDNA). Na segunda amplificação (nested PCR) foram utilizados *primers* específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 respectivamente (Tabela 1).

O Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de Pernambuco foi o responsável pelo processamento das amostras durante o período de 2007-2012. Enquanto em 2013 o processamento foi realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Em 2014, as amostras foram processadas pela Escola Técnica da Universidade Federal da Paraíba(UFPB). Em 2015 e 2016 as amostras foram analisadas pelo Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (UFPB) em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer (UFRN).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para detecção e tipagem dos DENV.

Oligonucleotídeo iniciador (Sentido do primer)	Sequência	Tamanho do amplicon
D1 (+)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG-3'	511
D2 (-)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	511
TS1 (-)	5'- CGTCTAGTGATCCGGGGG-3'	482 (D1 + TS1)
TS2 (-)	5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	119 (D1 + TS2)
TS3 (-)	5' TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	290 (D1 + TS3)
TS4 (-)	5' CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	392 (D1 + TS4)

O protocolo da 1ª etapa (transcrição reversa seguida de PCR) consistiu de um mix de reagentes descritos (Tabela 2) obteve-se, portanto, um total de 25µl do mix final. Os tubos foram transferidos imediatamente para o termociclador. Após a transcrição reversa (45°C por 45 minutos), a transcriptase reversa foi inativada (95°C por 2 minutos) e as amostras foram submetidas a 30 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C por 35 segundos), hibridização (56°C por 1 minuto), extensão (72°C por 2 minutos) e um tempo de extensão final (72°C por 10 minutos).

Na etapa *nested* PCR, foram diluídos em 1:100 os produtos obtidos da 1ª etapa em água deionizada (IDT, Iowa, USA) (2,5µl do produto da 1ª etapa + 247,5µl de água). Em outros tubos tipo eppendorf® de 0,3mL, foram adicionados 6,25µl de água livre de nucleases, 0,75µl dos iniciadores D1, TS1, TS2, TS3 e TS4 (100µM), 12,5µl do PCR Acessquick Master Mix (2x) (Promega, Madison, EUA) e 2,5µl da amostra diluída (Tabela 2). As amostras foram submetidas a ativação da enzima (95°C por 2 minutos) e em seguida, 18 ciclos de desnaturação (94°C por 35 segundos), hibridização (56°C por 1 minuto), extensão (72°C por 2 minutos) e um tempo de extensão final (72°C por 10 minutos).

Para a análise dos amplicons, foi realizada eletroforese a 100V por 60 minutos onde 5µl do produto amplificado acrescido de 2,5µl de GelRed® foram aplicados em um gel de agarose (BioAmerica, Inc., Miami, USA) a 1% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5X. Por fim, o gel foi visualizado em luz ultravioleta (Figura 7).

Tabela 2 - Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

Reagentes	Mistura para RT-PCR (1X)	Mistura para Semi-nested (1X)
Água livre de nucleases	8 µl	6,25 µl
100µM iniciador D1	0,75 µl	0,75 µl
100µM iniciador D2	0,75µl	-----
100µM iniciadores TS1-4	-----	0,75µl
5 U/µl enzima AMV-RT	0,5µl	-----
PCR Master Mix 2X	12,5 µl	12,5 µl
RNA	2,5µl	-----
cDNA da RT-PCR	-----	2,5µl

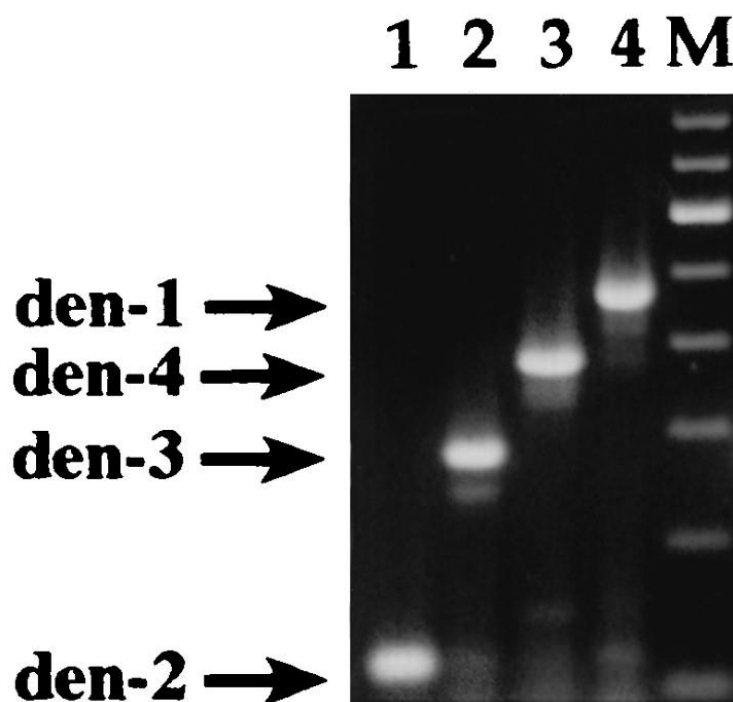


Figura 7. Detecção e sorotipagem do vírus da dengue utilizando o teste de RT-PCR. DENV-1 (482 pb), DENV-2 (119 pb), DENV-3 (290 pb), DENV-4 (389 pb) (HARRIS et al., 1998).

4.9 GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA ZIKA E CHIKUNGUNYA

Para realização da técnica de PCR em tempo real foi extraído o RNA viral das amostras de soro através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), seguindo protocolo predeterminado pelo fabricante. A detecção do ZIKV e CHIKV, seguindo protocolos específicos para cada um dos vírus, através da técnica de qPCR.

4.9.1 qPCR (Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real) da Zika

O protocolo da PCR em tempo real com TaqMan® para a zika consistiu de um mix de reagentes descritos (Tabela 3), obteve-se, portanto, um volume final de 10µl, do mix dos reagentes e RNA, por tubo. Os tubos foram transferidos para o termociclador de qPCR. A placa foi submetida aos seguintes parâmetros de termociclagem: Após a transcrição reversa (50°C por 5 minutos), a transcriptase reversa foi inativada (95°C por 20 minutos), e o DNA foi desnaturado (95°C por 15 segundos) seguido do anelamento/extensão (60°C por 1 minuto) em 40 ciclos subsequentes, finalizando em uma extensão final (60°C por 1 minuto), como proposto por Faye et al., 2013.

Tabela 3. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) para ZIKV.

Reagentes	Sequência	µl/tubo
TaqMan FAST Virus 1 Step Master Mix		2,5
Primer Zika _qPCR_F	5' AARTACACATACCARAACAAAGTG GT 3'	0,2
Primer Zika _qPCR_R	5' TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG 3'	0,2
Sonda Zika _qPCR_P	FAM 5' CTYAGACCAGCTGAAR 3'	0,2
dH ₂ O		1,9
RNA		5
FAM: 6-carboxyfluorescein. Y = T ou C, R = A ou G.		

4.9.2 qPCR (Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real) da Chikungunya

O protocolo da PCR em tempo real com TaqMan® para a chikungunya, baseado em Lanciotti et al., 2007, consistiu de um mix de reagentes descritos (Tabela 4), obteve-se, portanto, um volume final de 20µl, do mix dos reagentes e RNA, por tubo. Os tubos foram transferidos para o termociclador de qPCR. A placa foi submetida aos seguintes parâmetros de termociclagem: Após a transcrição reversa (95°C por 20 minutos), a transcriptase reversa foi inativada (95°C por 3 minutos), e o DNA foi desnaturado (95°C por 3 minutos) seguido de anelamento/ extensão (60°C por 30 minutos) em 40 ciclos subsequentes.

Tabela 4. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) para CHIKV.

Reagentes	Sequência	µl/tubo
TaqMan FAST Virus 1 Step Master Mix		2,5
Primer CHIKV 6856 F	5' TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA 3'	0,4
Primer CHIKV 6981 R	5' TTGACGAACAGAGTTAGGAACATAACC 3'	0,4
Sonda CHIKV 6919 P	FAM 5' AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG 3'	0,4
dH ₂ O		11,3
RNA		5
FAM: 6-carboxyfluorescein		

4.10 ANÁLISE DOS DADOS

O software do Microsoft Excel foi utilizado no armazenamento, seleção dos dados e geração de gráficos e tabelas. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SPSS 13.0 (IBM, USA), e um nível de significância de 5% nas análises de *cross-tabs* e qui-quadrado foi utilizado. O *time lag* da correlação das duas séries de variáveis foi realizado através do software MATLAB (Matrix Laboratory).

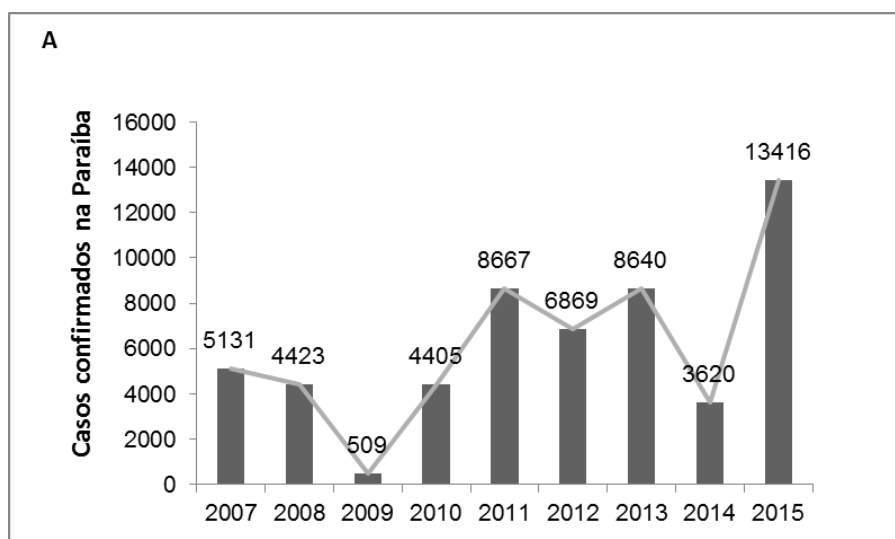
5 RESULTADOS

5.1 CASOS CONFIRMADOS DE DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015

As fichas de notificação (SINAN) do estado da Paraíba consistiram de 116.179 casos suspeitos e 55.680 casos confirmados de dengue. Dos suspeitos, 25.412 pertenciam ao município de João Pessoa, com 16.662 casos confirmados de dengue. Os resultados descritos em todo o estudo são referentes aos dados confirmados.

No estado da Paraíba a ocorrência dos casos de dengue apresentou-se uniformemente nos anos 2007 (n=5.131), 2008 (n=4.423), 2010 (n=4.405) e 2014 (n=3.620), enquanto que 2009 apresentou uma diminuição excepcional, quando apenas 509 casos de dengue foram notificados. Um aumento considerável foi observado nos anos 2011, 2012 e 2013 com 8667, 6869 e 8640 casos confirmados respectivamente. O ano de 2015 também apresentou aumento no número de casos, no entanto em proporções exorbitantes (n= 13.416) (Figura 8A).

Considerando os valores obtidos para João Pessoa, capital do estado paraibano, a flutuação de ocorrência de casos assemelhou-se a observada em todo estado da Paraíba, exceto em 2013, com valores de casos confirmados diminuídos (Figura 8B).



