

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Gabriela Luchiari Tumiotto

**Vigilância Laboratorial da Dengue no
Rio Grande do Sul, no período de
2007 a 2013.**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2014**

Gabriela Luchiari Tumieto

**Vigilância Laboratorial da Dengue no
Rio Grande do Sul, no período de
2007 a 2013.**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do
grau de Mestre

Orientador: Dr^a Ana Beatriz Gorini da Veiga
Coorientadora: Dr^a Tatiana Schäffer Gregianini

**Porto Alegre
2014**

Catálogo na Publicação

Tumioto, Gabriela Luchiari

Vigilância Laboratorial da Dengue no Rio Grande do Sul, no período de 2007 a 2013 / Gabriela Luchiari Tumioto. -- 2014.

60 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2014.

Orientador(a): Dr^a Ana Beatriz Gorini da Veiga ;
coorientador(a): Dra. Tatiana Schaffer Gregianini.

1. Epidemiologia da dengue. 2. DENV. 3. diagnóstico.
4. MAC-ELISA. 5. qRT-PCR. I. Título.

Agradecimentos

À Deus, sobre todas as coisas, que orientou meus passos, ilumina e protege a minha vida.

À minha orientadora, Dr^a Ana Beatriz Gorini da Veiga, e à minha co-orientadora Dr^a Tatiana Schäffer Gregianini pelo conhecimento, incentivo, oportunidade, dedicação e apoio com este projeto, e na execução do mesmo.

Ao meu Noivo, Jose Mario, pela cooperação, compreensão, incentivo, paciência e ajuda constante para que eu pudesse concluir este trabalho; sem o seu amor e seu carinho nada disso poderia ter acontecido.

À Zenaida Marion Alves Nunes e à Beatriz Carneiro Cestari, pela ajuda e apoio para que este trabalho pudesse ser realizado, e a todas as colegas que trabalham no Setor de Virologia do IPB/LACEN-FEPPS, que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho. À Vanessa, que me ajudou na coleta dos dados e me incentivou sempre.

Aos meus pais, Jair e Regina, por me incentivarem e apoiarem e que, mesmo lá de longe, mandaram sempre energias positivas que, de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Jéssica e Ana Carolina, que estiveram sempre presente me escutando, dando conselhos e força tanto para o andamento deste trabalho, quanto para enfrentar as dificuldades e crescer a partir delas.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Considerações Gerais Sobre a Dengue.....	1
1.2. Agente Etiológico da Dengue.....	2
1.3. Vetores do Vírus da dengue.....	4
1.3.1. Principal Espécie Vetora nas Américas.....	5
1.4. Modo de Transmissão da Dengue.....	8
1.5. Período de Transmissibilidade da Dengue.....	8
1.6. Aspectos Clínicos.....	9
1.6.1. Dengue Clássica.....	9
1.6.2. Febre Hemorrágica da Dengue e Síndrome do Choque da Dengue.....	10
1.7. Epidemiologia da Dengue no Mundo.....	11
1.8. Epidemiologia da Dengue no Brasil.....	13
1.9. Epidemiologia da Dengue no Rio Grande do Sul.....	16
1.10. Diagnóstico Laboratorial da Dengue.....	17
1.10.1. Métodos Viroológicos.....	18
1.10.2. Métodos Sorológicos.....	19
1.11. Referências Bibliográficas.....	21
2. Objetivos	27
3. Artigo Científico Redigido em Inglês	28
4. Considerações Finais	48
5. Anexos	51
5.1. Atividades acadêmicas.....	51
5.2. Parecer Consubstanciado do CEP da Instituição Proponente.....	52
5.3. Parecer Consubstanciado do CEP da Instituição Coparticipante.....	55
5.4. Abstract aceito em 12 de Fevereiro de 2014 pelo editor Peter Hotez da Revista “PLoS Neglected Tropical Diseases” na forma de presubmission inquiry.....	57