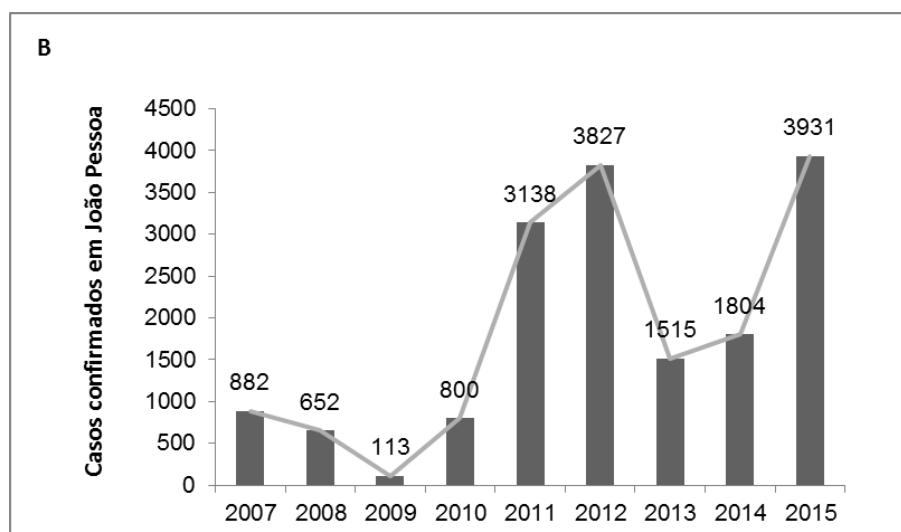
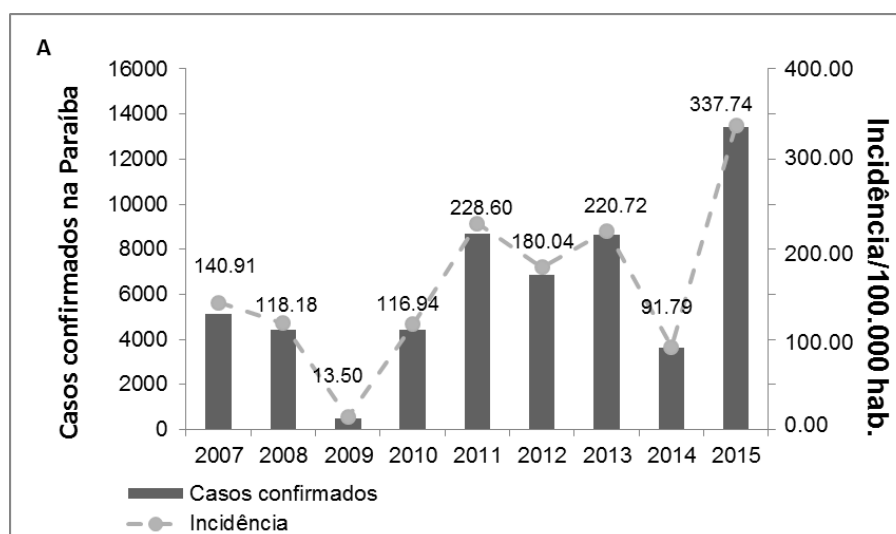


Figura 8. Distribuição dos casos confirmados de dengue 2007-2015. (A): Casos confirmados de dengue na Paraíba, Brasil, 2007 a 2015; (B) Casos confirmados de dengue em João Pessoa, Brasil, 2007 a 2015 (Elaboração própria, 2016).

5.2 INCIDÊNCIA DOS CASOS DE DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015

Os anos que apresentaram maior incidência na Paraíba foram 2015 (337,74/ 100.000 habitantes) e 2013 (220,72/ 100.000 habitantes) (Figura 9A), e em João Pessoa foram 2012 (515,43/ 100.000 habitantes) e 2015 (496,69/ 100.000 habitantes) (Figure 9B). Observou-se um limiar de 90,00 na incidência de casos, exceto em 2009, o qual demonstrou uma incidência de 13,50 para Paraíba e 16,09 para João Pessoa (Figura 9).



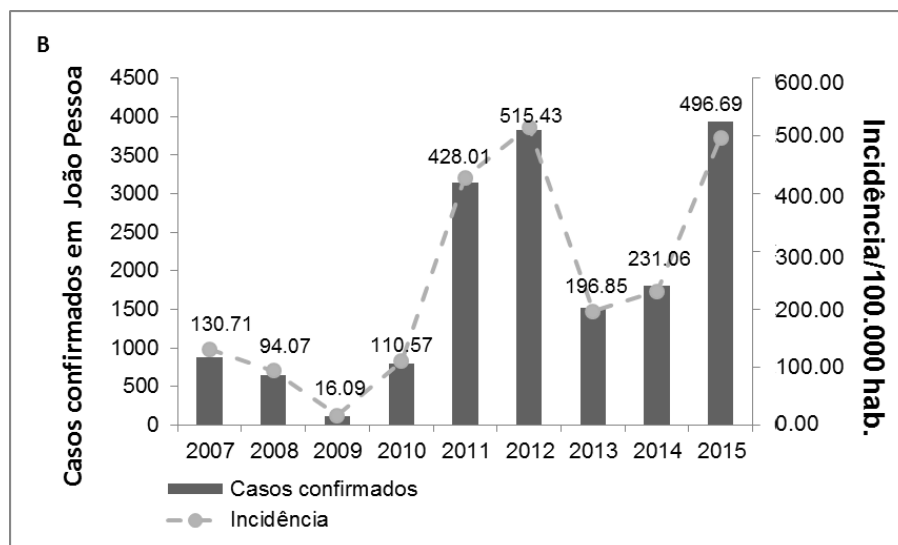


Figura 9. Incidência de casos de dengue de 2007 a 2015. (A) Incidência de casos de dengue na Paraíba de 2007 a 2015; (B): Incidência de casos de dengue em João Pessoa de 2007 a 2015 (Elaboração própria, 2016).

5.3 DISTRIBUIÇÃO MENSAL DOS CASOS DE DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015

Na distribuição temporal do presente estudo, avaliando casos de dengue por mês de 2007 a 2015, observou-se um padrão elevado de número de casos notificados entre os meses de março a agosto (Figura 10). Os meses de maior incidência em sua maioria foram abril e maio com 9.061 e 9.130 casos de dengue, respectivamente.

O ano de 2015 corroborou os dados padrões observados, apresentando picos nos meses de abril (2.426) e maio (2.965), entretanto o mês de dezembro demonstrou acentuado número de casos (2097), fato observado anteriormente apenas em 2009 (Figura 10).

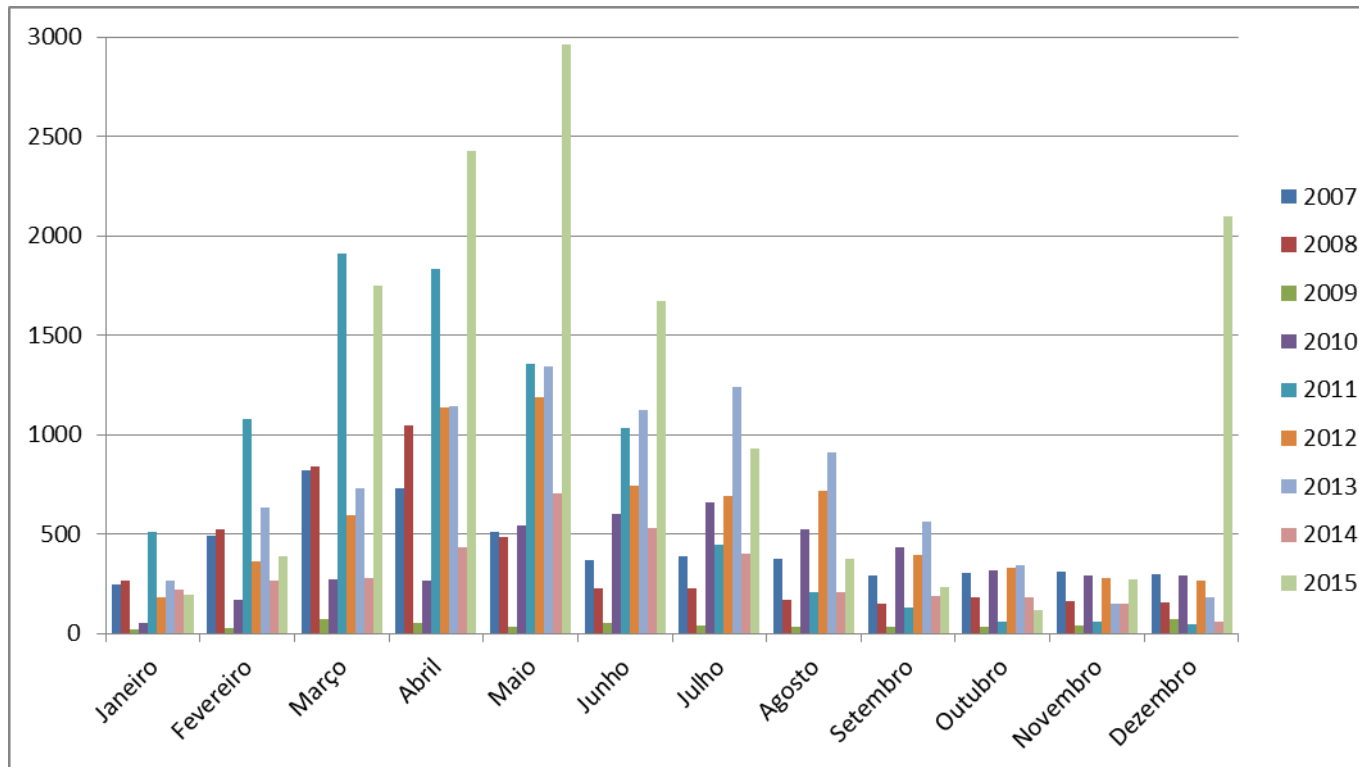
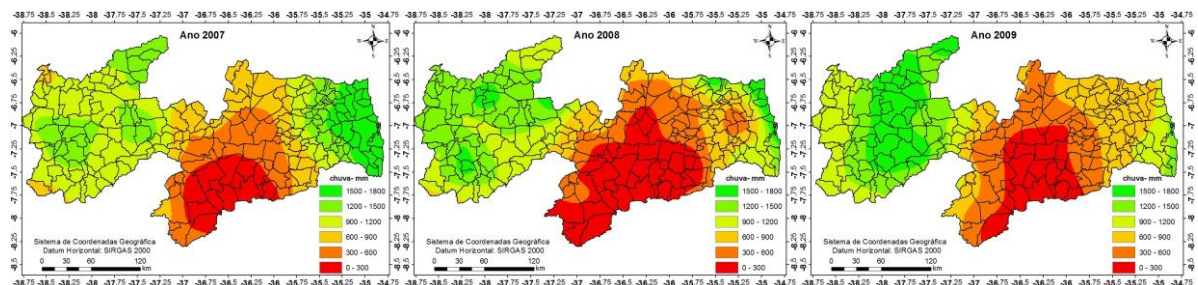


Figura 10. Distribuição mensal dos casos de dengue na Paraíba, no período de 2007-2015(Elaboração própria, 2016).

5.4 CORRELAÇÃO DOS CASOS DE DENGUE COM PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA EM JOÃO PESSOA NO PERÍODO DE 2007-2015

Os dados de precipitação pluviométrica, obtidos pelo satélite TRMM (Figura 11), assim como os dados de incidência de dengue espacialmente distribuída (Figura 12) por ano foram analisados. No entanto, estes dados não demonstraram de forma definitiva a correlação entre chuva e casos de dengue, por isso, análises mais específicas da função de correlação das duas variáveis foram realizadas através software Matlab (Figura 13).