Lista de abreviaturas utilizadas

AP61: *Aedes pseudoscutellaris*

BHK-21: do inglês *baby hamster kidney cell*

C6/36: linhagem celular de *Aedes albopictus*

cDNA: DNA complementar ao RNA

CT: ciclo da qPCR no qual a fluorescência emitida atravessa o valor de *threshold*

DC: dengue clássica

DENV: vírus da dengue

DENV-1: vírus da dengue sorotipo 1

DENV-2: vírus da dengue sorotipo 2

DENV-3: vírus da dengue sorotipo 3

DENV-4: vírus da dengue sorotipo 4

d.C.: depois de Cristo

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELISA: do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FDH: febre hemorrágica da dengue

FC: fixação do complemento

FRET: transferência de energia por ressonância de fluorescência

HI: inibição de hemaglutinação

IFI: imunofluorescência indireta

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

LIRAA: levantamento rápido de índice de infestação por *Aedes aegypti*

LLC-MK₂: célula do metabolismo lipídico de rim de macaco

MAC-ELISA: reação imunoenzimática de captura para IgM

min: minuto

mL: mililitro

μ L: microlitro

nm: nanômetros

NS1: proteína não estrutural 1

NS2: proteína não estrutural 2

NS3: proteína não estrutural 3

NS4: proteína não estrutural 4

NS5: proteína não estrutural 5

ORF: fase de leitura, do inglês *open reading frame*

PCR: reação em cadeia da polimerase

prM: pré-membrana

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa ou em tempo real

Rn: reporter normalizado

RNA: ácido ribonucleico

RT: transcrição reversa

RT-PCR: transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase

SCD: síndrome do choque da dengue

SW13: célula de carcinoma adrenal humana

TN: teste de neutralização

Threshold: desvio padrão médio de Rn para os ciclos iniciais da PCR, multiplicado por um fator ajustável

UTR: do inglês *untranslated region*

WHO: do inglês *World Health Organization*

Resumo da Dissertação

Introdução:

A dengue, doença infecciosa viral, tem como principal hospedeiro o homem, e como principal transmissor mosquitos do gênero *Aedes*. Estima-se que entre 50-100 milhões de pessoas/ano são infectadas pela dengue. O curso da doença pode ser de benigno a grave. Os primeiros registros oficiais no Brasil datam de 1981-1982; hoje a dengue ocorre em todos os Estados brasileiros, com circulação dos quatro sorotipos virais. O Estado do Rio Grande do Sul (RS) vem apresentando crescente número de casos de dengue nos últimos anos, desde a introdução de casos autóctones em 2007.

Objetivos:

Caracterizar o padrão epidemiológico da dengue no RS, no período de janeiro de 2007 a maio de 2013, a partir dos resultados obtidos por métodos moleculares e sorológicos, descrever a sazonalidade dos casos positivos e os sorotipos encontrados.

Material e Métodos:

Um total de 9779 amostras de sangue de pacientes com suspeita de dengue foram submetidas à análise sorológica (análise de detecção do antígeno NS1 e MAC-ELISA) e à análise molecular (qRT-PCR) para identificação dos sorotipos (DENV-1 a 4). Dados demográficos e outras informações dos pacientes foram levantados e analisados.

Resultados:

Em 2007 ocorreram os primeiros casos autóctones de dengue (DENV-3) no RS. Enquanto 2008 e 2009 ocorreram apenas casos importados,

desde 2010 muitos casos autóctones vêm sendo registrados no Estado. Hoje, circulam no RS os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-4. Mulheres foram mais acometidas em 2007 enquanto que, em 2008 e 2009, o sexo masculino foi mais frequente. O maior número de infecções ocorreram em adultos, no verão. Em 2007 cinco municípios gaúchos apresentavam casos autóctones de dengue; hoje, esse número passou para 53. Nenhuma morte foi notificada no período analisado.