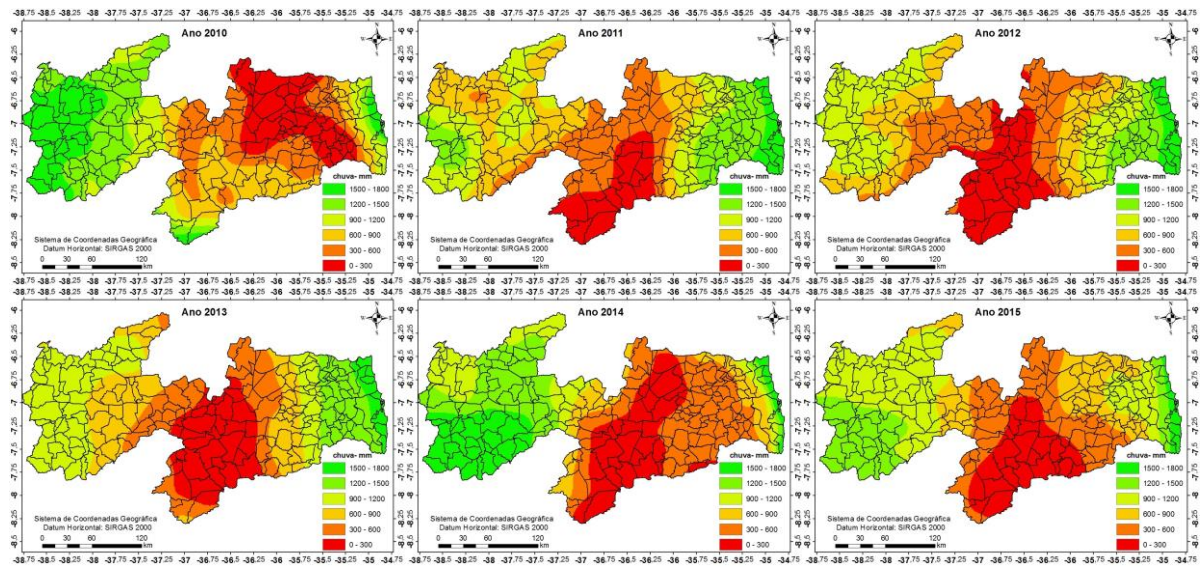


Figura 11. Distribuição da precipitação pluviométrica (TRMM) no estado da Paraíba (2007–2015) – regiões em vermelho representam menores precipitações pluviométricas, seguindo de forma gradual da escala de cor até as regiões verdes que representam as maiores precipitações pluviométricas (Elaboração própria, 2016).

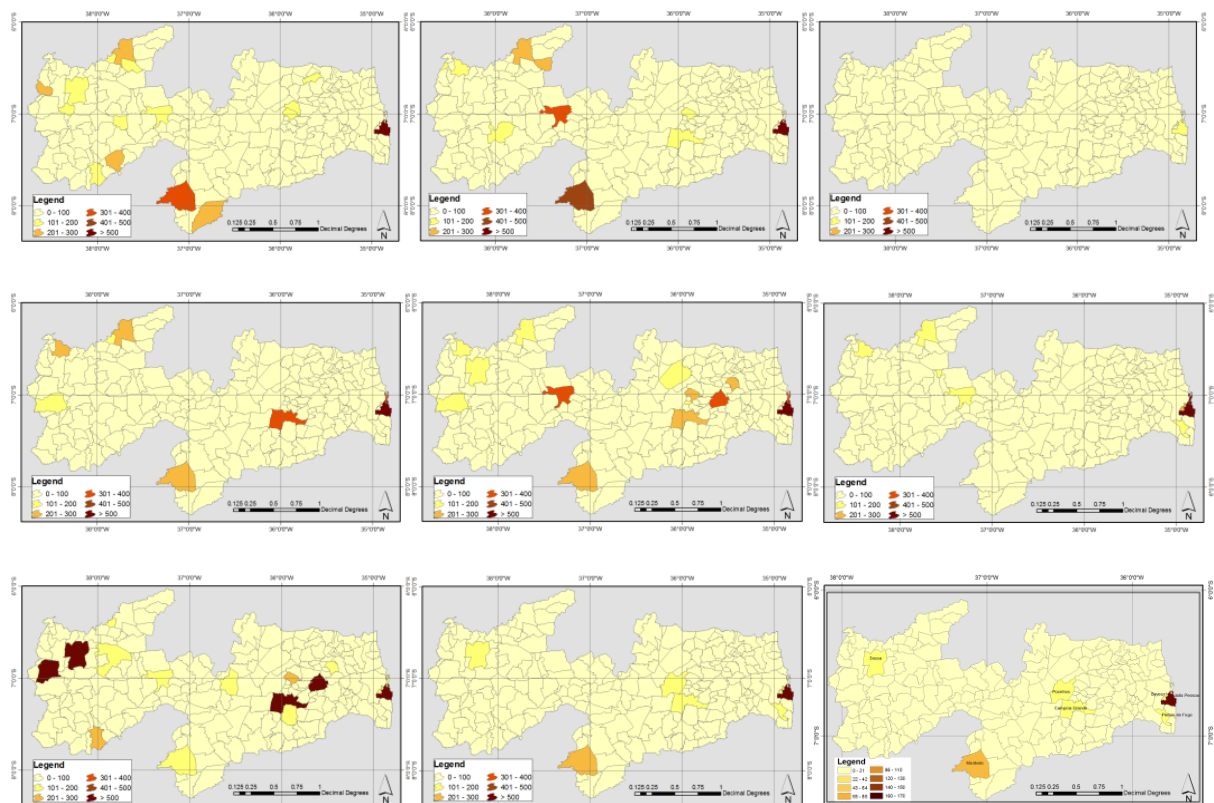


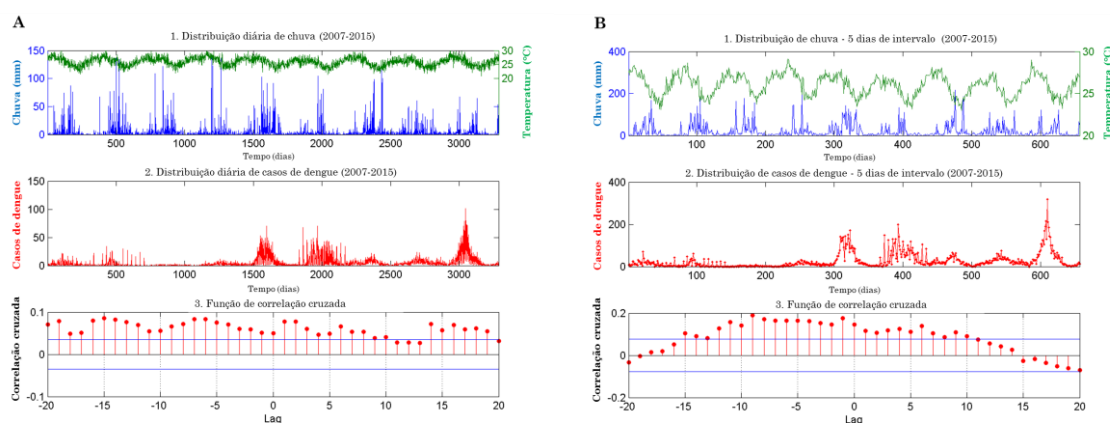
Figura 12. Distribuição da incidência de dengue no estado da Paraíba (2007-2015) - regiões em marrom escuro representam maiores concentrações de casos de dengue na população, seguindo de forma gradual na escala de cor até as regiões bege que representam as menores concentrações de casos de dengue (Elaboração própria, 2016).

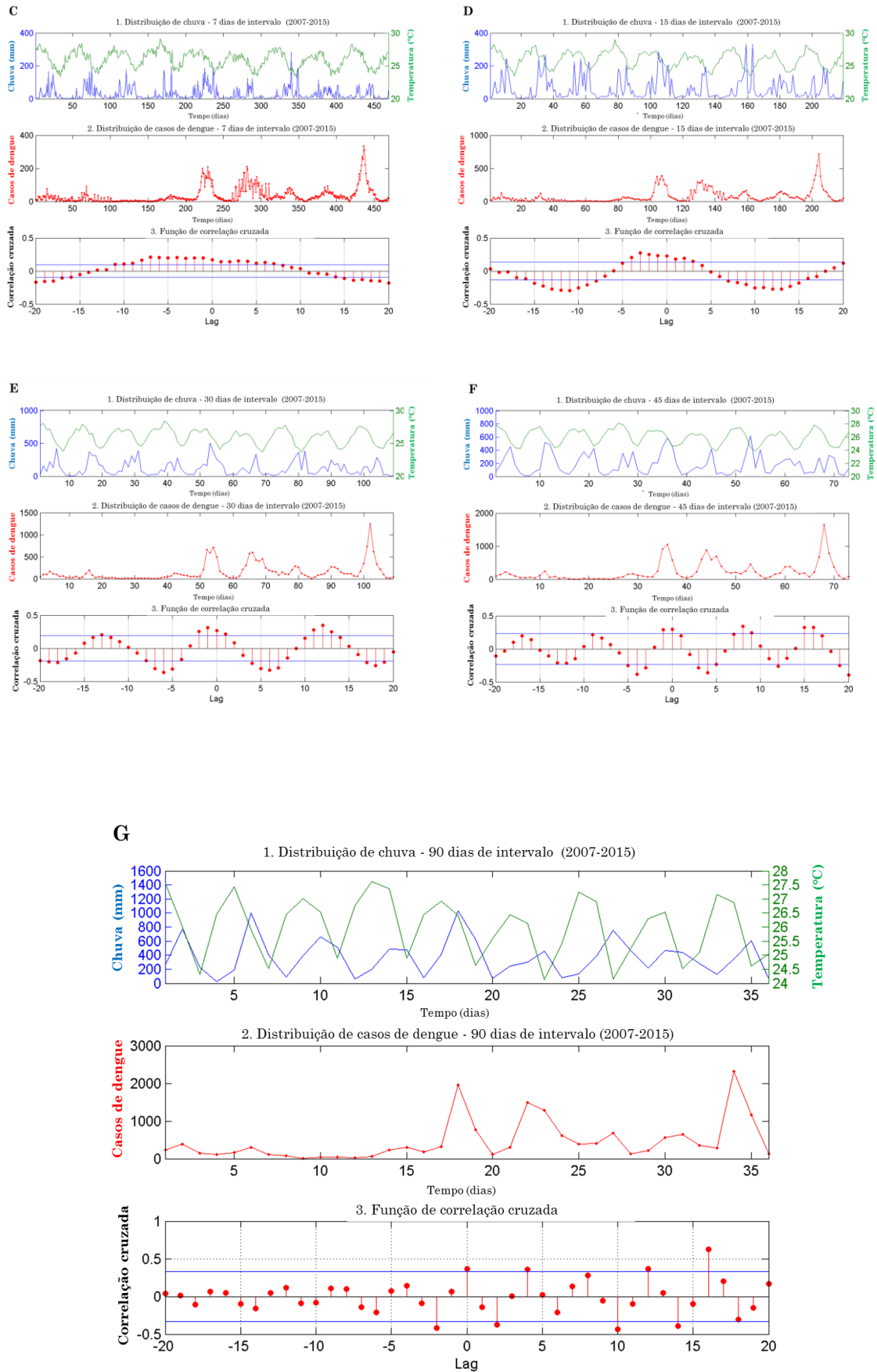
A figura 13A consiste da ilustração da distribuição de chuva, demonstrando a variabilidade de precipitação e temperatura no município de João Pessoa diariamente para o período de 2007 a 2015, da distribuição de incidência de dengue no mesmo período, e da função de correlação obtida entre as duas variáveis.