Conclusão:

O número de casos de dengue no RS vem aumentando significativamente, e esse aumento se deve, possivelmente, à introdução de novos sorotipos virais e às dificuldades encontradas para controle do vetor.

1. Introdução

1.1. Considerações Gerais Sobre a Dengue

A dengue é uma doença viral transmitida por picada de mosquito que mais rapidamente se dissemina no mundo (WHO, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde, 50-100 milhões de casos de infecção por dengue ocorrem anualmente e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países nos quais o vírus é endêmico, estando expostas à infecção o que afeta significativamente a saúde da população, os encargos sociais e a economia dos países (WHO, 2009; WHO, 2013). O quadro se torna ainda mais preocupante com a publicação de estudos mais recentes, relatando que, anualmente, ocorrem aproximadamente 390 milhões de infecções por dengue e que apenas 96 milhões delas são aparentes (Bhatt e cols., 2013).

A dengue ocorre especialmente nos países tropicais e subtropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do vetor do vírus da dengue (Carod-Artal e cols., 2013). O principal vetor da dengue é o mosquito da espécie *Aedes aegypti*, de ocorrência em diversos países, como demonstrado na Figura 1 (WHO, 2009; Murray e cols., 2013; Messina e cols., 2014); outras espécies do gênero *Aedes*, como, por exemplo, *Ae. albopictus*, também são importantes transmissores do vírus (Guzmán e Kourí, 2002; Tang e Ooi, 2012).



Figura 1. Países/áreas de risco de transmissão da dengue, 2008 (WHO, 2009).

A dengue é uma doença viral infecciosa (Simmons e cols., 2011), não contagiosa (Sabin, 1959), de curso benigno ou grave, dependendo da forma com que ela se apresenta. Assim, a doença pode variar de assintomática a sintomática, podendo ser classificada como: Dengue Clássica (DC), caracterizada por infecção silenciosa, Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) ou até Síndrome do Choque da Dengue (SCD) em casos mais graves (Bäck e Lundkvist, 2013; Sam, 2013; Carod-Artal e cols., 2013).

1.2. Agente Etiológico da Dengue

O vírus da dengue (DENV) é um arbovírus (vírus transmitido por artrópode) pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. O DENV compreende quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gubler, 1998; Bäck e Lundkvist, 2013; Messina e cols., 2014), que podem ser diferenciados por técnicas sorológicas (Burke e cols., 1988) e moleculares (Veza e cols., 1980). Os sorotipos DENV-1 e DENV-4 têm dois genótipos e DENV-2 e DENV-3 têm quatro (Forattini, 2003). A inclusão do

DENV neste gênero é baseada na atividade antigênica com outros flavivírus, bem como na estrutura e organização do seu genoma (Henchal e Putnak, 1990). Cada sorotipo do DENV compartilha aproximadamente 65% do genoma (Guzman e cols., 2010).

Similar a outros flavivírus, o DENV é uma partícula esférica, com cerca de 50nm de diâmetro, e apresenta um capsídeo icosaédrico contendo uma molécula de RNA fita simples não segmentada, de polaridade positiva, com genoma de aproximadamente 11 kilobases (Guzman e cols., 2010; Tang e Ooi, 2012). Esse genoma é organizado em uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês *Open Reading Frame*), que contém 10.233 nucleotídeos e codifica as proteínas estruturais e as proteínas não estruturais (Henchal e Putnak, 1990). A ORF é flanqueada por duas regiões não codificantes: a região 5', que possui estrutura "cap" tipo I, e a região 3', que não possui cauda poli-A (Henchal e Putnak, 1990; Gerhard e cols., 2011).

A ordem dos genes das proteínas codificadas na ORF está representada na Figura 2. O vírion maduro contém três proteínas estruturais: a proteína C, a proteína M e a proteína E (Guzmán e Kourí, 2002; Martins e cols., 2012).