Contudo, apesar da incidência de casos flutuar em relação às condições climáticas, devido a sua influencia no aumento da quantidade de criadouros, a chuva de um determinado dia não consegue contribuir para explicar o número de casos do dia seguinte (correlação diária). Por isso, com intuito de caracterizar a correlação foram necessárias as análises dos números de incidência da dengue e sua relação com a precipitação de forma agrupada. Foram então distribuídos em nove intervalos de tempo: diariamente, 5 dias, 7 dias, 15 dias, 30 dias, 45 dias, 90 dias, 180 dias e 365 dias (Figura 13A–13I).

A função de correlação entre a precipitação e a ocorrência de casos de dengue demonstrou aumento nos primeiros meses após os meses chuvosos, assim, percebe-se que entre os meses de março a agosto, houve a maior quantidade de casos de dengue devido ao aumento dos índices pluviométricos, levando em consideração que o município em estudo possui maior quantidade de chuva nas estações outono-inverno.

A associação da precipitação com o lag de três meses (Figura 13G) apresentou a associação mais significativa com o número de casos de dengue, representado pelo coeficiente de correlação $r > 0,5$.





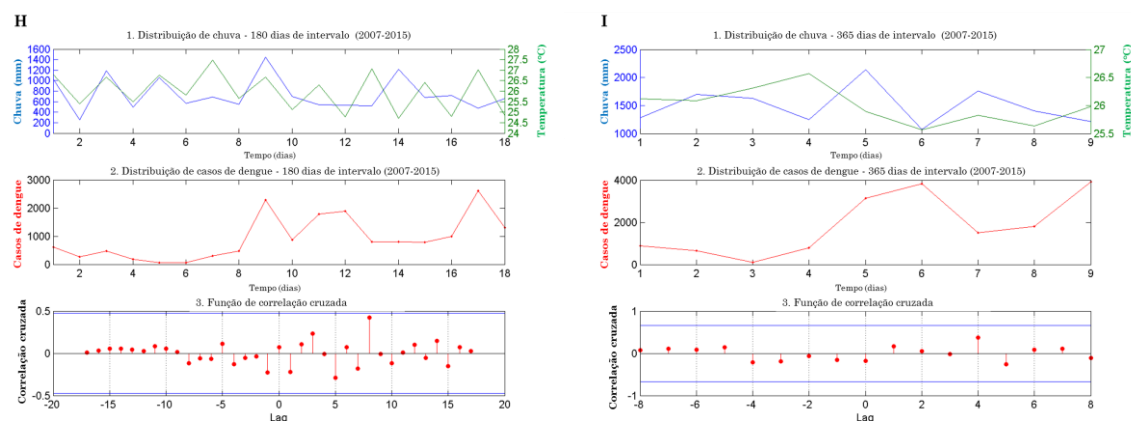


Figura 13. Hietograma com série temporal de chuva, de casos de dengue e função de correlação cruzada para o período de 2007-2015: (A) diária, (B) 5 dias de amplitude, (C) 7 dias de amplitude, (D) 15 de amplitude, (E) 30 dias de amplitude, (F) 45 dias de amplitude, (G) 90 dias de amplitude, (H) 180 dias de amplitude, (I) 365 dias de amplitude (Elaboração própria, 2016).

5.5 PERFIL CLÍNICO DOS CASOS DE DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015

A classificação dos casos de pacientes confirmados no período de 2007 a 2015 foi realizada através da classificação clínica e epidemiológica implementada pela OMS e aplicada pelo sistema de saúde. Destes, 54.448 foram classificados com Febre da dengue/Dengue sem sinais de alarme, 787 como Febre hemorrágica da dengue/ Dengue com complicações/ Dengue com sinais de alarme e 379 como Síndrome do choque da dengue/ Dengue grave. Considerando a evolução apresentada pelos pacientes, a cura ($n=49.969$) foi o parâmetro predominante em todos os anos (Tabela 5).

Ademais, a população estudada foi caracterizada de acordo com distribuição do gênero e da idade (Figura 14). Considerando o fator gênero, as mulheres apresentaram a maior predominância, compreendendo 58,8% do total da população analisada ($p=0,0001$). A idade média de casos confirmados foi de 30,12 anos ($DP = \pm 18,73$). O grupo feminino apresentou maior predominância entre as idades 20-24 ($n=3.230$), 25-29 ($n=3.378$) e 30-34 ($n=3.189$). Enquanto os homens demonstraram picos de acometimento nas faixas etárias de 15-19 ($n=2.302$), 20-24 ($n=2.469$) e 25-29 ($n=2.348$).

Tabela 5. Características clínicas de pacientes com dengue confirmada por ano na Paraíba de 2007-2015.

Parâmetros	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		2015		Total		Valor de p
	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	(N)	(%) ¹	
Antiga/Nova Classificação																					p=0.0001
FD/DsSA	5011	97,66	4311	97,47	496	97,45	4299	97,6	8407	97,00	6714	97,74	8495	98,32	3398	93,87	13317	99,25	54448	97,90	
FHD/DCC/DcSA	25	0,49	52	1,18	3	0,59	68	1,54	140	1,62	117	1,70	97	1,12	198	5,47	87	0,64	787	1,41	
SCD/DG	94	1,83	59	1,33	10	1,96	32	0,73	99	1,14	36	0,52	24	0,28	12	0,33	13	0,09	379	0,68	
Evolução																					p=0.0001
Cura	4897	95,44	3662	82,79	465	91,36	4048	91,9	7910	91,27	6467	94,15	7553	87,42	2885	79,70	12082	99,92	49969	99,75	
Morte por dengue	0	0,00	4	0,09	1	0,20	5	0,11	8	0,09	13	0,19	19	0,22	8	0,22	6	0,04	64	0,12	
Morte por outras causa	0	0,00	0	0,00	43	8,45	0	0,00	3	0,03	5	0,07	2	0,02	0	0,00	2	0,01	55	0,10	
Morte em investigação	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,01	0	0,00	3	0,08	1	0,01	5	0,01	

¹ Os números relativos são comparados aos valores totais de casos confirmados, incluindo dados ignorados do paciente que não estão demonstrados nessa tabela.

FONTE: Elaboração própria, 2016

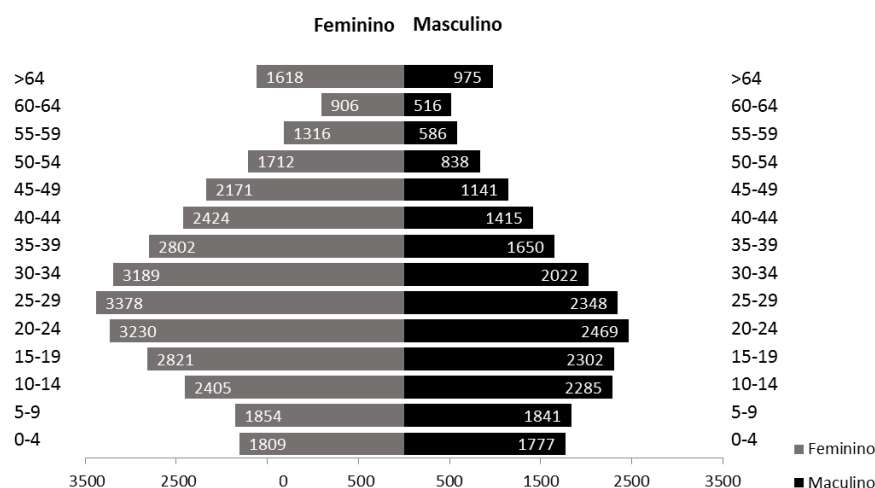


Figura 14: Distribuição de gênero e faixa etária de casos confirmados de dengue na Paraíba, Brasil, 2007-2015. Idades ignoradas não estão incluídas nesta figura. ($p=0.0001$) (Elaboração própria, 2016).

5.6 SINTOMAS ASSOCIADOS COM A GRAVIDADE DA DOENÇA NO PERÍODO DE 2007-2015

Entre os anos analisados, pacientes confirmados apresentaram diversas manifestações hemorrágicas ($n=599$), e suas subclassificações das quais petéquias ($n=319$) é a mais prevalente. Contrariando as expectativas, os anos de 2014 e 2015 apresentaram os menores números de manifestações hemorrágicas, mesmo em comparação com o ano de 2009 que apresentou uma grande subnotificação (Tabela 6).

O vazamento plasmático, outro sintoma associado com a gravidade da doença, foi observado nos anos de 2007 a 2013. Contudo, em 2014 e 2015 esse sintoma não foi notificado em nenhum dos casos confirmados (Tabela 6).

Tabela 6. Sintomas apresentados em casos confirmados com dengue de 2007-2015.

Parameters	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		2015		Total	Valor de p
	N	(%) ²	N	(%) ²	N	(%) ²	N	(%) ²	N	(%) ²	N	(%) ²	N	(%) ²	N	(%) ²	N	(%) ²		
Vazamento plasmático	76		43		6		29		91		71		36		0		0		352	0,0001
Manifestações hemorrágicas	101		85		11		67		168		97		68		1		1		599	0,0001
Epistaxe	30	29,70	31	36,47	5	45,45	19	28,36	46	27,38	23	23,71	13	19,12	1	100,00	0	0,00	168	NS
Sangramento gengival	23	22,77	25	29,41	3	27,27	16	23,88	55	32,74	11	11,34	12	17,65	0	0,00	0	0,00	145	0,001
Metrorragia	10	9,90	4	4,71	1	9,09	8	11,94	11	6,55	12	12,37	4	5,68	0	0,00	0	0,00	50	NS
Petéquias	65	64,36	44	51,76	10	90,91	46	68,66	84	50,00	36	37,11	34	50,00	0	0,00	0	0,00	319	0,0001
Hematúria	7	6,93	11	12,94	1	9,09	2	2,99	10	5,95	12	12,37	9	13,24	0	0,00	0	0,00	52	NS
Sangramento	28	27,72	30	35,29	7	63,64	11	16,42	34	20,24	33	34,02	27	39,71	0	0,00	0	0,00	170	0,006

2 Os números relativos dos parâmetros de manifestações hemorrágicas foram calculados utilizando o valor total de manifestações hemorrágicas por ano.

NS: Não Significante

FONTE: Elaboração própria, 2016

5.7 HOSPITALIZAÇÕES POR DENGUE NO PERÍODO DE 2007-2015

As admissões hospitalares correspondem apenas a 3,97% do total de casos confirmados de dengue. No entanto, quando o parâmetro hospitalização foi correlacionado com a classificação mais grave da doença, esse valor alcançou o valor de 81%. FHD/DCC/DcSA consistiu em 427 casos de hospitalização e SCD/DG em 310 casos (Tabela 7).

Além disso, é necessário enfatizar que de todas as grávidas notificadas (n=137), apenas 18 foram encaminhadas a um hospital, sendo que um dos casos progrediu para o óbito. A idade média de pacientes tratados em hospitais foi de 11 a 40 anos. Pacientes hospitalizados com dengue não apresentaram nenhuma diferença estatística em relação à autoctonia (Tabela 7).

Por fim, nem todos os pacientes admitidos progrediram para a recuperação, 64 casos de dengue evoluíram para a morte, dos quais 29 foram classificados como FHD/DCC/DcSA e 35 como SCD/DG (Tabela 7).

Tabela 7. Características de pacientes admitidos em hospitais com dengue confirmada na Paraíba de 2007-2015

Parâmetro de hospitalização	Sim	Não	Total	Valor de p
Idade média	29,3	28,92	29,97	
Gravidez				0,001
Sim	18	119	137	
Não	634	3527	4161	
Autóctones				0,0001
Sim	1231	11840	13071	
Não	933	2567	3500	
Classificação				0,0001
FD/DsSA	1426	14182	15608	
FHD/DCC/DcSA	427	196	623	
SCD/DG	310	18	328	

FONTE: Elaboração própria, 2016

5.8 EXAMES LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO NO PERÍODO DE 2007-2015

Para auxiliar o diagnóstico clínico epidemiológico foram realizados 18.737 exames laboratoriais no período de 2007 a 2015, sendo a sorologia o teste mais utilizado em todos os anos (n= 15.873), enquanto RT-PCR o mais raramente realizado (n= 361).

O teste do NS1 foi introduzido no presente estudo em 2010 (n=1), contudo o número de testes realizados aumentou significativamente nos anos subsequentes 2011 (n=163), 2012 (n=91), 2013 (n=115), 2014 (n= 55) e 2015 (n= 104) (Tabela 8).

Os números de testes para diagnóstico realizados em 2009 (n= 201) ratificaram o padrão demonstrado nos casos confirmados, portanto, consistiu do menor número total de exames laboratoriais entre todos os anos. Entretanto, em termos de valores relativos 2011 e 2014 apresentaram as menores proporções (Tabela 8).

Tabela 8. Testes de diagnóstico da dengue realizados na Paraíba de 2007 -2015

Ano	Sorologia		Imunohistoquímica		Histopatologia		Isolamento viral		PCR		NS1		Teste do torniquete	
	(N)	(%) ³	(N)	(%) ³	(N)	(%) ³	(N)	(%) ³	(N)	(%) ³	(N)	(%) ³	(N)	(%) ³
2007	1716	80,45	90	4,22	90	4,22	102	4,78	49	2,30	0	0,00	86	4,03
2008	1231	70,95	102	5,88	102	5,88	133	7,67	93	5,36	0	0,00	74	4,27
2009	170	84,58	4	1,99	4	1,99	6	2,99	8	3,98	0	0,00	9	4,48
2010	2309	91,52	36	1,43	36	1,43	55	2,18	32	1,27	1	0,04	54	2,14
2011	3175	83,46	93	2,44	93	2,44	99	2,60	50	1,31	163	4,28	131	3,44
2012	1592	84,64	24	1,28	24	1,28	32	1,70	24	1,28	91	4,84	94	5,00
2013	2441	84,90	47	1,63	60	2,09	78	2,71	69	2,40	115	4,00	65	2,26
2014	751	86,52	17	1,96	19	2,19	12	1,38	13	1,50	55	6,34	1	0,12
2015	2488	91,57	40	1,47	44	1,62	15	0,55	23	0,85	104	3,83	3	0,11
Total	15873		453		472		532		361		529		517	
Valor de p	0,0001		0,0001		0,0001		0,0001		0,0001		0,0001		0,0001	

³ Os números relativos são baseado no total dos exames de diagnóstico realizados por ano.

FONTE: Elaboração própria, 2016

5.9 SOROTIPOS CIRCULANTES POR ANO, IDADE E GÊNERO NO PERÍODO DE 2007-2015

No período de 2007 a 2015, o sorotipo mais prevalentemente identificado foi o DENV-1 (n=396), seguido do DENV-4 (n=67). Portanto, a prevalência do DENV-1 manteve-se ao longo de todos os anos analisados: 2007 (n=41), 2008 (n=77), 2009 (n=3), 2010 (n=60), 2011 (n=107), 2012 (n=31), 2013 (n=52), 2014 (n=13) e 2015 (n=12). A co-circulação só foi observada nos anos de 2013 e 2014 (Figura 15).

A infecção por dengue foi mais predominante no gênero feminino, em comparação ao masculino, em todos os sorotipos. DENV-4 demonstrou a maior desproporcionalidade entre os gêneros (1:1,91), enquanto DENV-1 (1:1,73), DENV-2 (1:1,42) e DENV-3 (1:1,4) apresentaram valores menos desproporcionais entre homens e mulheres (Figura 16).

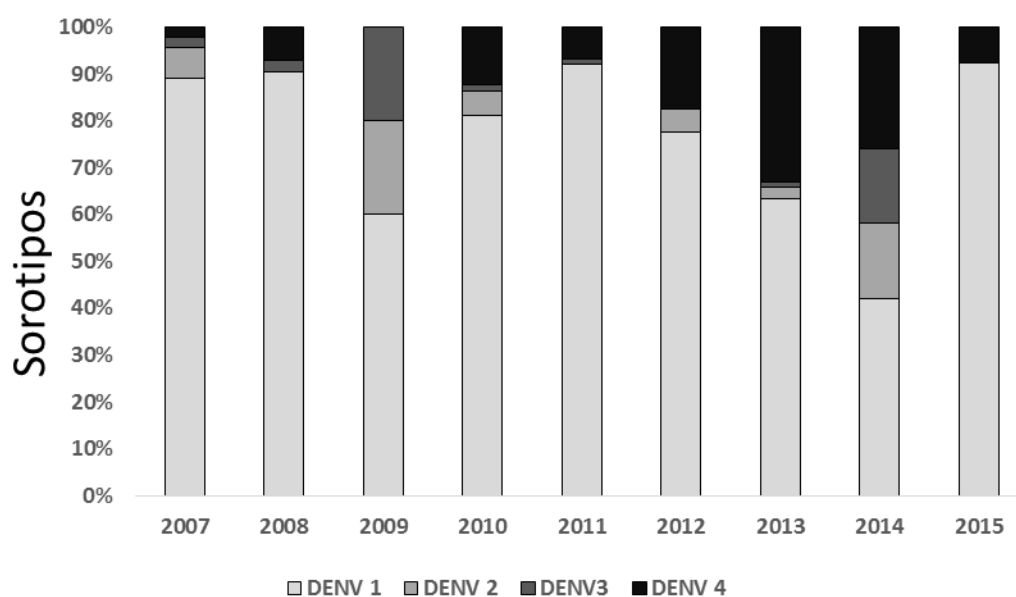


Figura 15. Soroprevalência de casos confirmados de dengue por anos na Paraíba, no período de 2007-2015 (Elaboração própria, 2016).

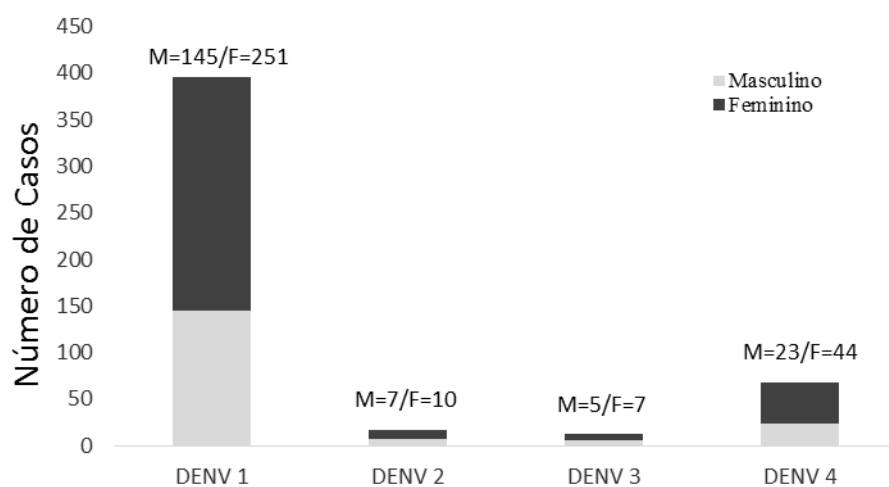


Figura 16. Soroprevalência de casos confirmados de dengue por gênero na Paraíba, no período de 2007-2015 (Elaboração própria, 2016).

A relação entre idade, hospitalização, gravidade e evolução da doença com a caracterização molecular dos sorotipos da dengue está descrita na tabela 9. As formas mais brandas ($n = 358$) da doença foram associadas ao DENV-1, porém um maior número de hospitalização também foi mais comumente associado a esse sorotipo. Sessenta e quatro pessoas deste estudo evoluíram para óbito, todavia, apenas três foram

molecularmente classificados com RT-PCR, sendo eles DENV-1 (n= 2) e DENV-4 (n=1).

Tabela 9: Associação dos padrões clínicos dos pacientes com o sorotipo DENV na Paraíba de 2007-2015

Parâmetros/ Sorotipo	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Total	Valor de p
Idade média	29,85	36	29,5	30,15	31	
Hospitalização						NS
Sim	22	2	2	7	33	
Não	87	4	1	24	116	
Classificação						0,0001
FD/DsSA	358	10	5	36	409	
FHD/DCC/DcSA	2	0	1	3	6	
SCD/DG	3	2	2	3	10	
Óbitos por dengue	2	0	0	1	3	NS

NS: Não Significante

FONTE: Elaboração própria, 2016

5.10 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA NO ANO DE 2016

Das amostras obtidas para caracterização molecular dos vírus circulantes no estado da Paraíba, no período de janeiro a junho de 2016, observou-se a co-circulação da dengue, zika e chikungunya (Figura 17). De quarenta e seis amostras analisadas, apenas uma pode ser classificada como dengue, sendo esta DENV-2. Enquanto, a zika (n= 32) e a chikungunya (n= 14) apresentaram números mais elevados neste período.

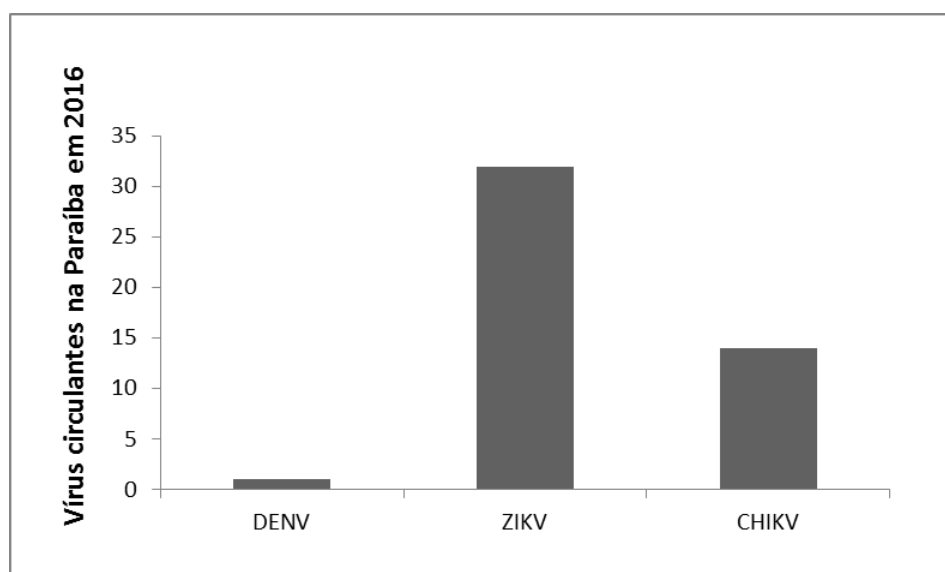


Figura 17. Co-circulação de arboviroses na Paraíba no primeiro semestre de 2016 (Elaboração própria, 2016).