A proteína C é a proteína do capsídeo viral e sua síntese ocorre em ribossomos que não estão ligados a membranas (Henchal e Putnak, 1990; Guzman e cols., 2013).

A proteína M, que compõe o envelope viral, é previamente sintetizada na forma de um precursor glicosilado pré-membrana (prM), sofrendo depois uma clivagem proteolítica específica. Esse processo de clivagem e maturação da proteína M é crucial, consistindo a etapa final da formação do vírus (Chambers e cols., 1990; Weaver e Vasilakis, 2009).

A proteína E é a principal proteína do envelope viral. Essa proteína desempenha um papel em inúmeras atividades biológicas, incluindo montagem do vírion e reconhecimento dos receptores de ligação e fusão de membrana, sendo o maior alvo de anticorpos neutralizantes (Chambers e cols., 1990; Yacoub e cols., 2013).

As proteínas não estruturais responsáveis pela replicação (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) permanecem nas células infectadas, enquanto que as proteínas estruturais são incorporadas na montagem das partículas virais maduras (Monath, 2001; Bäck e Lundkvist, 2013).

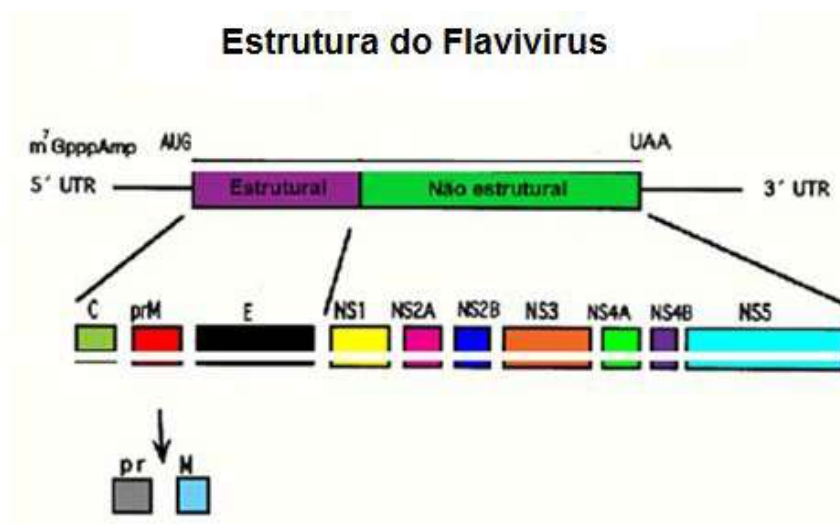


Figura 2. Esquema da estrutura genômica de *Flavivirus*, mostrando os genes estruturais e não estruturais, as regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR, e a formação das proteínas estruturais C, prM e E, e das proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 após o processamento proteolítico. Adaptado de Mcminn, 1997.

1.3. Vetores do Vírus da Dengue

Os vetores do DENV são insetos pertencentes à família *Culicidae* e do gênero *Aedes* (Forattini, 2002). O *Ae. aegypti* é a espécie mais importante na transmissão urbana da dengue nas latitudes tropicais e subtropicais, onde o

vetor se encontra amplamente distribuído (Forattini, 2002; Simmons e cols., 2012).

Outro vetor associado à transmissão da dengue é o *Ae. albopictus*, cuja distribuição geográfica vem aumentando nos últimos anos (Simmons e cols., 2012). Na Ásia, este vetor está associado à transmissão rural e semirural (Braga e Valle, 2007). No Brasil, foi observado em três regiões do país, nos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (Figueiredo, 1998), embora ainda não tenha sido associado a epidemias de dengue no país (Martins e cols., 2012). De acordo com dados da FUNASA/RS, o *Ae. albopictus* foi identificado no RS desde 1996 (dados não publicados). Ainda podem ser citados outros vetores como: *A. polinesiensis*, *A. scutellaris* e outros (WHO, 2009; Tang e Ooi, 2012).