6 DISCUSSÃO

Apesar da importância da dengue na Paraíba, Nordeste do Brasil, poucos estudos têm sido realizados para caracterizar as epidemias dessa doença. Essa análise se tornou mais importante, uma vez que a emergência recente de outras arboviroses, como zika e chikungunya, e suas similaridades clínicas com a dengue têm aumentado os desafios do controle epidêmico.

Dificuldades no preenchimento das fichas de notificação foram observadas na literatura de estudos da dengue, provavelmente como uma consequência de despreparo técnico ou aquisição de dados incorretos (DUARTE e FRANÇA, 2006). Este fator pode explicar a diminuição de casos confirmados e da incidência observados nos anos de 2009 e 2014 (Figura 8 e 9). Isto gera uma preocupação, uma vez que a qualidade dos dados no SINAN é essencial para o planejamento de ações de saúde pública pela Secretaria de Saúde, favorecendo a população em áreas de risco.

Assim sendo, as informações baseadas em casos notificados mostram apenas uma parte da realidade, uma vez que muitas pessoas infectadas podem ser assintomáticas ou, mesmo que apresentem sintomas, não chegam a fazer parte das estatísticas oficiais (MONDINI et al., 2005).

É necessário considerar o clima como um fator de extrema importância para a epidemiologia da dengue, já que o vetor tem seu desenvolvimento influenciado pelas condições climáticas (CONEGLIAN et al, 2012). No presente estudo observou-se que entre os meses de março e agosto, houve a maior quantidade de casos de dengue (Figura 10), período no qual ocorrem os maiores valores de precipitação e umidade relativa do ar e, consequentemente, as temperaturas mais baixas registradas na região (FURTADO, SOUZA e MORAES, 2004). Esses picos de casos de dengue estão provavelmente associados com as características cíclicas do vetor causador da doença (TAUIL, 2002).

Pesquisadores demonstraram que a prevalência de casos confirmados ocorre em meses que apresentam os maiores índices pluviométricos e de vetores (GONÇALVES e REBELO, 2004; HII et al., 2009; NEGEV et al., 2015). No entanto, vale destacar que a proliferação dos vetores ocorre em todos os meses do ano até nos meses com menores precipitações, sendo a existência de reservatórios domésticos um dos fatores responsáveis pelo fornecimento de condições propícias à manutenção de populações de *A. aegypti*. Relacionado a isso, a resistência dos ovos deste vetor em períodos de seca pode contribuir para sua presença em meses menos favoráveis à sua dispersão (FORATTINI e BRITO, 2003).

No presente estudo foi observada a associação entre o número de casos e pluviosidade considerando o tempo entre o fato biológico e o registro dos casos no sistema de informação. Esse *time-lag* demonstrou uma maior associação no terceiro mês após o início da chuva, isto é, a precipitação de um determinado mês contribuiu para explicar o número de casos de dengue no terceiro mês depois de sua ocorrência. Este dado foi corroborado por Ribeiro et al. (2006), que em seu estudo demonstrou que o *time-lag* obteve associação significativa no segundo, terceiro e quarto mês de observação após o mês de precipitação.

As condições climáticas em geral revelam relação positiva com a transmissão de dengue (FORATTINI e BRITO, 2003). Por isso, o conhecimento desse processo poderá propiciar maior entendimento sobre a dinâmica de transmissão e, por conseguinte, contribuir para criação de tecnologias. Modelos de predição podem ser criados baseados nesses dados, como ferramenta em campanhas de conscientização pública para o controle e prevenção do vetor da dengue (KHORMI e KUMAR, 2014).

A maioria dos casos confirmados foram classificados com FD/DsSA (97,90%), apesar dos baixos números dos casos classificados como FHD/DCC/DcSA, a partir de 2010 ocorreu um leve aumento nas notificações desses casos (Tabela 5). O aumento dos casos mais graves pode estar associado com a introdução de um sorotipo que não estava circulando nos anos anteriores (GIBSON et al., 2014).

Neste estudo, 2164 (3,97%) pacientes de dengue confirmados foram admitidos em instalações hospitalares públicas e privadas. Apesar da gravidez ser associada com maior gravidade da doença (MACHADO et al., 2013), em nosso estudo apenas uma pequena quantidade de mulheres grávidas foi encaminhada para hospitais, isto pode explicar porque um caso de grávida infectada pelo vírus da dengue evoluiu para óbito. Além disso, de um total de 64 mortes por dengue confirmadas, apenas 40 desses casos foram admitidos no hospital, esta sub-hospitalização e falta de assistência médica adequada pode ter ocorrido a dispêndio das vidas dos pacientes.

A maior parte dos casos, neste estudo, progrediu para a cura da doença. Estes dados podem ser consequência de um maior número de FD/DsSA na Paraíba, e baixas taxas de FHD/DCC/DcSA e SCD/DG, uma vez FHD/DCC/DcSA e SCD/DG são comumente associados com alta letalidade em pacientes, como observado em um estudo em Recife-PE (MONTENEGRO et al., 2002).

Em relação ao gênero dos pacientes, as mulheres apresentaram maior prevalência (31635 [58,8%]), em comparação aos homens (22165 [41,2%]),

corroborando com resultados encontrados em Recife-PE, Teresina-PI e São Luis-MA (MONTENEGRO et al., 2002; EVANGELISTA, OLIVEIRA e GONÇALVES, 2012). Essa maior prevalência feminina é atribuída a maior procura das mulheres por atendimento médico, talvez melhorando assim a notificação de gênero e, conseqüentemente, aumentando os seus casos confirmados, e não por que seja uma doença ligada ao gênero (TRAVASSOS et al., 2002). Por isso, alguns estudos epidemiológicos da dengue não demonstram números significativos com relação aos gêneros (GONCALVES e REBELO, 2004)

Evidenciou-se também que a predominância da faixa etária da infecção por dengue em pacientes está entre 15-34 anos ($n = 21.759$). Corroborando, portanto, os dados observados em outros estudos brasileiros que mostraram que adultos jovens representam a idade da população mais acometida pela dengue (CAVALCANTI et al., 2010). No entanto, o presente estudo, também demonstrou picos de casos em pacientes idosos (> 64) em ambos os gêneros (Figura 14).

A fim de confirmar os casos de dengue, as repartições brasileiras de saúde públicas e privadas realizam vários testes diagnósticos, concomitantemente com a classificação clínica da Organização Mundial de Saúde. De todos os exames laboratoriais realizados, 15.873 pacientes (84,71%) foram confirmados através da sorologia, enquanto que o teste RT-PCR representou apenas 1,92% dos testes. Até 2008, o Brasil diagnosticava a maioria dos casos de dengue com base em critérios clínicos e epidemiológicos, e o isolamento e a identificação do DENV por reação em cadeia da polimerase eram escassos (TEIXEIRA et al., 2013). Apesar da detecção de RNA viral fornecer um diagnóstico sensível e rápido, esta abordagem exige equipamentos e técnicos especializados, que são limitações devido aos seus custos (HU et al., 2011) o que explica a prevalência da técnica sorológica.

Um levantamento epidemiológico foi realizado no Brasil pelo Ministério da Saúde, compreendendo uma série de isolamentos do vírus da dengue de 2000-2008, no início desse período o DENV-1 apresentou a maior incidência, DENV-3 tornou-se predominante entre 2003 e DENV-2 a partir de 2007 (TEIXEIRA et al., 2013). Distribuições geográficas do sorotipo de diferentes estados, tais como, Pernambuco, Goiânia, e Ceará (CAVALCANTI et al., 2011) revelaram uma tendência similar às tendências nacionais. Contudo, nossos resultados, não corroboram essa evolução do DENV, apesar da emergência e reemergência de DENV-2, DENV-3 e DENV-4 ao

longo dos anos, a dominância do DENV-1 permaneceu evidente no estado da Paraíba, no período de 2007 a 2015.

Apesar de comumente o DENV-1 ser associado a formas mais brandas da doença, observou-se uma forte correlação entre DENV-1 com evoluções mais graves e hospitalizações, comparado com os outros sorotipos. Apesar de Yung et al. (2015) corroborar os nossos dados, outros estudos sugerem que o sorotipo DENV-2 é mais correlacionado com a gravidade da doença (CHEN et al., 2007; THOMAS et al., 2008; FRIED et al., 2010). Portanto, talvez se possa atribuir essa associação do DENV-1 com piores prognósticos à sua alta prevalência, juntamente com a circulação simultânea dos outros sorotipos.

A co-circulação dos quatro sorotipos foi observada na Paraíba nos anos 2013 e 2014. Apresentações mais graves da dengue geralmente acontecem após períodos epidêmicos, seguidos da introdução de um novo sorotipo (GIBSON et al, 2014). Por isso, essa co-circulação apresentada em 2013 e 2014 podem estar relacionadas ao grande aumento de casos de dengue identificados nos anos de 2011 e 2012.

Em 2015 esse padrão mudou, uma vez que só se observou a co-circulação do DENV 1 e DENV 4. Além disso, um aumento exorbitante nos casos suspeitos e confirmados de dengue foi observado neste mesmo ano, em sobreposição com o aparecimento de vírus zika (GALINDO-FRAGA et al., 2015). Uma possível explicação para esse aumento exorbitante nas notificações, pode estar associada ao pânico gerado a partir das repercussões da zika, associado à ausência de um sistema de notificação específico para as arboviroses, como zika e chikungunya (GALINDO-FRAGA et al, 2015). Interessantemente, apesar desse aumento de notificações em 2015, a escassez do diagnóstico molecular permaneceu, demonstrando assim as dificuldades na identificação dos sorotipos circulantes na Paraíba.

Com dados desse estudo no ano de 2016, a identificação do DENV, ZIKV e CHIKV através de testes moleculares demonstrou a circulação das três arboviroses no estado da Paraíba. Até a data atual, o maior surto de chikungunya no Brasil ocorreu em 2014 em Feira de Santana, Bahia, onde a dengue também é prevalente (TEIXEIRA et al., 2015). Estes dados ilustram o potencial de surtos epidêmicos simultâneos de ZIKV, CHIKV e DENV no Hemisfério Ocidental e os crescentes efeitos na saúde pública pelos mosquitos *Aedes*, como vetores (CARDOSO et al., 2015). Portanto, autoridades de saúde pública no Brasil devem planejar adequadamente medidas de combate e prevenção.

Dessa forma, este estudo objetivou avaliar pela primeira vez o perfil de ocorrência, as características epidemiológicas de casos de dengue na Paraíba e estudar sua correlação com dados pluviométricos. Além disso, objetivou caracterizar molecularmente os sorotipos do vírus da dengue circulantes no estado da Paraíba nos anos de 2007 a 2015, e investigar a presença de outros arbovirus circulantes no estado em 2016. Dessa forma, possibilita a criação de estratégias que permitam a prevenção da dengue através de um modelo de predição de casos futuros, direcionando a tomada de decisão de órgãos competentes no controle do vetor.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou uma predominância de indivíduos com idade entre 15-34 anos e do gênero feminino. Além disso, teve como objetivo central caracterizar molecularmente os sorotipos circulantes na Paraíba, demonstrado a predominância do DENV-1 em todos os anos analisados.

É importante ressaltar que em 2015, ocorreu o aumento exorbitante do número de casos, provavelmente relacionado às repercussões dos surtos epidêmicos de outras arboviroses no estado e sua co-circulação com o DENV.

Ao analisarmos as amostras obtidas no primeiro semestre de 2016, observou-se uma maior predominância de outras arboviroses, como zika e chikungunya, quando comparadas a dengue. Demonstrando com isso, o perfil de co-circulação epidêmica no estado da Paraíba.

De acordo com o exposto nos resultados obtidos no presente estudo, as consequências dessa relação tornam-se mais evidentes durante a ocorrência de precipitação pluviométrica, uma vez que a chuva de um determinado mês contribuiu para explicar o número de casos de dengue no terceiro mês depois de sua ocorrência, pois proporcionam condições que favorecem o aumento do número de criadouros e também o desenvolvimento do vetor.

Assim, de acordo com os resultados expostos demonstra-se a necessidade de uma maior atuação e um maior investimento da esfera pública, especialmente na criação de estratégias que permitam a prevenção da dengue através de um modelo de predição de casos, possibilitado através do estudo de correlação dos fatores climáticos do presente estudo, direcionando a tomada de decisão de órgãos competentes no controle do vetor.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.M. et al. **A retrospective survey of dengue vírus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil.** Journal of Virology Methods, 2009, v.155, n.1, p.34-38.

BANU, S. et al. **Space-time clusters of dengue fever in Bangladesh.** Trop Med Int Health, 2012, v.17, p.1086-1091.

BARNIOL, J. et al. **Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease:** multi-centre study in 18 countries. BMC Infect Dis, 2011, 11: 106.

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. **Dengue fever:** a call for local, national, and international action. Lancet, 2008, v.372, p.205.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editora da Unicamp, 2001, Campinas - SP - Brasil

CANYON, D.V.; HII, J.L.; MÜLLER, R. **Adaptation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition behavior in response to humidity and diet.** J Insect Physiol, 1999, v.45, p.959-964

CARDOSO, C. W. et al. **Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil.** Emerg Infect Dis, 2015, v.21, n.12, p.2274-2276

CARNEIRO, A. R. et al. **Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 2012, v.107, n.6, p.805-12.

CAVALCANTI, L.P. et al. **Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil.** Emerg Infect Dis, 2011, v.17, n.1, p.132-134.

CAVALCANTI, L.P. et al. **Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil.** Rev Soc Bras Med Trop, 2010, v.43, n.4, p.355-358.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). **Mosquito Life-Cycle**, 2012. Disponível em: http://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html. Acessado em: 25.06.2016

CHATURVEDI, U. C. et al. **Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives**. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007, v.50, n.3, p.285-299.

CHEN, R.F. et al. **Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency**. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2007, v.101, n.11, p.1106-1113.

CHEN, H. L. et al. **Evolution of dengue virus type 2 during two consecutive outbreaks with an increase in severity in southern Taiwan in 2001–2002**. Am J Trop Med Hyg, 2008, v.79, p.495–505.

CHIEN, L. J. et al. **Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses**. J Clin Microbiol, 2006, v.44, p.1295–1304.

CLYDE, K.; KYLE, J; HARRIS, E. **Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis**. Journal of Virology, 2006, v.80 n.23, p. 11418-11431.

COLOGNA, R.; RICO-HESSE, R. **American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells**. J. Virol, 2003, v.77, p.3929–3938.

CONEGLIAN, A.R. et al. **Incidência de Dengue no município de Barbosa Ferraz, Paraná, Brasil**. Revista de Saúde e Biologia, 2012; v.7, n.1, p.6-12.

DEMPSEY, A. F. et al. 2009. **Diagnosis and testing practices for adolescent pertussis among a national sample of primary care physicians**. Prev Med, 2009, v.48, p.500-504.

DUARTE, H.H.P.; FRANÇA, E.B. **Qualidade dos dados da vigilância epidemiológica da dengue em Belo Horizonte, MG**. Revista Saúde Pública, 2006, v.40, n.1, p.134-142.

ENDY, T.P. **Human immune responses to dengue virus infection: lessons learned from prospective cohort studies**. Frontiers Immunology, 2014, v.5, p.183.

EVANGELISTA, L. S. M.; OLIVEIRA, F. L. L.; GONÇALVES, L. M. F. **Aspectos epidemiológicos do dengue no município de Teresina, Piauí.** BEPA, 2012; v.9, n.103, p. 32-39.

FARFAN, J. A. et al. **Rapid characterization of genetic diversity among twelve dengue-2 virus isolates by single-strand conformation polymorphism analysis.** Am J Trop Med Hyg, 1997, v. 57, n.4, p.416-22.

FARIA, N. R. et al. **Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015.** PLoS Curr. 2016, 1:8.

FARES, R. C. G. et al. **Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil.** BioMed Research International, 2015, Article ID 321873.

FAYE, O. et al. **Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes.** Virol J. 2013, 10:311.

FERNANDEZ-MESTRE, M. T. et al. **TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients.** Tissue Antigens, 2004, v.64, n.4, p.469-472.

FIGUEIREDO, L. **The Brazilian flaviviruses.** Microbes Infect, 2000, v.2, n.13, p. 1643-1649.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. **Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*.** Revista de Saúde Pública, 2003, v.37, n.5, p.676-677.

FREIRE, C. L. G. **Casos de dengue registrados no Nordeste Brasileiro, destacando-se Pernambuco no ano de 2012.** Trabalho de Conclusão de Curso, 2014. Disponível em: <http://www.crbiodigital.com.br/portal?txt=3077343430>. Acessado em: 12.04.2016.

FRIED, J. R. et al. **Serotype-Specific Differences in the Risk of Dengue Hemorrhagic Fever: An Analysis of Data Collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006.** PLoS Negl Trop Dis, 2010, v.4, n.3, e617.

FURTADO, P. C. H.; SOUZA, I. C. A.; MORAES, R. M. **Influência das estações do ano na incidência de casos de dengue no estado da Paraíba no período 1998-2003.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS AMBIENTAIS E SAÚDE, 4., 2004, Santos. Anais. Santos: COPEC, 2004. p.139-142.

GALINDO-FRAGA, A.O. et al. **Zika Virus: A New Epidemic on Our Doorstep.** Rev Invest Clin, 2015, v.67, n.6, p.329-332.

GIBSON G, et al. **Conditions of the household and peridomicile and severe dengue: a case-control study in Brazil.** Infect Ecol Epidemiol, 2014, v.4.

GIBSON, G. et al. **From primary care to hospitalization: clinical warning signs of severe dengue fever in children and adolescents during an outbreak in Rio de Janeiro, Brazil.** Cad Saúde Pública, 2013, v.29, p.82-90.

GONCALVES NV, REBELO JM. **Epidemiological characteristics of dengue in the Municipality of Sao Luis, Maranhao, Brazil, 1997-2002.** Cad Saude Publica, 2004, v.20, n.5, p.1424-1431.

GRATZ, N.G. **Critical review of the vector status of Aedes albopictus.** Medicine and Veterinary Entomology, 2004, v.18, p.215–227.

GUBLER, D. J. et al. **A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses.** Am J Trop Med Hyg, 1985, v.34, p.170-173.

GUBLER, D.J. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** Clin Microbiol Rev, 1998, v.11, p.480-96.

GUBLER, D. J. **Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status.** Novartis Found Symp, 2006, v.277, p.3-16.

GUBLER, D.J. **Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century.** Trop Med Health, 2011, v.39, p.3-11.

GUBLER, D.J. **Resurgent Vector-Borne Diseases as a global health problem.** Emerg Infect Dis, 1998, v. 4, n. 3, p.442-450.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. **Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology.** Emerg. Themes Epidemiol, 2005, v.2, n.1, p.1.

GUZMAN, M.G. et al. **Dengue: a continuing global threat.** Microbial Pathogenesis, 2010, v.69-70, p. 45-52.

GUZMAN, M. G.; KOURÍ, G. **Dengue diagnosis, advances and challenges**. Int J Infect Dis, 2004, v.8, n.2, p.69-80.

HALSTEAD, S. B. **Dengue virus–mosquito interactions**. Annu. Rev. Entomol, 2008, v.53, p.273–291.

HALSTEAD, S.B. **Pathogenesis of Dengue**: Challenges to Molecular Biology. Science, 1988, v. 239, n. 4839, p. 476-481.

HALSTEAD, S.B. **Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses**. Adv Virus Res, 2003, v.60, p.421-467.

HARRIS E. et al. **Detection and typing of dengue virus by using two versions of the RT-PCR assay**. J. Clin. Microbiol., 1998, v.36, p.2634-2639.

HII, Y.L. et al. **Climate variability and increase in intensity and magnitude of dengue incidence in Singapore**. Glob Health Action, 2009, v.2.

HU, D. et al. **Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection**. Virol J, 2011, 8: 47.

IBGE. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2013/> Acesso em: 01 Mai. 2016. 2013

JEEFOO, P.; TRIPATHI, N. K.; SOURIS, M. **Spatio-temporal diffusion pattern and hotspot detection of dengue in Chachoengsao Province, Thailand**. Int J Environ Res Public Health, 2011, v.8, p.51-74.

JESSIE, K. et al. **Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization**. J Infect Dis, 2004, v.189, n.8, p.1411-1418.

JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. **Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of Aedes aegypti mosquitoes**. Am J Trop Med Hyg, 2002, v.67, p.158–161.

KHORMI, H. M.; KUMAR, L. **Climate change and the potential global distribution of Aedes aegypti**: spatial modelling using geographical information system and CLIMEX. Geospatial Health, 2014, v.8, n.2, p.405-415.

KUKRETI, H. et al. **Emergence of an independent lineage of dengue virus type 1 (DENV-1) and its co-circulation with predominant DENV-3 during 2006 dengue fever outbreak in Delhi.** Int J Infect Dis, 2008, v. 12, n. 5, p. 542-549.

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

LANCIOTTI, R. S. et al. **Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006.** Emerg Infect Dis, 2007, v.13, n.5, p.764-767.

LANCIOTTI, R. S. et al. **Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses.** J Gen Virol, 1994, v.75 (Pt 1), p.65-75.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. **Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses.** J Gen Virol, 1997, v.78 (Pt 9), p.2279-84.

LANCIOTTI, R.S. et al. **Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** J Clin Microbiol, 1992, v.30, n.3, p.545-551.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J.; RICE, C.M. **Flaviviridae:** The viruses and their replication. In Knipe, D.M.; Howley, P.M. (eds). Fields Virology. Philadelphia: 5.ed., vol 1, Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p.1101-1152.

LIUZZI G. et al. **Zika virus and microcephaly:** is the correlation, causal or coincidental? New Microbiol, 2016, v.39, n.2, p.83-85.

LÜHN, K. et al. **Increased frequencies of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in acute dengue infection.** JEM, 2007 v.204, n. 5, p.979–985.

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

MACHADO, C.R. et al. **Is pregnancy associated with severe dengue? A review of data from the Rio de Janeiro surveillance information system.** PLoS Negl Trop Dis, 2013, v.7, n.5, e2217.

MALAVIGE, G. N. et al. **Dengue viral infections.** Postgrad Med J, 2004, v.80, p.588–601.

MATHEW, A.; TOWNSLEY, E.; ENNIS, F. A. **Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections.** *Future Microbiol*, 2014, v.9, n.3, p. 411-25.

MENDEZ, J.A. et al. **Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia.** *Virol J*, 2010, v. 7, p. 226.