Ocorrem dois ciclos de transmissão do DENV: um envolve primatas não humanos e mosquitos da mata; o outro ciclo, denominado urbano, envolve o homem virêmico e o mosquito *Aedes* sp., que transmite o vírus a outros seres humanos (Forattini, 2003; Figueiredo, 2006; Smith, 2012; Messina e cols., 2014).

1.3.1. Principal Espécie Vetora nas Américas

A espécie de mosquito *Ae. aegypti*, é proveniente da África e hoje pode ser encontrado em todo mundo (Forattini, 2002). Chegou ao Brasil provavelmente no século XVI, à medida que ocorria um tráfego intenso da África para as Américas (Figueiredo, 1998, Forattini e Brito, 2003). É encontrado em maior número nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na faixa que compreende entre latitudes 35°N e 35°S (WHO,

2009). Único mosquito vetor da transmissão do vírus da dengue no Brasil e nas Américas.

O vetor é holometabólico, isto é, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Palencia, 2012). A variação térmica e a pluviométrica são fatores ambientais que podem influenciar na atividade desses mosquitos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Seu ciclo de reprodução completo pode chegar a 10 dias (Silva e cols., 2008).

Uma fêmea pode produzir, em média 120 ovos; esse número dependerá fundamentalmente da disponibilidade de sangue ingerido para o desenvolvimento ovariano (Forattini, 2002). Na fase de ovo, a formação da larva pode levar de dois a quatro dias, dependendo das condições externas (Eiras, 2004). Nessa etapa condições ambientais desfavoráveis, podem fazer com que o mesmo entre em quiescência, ou seja, permanecer inativo por período superior a um ano (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Os ovos são normalmente depositados nas bordas de criadouros de maneira que quando a água entra em contato com o mesmo, inicia-se o processo de eclosão das larvas (Forattini, 2002).

As larvas passam por quatro instares, são aquáticas e de vida livre. A alimentação consiste em microplanctons (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). O período de desenvolvimento larval ótimo é de cinco dias. Temperatura favorável e alimentação adequada são fatores que contribuem para o tempo do desenvolvimento larval (Silva e cols., 2008).

As pupas, assim como as larvas, são aquáticas e de vida livre. Não se alimentam, apenas respiram e passam por modificações que resultam na formação dos adultos (Palencia, 2012). A transição de pupa para adulto é a

fase de maior risco; chuvas, movimentos na água, dentre outros fatores podem ser fatais (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Na fase adulta, ocorre a reprodução e dispersão do mosquito. A longevidade do mosquito adulto, em geral, é de um mês, em regiões temperadas. Na zona tropical esse período varia de duas a três semanas. Logo após o endurecimento do exoesqueleto, a fêmea já pode ser fertilizada e acredita-se que a hematofagia ocorra logo após a cópula (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O *Ae. aegypti*, nas fases imaturas, é encontrado em recipientes artificiais abandonados a céu aberto, como: pratos de vasos, pneus, latas, vidros, vasos de cemitério, piscinas, lagos artificiais abandonados, além de caixas d'água, tonéis, cisternas destampadas ou mal tampadas; ou seja, qualquer local onde tenha água limpa parada, de preferência na sombra (CDC, 2012).

O mosquito adulto, por ser uma espécie doméstica e antropofílica, abriga-se e realiza suas atividades – cópula, alimentação e oviposição – nas proximidades ou no interior dos domicílios (Forattini, 2002).

A alimentação do macho é basicamente de vegetais açucarados. A fêmea é hematófaga, sendo o sangue alimento fundamental para o desenvolvimento dos ovos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). A hematofagia ocorre durante o dia, atingindo picos no crepúsculo matinal e vespertino; caso haja oportunidade, as fêmeas podem realizar a hematofagia durante a noite se o homem se aproximar do seu habitat (Forratini, 2002). Por voarem a uma altura máxima de meio metro, as fêmeas costumam picar as regiões de pernas, tornozelos e pés (Eiras, 2004).