MENDONÇA FA, DANNI-OLIVEIRA IM. *Climatologia* - Noções básicas e climas do Brasil. São Paulo: Oficina de textos; 2007.

MESSINA, J. P. et al. **The many projected futures of dengue.** *Nature Microbiology*, 2015, v.13, p.230-239.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Brasília: 7ª edição, 2009. 816 p.

MODIS, Y. et al. **Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion.** *Nature*, 2004, v. 427, n. 6972, p. 313-319.

MONTENEGRO, D. et al. **Clinical and epidemiological aspects of the dengue epidemic in Recife, PE, 2002.** *Rev Soc Bras Med Trop*, 2006, v.39, n.1, p.9-13.

MONDINI, A. et al. **Análise espacial da transmissão de dengue em cidade de porte médio do interior paulista.** *Rev Saúde Pública*, 2005, v.39, n.3, p.444-451.

MOULIN, E. et al. **Simultaneous outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness.** *New Microbes New Infect*, 2016, v.11, p.6-7.

NEGEV, M. et al. **Impacts of Climate Change on Vector Borne Diseases in the Mediterranean Basin: Implications for Preparedness and Adaptation Policy.** *Int J Environ Res Public Health*, 2015, v.12, n.6, p.6745-6770.

NITSCHKE, C. et al. **Biochemistry and Medicinal Chemistry of the Dengue Virus Protease.** *Chem Rev*, 2014, v.114, p.11348–11381.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. **Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1999, v.94, n.3.

OLIVEIRA, M.F. et al. **Two lineages of dengue virus type 2, Brazil.** Emerg Infect Dis, 2010, v.16, p.576-578.

PEREZ, A. B. et al. **Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms:** implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. Hum Immunol, 2010, v.71, n.11, p.1135-1140.

RIBEIRO, A. F. et al. **Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas.** Rev Saúde Pública, 2006, v.40, n.4.

RIGAU-PÉREZ, J.G. et al. **Dengue and dengue haemorrhagic fever.** Lancet, 1998, v. 352, n.9132, p. 971-7.

RODHAIN, F.; ROSEN, L. **Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships.** In dengue and dengue hemorrhagic fever, Gubler DJ, Kuno G. 1997 (Cambridge, MA: CABI Publishing) p. 45–60

RODRIGUEZ-BARRAQUER I, et al. **From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil.** PLoS Negl Trop Dis 2011;5(1):e935.

ROGERS, D. J.; RANDOLPH, S. E. **Climate change and vector-borne diseases.** Adv. Parasitol, 2006, v. 62, p.345-381.

ROMANO, C. M. et al. **Inter- and intra-host viral diversity in a large seasonal DENV2 outbreak.** PLoS One, 2013, v.8, n.8, e70318.

SECRETARIA DA SAÚDE DA PARAÍBA. **Dengue.** Boletim Epidemiológico. João Pessoa, 2014.

SHU, P. Y. et al. **Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotypespecific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections.** Clin Diagn Lab Immunol, 2003, v.10, p.622–630.

SOLANO, R. et al. **Retrospective space-time cluster analysis of whooping cough, re-emergence in Barcelona, Spain, 2000-2011.** Geospat Health, 2014, v.8, p.455-461.

TAUIL, P. L. **Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil.** Cad. Saúde Pública, 2002, v.18, n.3, p.867-871.

TAUIL, P. L. **Urbanização e ecologia do dengue.** Cad. Saúde Pública, 2001, Supl. 17, p.99-102.

TEIXEIRA, M. G. et al. **East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014.** Emerg Infect Dis, 2015, v.21, p.906–907.

TEIXEIRA, M. G. et al. **Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010):** a systematic literature search and analysis. PLoS Negl Trop Dis, 2013, v.7, n.12, e2520.

THAI, K. T. et al. **High-resolution analysis of intra host genetic diversity in dengue virus serotype 1 infection identifies mixed infections.** J Virol, 2012, v.86, n.2, p.835-843.

THAVARA, U. et al. **Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand.** J Vector Ecol 2001;26:172–80.

THOMAS, L. et al. **Influence of the Dengue Serotype, Previous Dengue Infection, and Plasma Viral Load on Clinical Presentation and Outcome During a Dengue-2 and Dengue-4 Co-Epidemic.** Am J Trop Med Hyg, 2008, v.78, n.6, p.990–998.

THU, H.M.; AYE, K.M.; THEIN, S. **The effect of temperature and humidity on dengue virus propagation in Aedes aegypti mosquitos.** Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1998, v. 29, p.280-284.

TIPAYAMONGKHOLGUL, M.; LISAKULRUK, L. **Socio-geographical factors in vulnerability to dengue in Thai villages:** a spatial regression analysis. Geospatial Health, 2011, v. 5, n. 2, p. 191-198.

TRAN, H. P. et al. **Householder perspectives and preferences on water storage and use, with references to dengue, in the Mekong Delta, southern Vietnam.** Hum Res Dev, 2010, v.2, p.136-142.

TRAVASSOS, C. et al. **Utilization of health care services in Brazil: gender, family characteristics, and social status.** Rev Panam Salud Publica, 2002, v.11, n.5-6, p.365-373.

TWIDDY, S. S. et al. **Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus.** Virology, 2002, v.298, n.1, p.63-72.

VAUGHN, D. W. et al. **Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity.** J Infect Dis, 2000, v.181, p.2–9.

XU, H. et al. **Serotype 1-specific monoclonal antibody based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections.** J Clin Microbiol, 2006, v.44, p.2872–2878.

YUNG, C.F. et al. **Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore.** Am J Trop Med Hyg, 2015, v.92, n.5, p.999-1005.

WEISKOPF, D.; SETTE, A. **T-Cell Immunity to Infection with Dengue Virus in Humans.** Front Immunol, 2014, v. 5, p.93.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. **The pathogenesis of dengue,** 2011, v.29, n.42, p.7221-7228.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.** 2ª edição. Geneva, 1997. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/itoviii.pdf>. Acessado em: 23.03.2015

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue: Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention and Control,** 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf> Acessado em: 09.02.2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever: comprehensive guidelines.** WHO Regional publication, SEARO, 1999, n.29.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (UFPB)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resposta das células T reguladoras na dengue: Correlação entre diferentes sorotipos virais e prognóstico da doença em humanos

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36522414.2.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 862.521

Data da Relatoria: 24/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma projeto de pesquisa quantitativo, observacional, analítico e transversal, em que serão estudados os sorotipos do vírus da dengue e a resposta imunológica associada em pacientes acometidos pela dengue atendidos no HULW durante o período de outubro de 2014 a março de 2017. De cada voluntário será coletada uma amostra de sangue (10 ml) e serão coletados dados do prontuário. Os dados serão analisados estatisticamente para correlacionar as variáveis com o sorotipo do vírus.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Identificar os sorotipos de vírus dengue (DENV 1-4) co-circulantes no Estado da Paraíba e caracterizar as células T reguladoras e seu papel diferencial nos pacientes infectados com os diferentes sorotipos de vírus da dengue (DENV) e a gravidade da doença.

Objetivos específicos

-Monitorar os sorotipos circulantes no Estado da Paraíba durante o período do estudo; caracterizando molecularmente os sorotipos mais comuns.

Endereço: HULW-4º andar - Campus I - UFPB
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-000
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7302 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** cepulw@hotmail.com

ANEXO B - FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE DENGUE (SINAN) ANTIGA CLASSIFICAÇÃO DA OMS (1997)

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE ESTADO DE SÃO PAULO SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE		 SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE INVESTIGAÇÃO DENGUE		Nº
CASO SUSPEITO: Paciente com febre com duração máxima de 7 dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas : cefaléia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, prostração, exantema e com exposição à área com transmissão de dengue ou com presença de <i>Aedes aegypti</i> nos últimos quinze dias.				
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação	2 - Individual		
	2 Agravado/doença	DENGUE		3 Código (CID10) A 90
	4 UF	5 Município de Notificação	6 Código (IBGE)	
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	7 Código	7 Data dos Primeiros Sintomas	
Notificação Individual	8 Nome do Paciente		9 Data de Nascimento	
	10 (ou) Idade	11 Sexo	12 Gestante	13 Raça/Cor
	14 Escolaridade		15 Número do Cartão SUS	
	16 Nome da mãe		17 UF	
Dados de Residência	18 Município de Residência	19 Código (IBGE)	19 Distrito	
	20 Bairro	21 Logradouro (rua, avenida,...)	22 Código	
	22 Número	23 Complemento (apto., casa,...)	24 Geo campo 1	
	25 Geo campo 2	26 Ponto de Referência	27 CEP	
Dados laboratoriais e conclusão (dengue clássico)				
Inq.	31 Data da Investigação	32 Ocupação		
	33 Exame Sorológico (IgM)	34 Resultado	35 Exame NS1	36 Resultado
	37 Isolamento Viral	38 Resultado	39 RT-PCR	40 Resultado
	41 Sorotipo	42 Resultado	43 Imunohistoquímica	44 Resultado
Concluído	44 Classificação	45 Critério de Confirmação/Descarte	46 Os casos de dengue com complicações, FHD e SCD: preencher a página seguinte.	
	46 Local Provável de Infecção (no período de 15 dias)	47 UF	48 País	
	49 Município	50 Código (IBGE)	51 Distrito	
	52 Doença Relacionada ao Trabalho	53 Evolução do Caso	54 Data do Óbito	
55 Data do Encerramento		56 Data do Encerramento		

ANEXO C - FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE DENGUE (SINAN) COM A NOVA CLASSIFICAÇÃO DA OMS (2009)

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE INVESTIGAÇÃO DENGUE		Nº
CASO SUSPEITO: pessoa que viva ou tenha viajado nos últimos 14 dias para área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue ou tenha presença de <i>Ae. aegypti</i> que apresenta febre, usualmente entre 2 e 7 dias, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações: náuseas, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaléia, dor retroorbital, petéquias ou prova do laço positiva e leucopenia.				
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação	2 - Individual		
	2 Agravado/doença	DENGUE		3 Data da Notificação
	4 UF	5 Município de Notificação	Código (CID 10) A 90	Código (IBGE)
Notificação Individual	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	Código	7 Data dos Primeiros Sintomas	
	8 Nome do Paciente			9 Data de Nascimento
	10 (ou) Idade	11 Sexo	12 Gestante	13 Raça/Cor
Dados de Residência	14 Escolaridade	15 Número do Cartão SUS		16 Nome da mãe
	17 UF	18 Município de Residência	Código (IBGE)	19 Distrito
	20 Bairro	21 Logradouro (rua, avenida,...)	Código	
Dados laboratoriais e conclusão	22 Número	23 Complemento (apto., casa, ...)	24 Geo campo 1	
	25 Geo campo 2	26 Ponto de Referência	27 CEP	
	28 (DDD) Telefone	29 Zona	30 País (se residente fora do Brasil)	
Dados laboratoriais	31 Data da Investigação	32 Ocupação		
	33 Data da Coleta	34 Resultado	35 Data da Coleta	36 Resultado
	37 Data da Coleta	38 Resultado	39 Data da Coleta	40 Resultado
Condição	41 Sorotipo	42 Resultado	43 Resultado	
	44 Classificação	45 Critério de Confirmação/Descarte		
	46 Local Provável de Infecção (no período de 15 dias)	47 UF	48 País	
Condição	49 Município	Código (IBGE)	50 Distrito	51 Bairro
	52 Doença Relacionada ao Trabalho	53 Evolução do Caso		
	54 Data do Óbito	55 Data do Encerramento		