A dispersão espontânea do mosquito fêmea não ultrapassará mais do que o quarteirão aonde iniciou as atividades. Dependendo da disponibilidade de criadouros essa distância poderá chegar a 800 metros (Foratinni, 2002). A dispersão passiva também deve ser considerada, na qual o mosquito é levado a longas distâncias por meios de transporte (Forratini, 2002).

1.4. Modo de Transmissão da Dengue

A transmissão da dengue envolve a fêmea hematófaga do mosquito do gênero *Aedes*. Ocorre através da picada do mosquito infectado em humanos suscetíveis (Guzman e cols., 2010). Outra forma de transmissão importante, entre mosquitos, é a transovariana ou vertical, na qual a fêmea portadora do DENV gera proles infectadas, dispensando o homem do ciclo mantenedor (Rosen, 1988 e Martins e cols., 2012).

Há ainda relatos de transmissão vertical (gestante – bebê) do DENV. De acordo com Maroun e colaboradores (2008), casos de transmissão vertical do DENV-2 já ocorreram no Brasil, o aumento do número de casos desta modalidade de transmissão torna-se um motivo a mais de preocupação para os profissionais de saúde (Maroun e cols., 2008).

1.5. Período de Transmissibilidade da Dengue

O período de incubação do vírus da dengue no homem é de três a sete dias (Simmons e cols., 2012). O período de viremia no hospedeiro humano dura em média cinco dias (Guzman e cols., 2010).

O mosquito vetor se torna infectado quando pica um humano durante o período virêmico e, depois de um período de aproximadamente 10 dias, ele é

capaz de transmitir o vírus (Guzman e cols., 2010). Uma vez com o DENV, o mosquito torna-se um transmissor permanente da doença até o fim de sua vida (MS, 2009).

1.6. Aspectos Clínicos

A resposta clínica à infecção pelo DENV causa um espectro de doenças, variando de forma assintomática ou doença com febre média no caso da Dengue Clássica, até febre severa e doença hemorrágica fatal no caso da Febre Hemorrágica da Dengue e da Síndrome do Choque da Dengue (WHO, 2009; Bäck e Lundkvist, 2013; Sam e cols., 2013).

Infecções subsequentes (secundárias ou terciárias), com um sorotipo heterólogo do DENV, têm sido consideradas o principal fator associado com doença grave, devido ao aumento de anticorpos (Carod-Artal e cols., 2013).

Segundo Yacoub e colaboradores (2013), os sorotipos dois e três estão associados a surtos de dengue mais severos, enquanto os sorotipos um e quatro estão muitas vezes ligados a uma doença mais leve.

1.6.1. Dengue Clássica

Na Dengue Clássica (DC), a primeira manifestação é a febre alta (39°C a 40°C), de início abrupto, cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retro-orbital, náuseas, vômito, exantema, prurido cutâneo (Carod-Artal e cols., 2013). Alterações hepáticas como a hepatomegalia dolorosa pode ocorrer desde o aparecimento da febre. De acordo com a idade do paciente podem ocorrer sintomas clínicos diferentes. Desse modo, dor abdominal

generalizada tem sido observada mais frequentemente entre crianças; e nos adultos têm sido observadas com maior frequência manifestações hemorrágicas como petéquias, epistaxe, gengivorragia e metrorragia após o fim do período febril. A doença tem duração de cinco a sete dias, mas debilidade física pode prolongar-se por várias semanas (Guzman e cols., 2010).

1.6.2. Febre Hemorrágica da Dengue e Síndrome do Choque da Dengue

A Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e na Síndrome do Choque da Dengue (SCD), inicia-se com os mesmos encontrados na DC, porém há um agravamento a partir do terceiro ou quarto dia da evolução da doença, com o aumento da permeabilidade vascular (Síndrome do Extravasamento Plasmático) e trombocitopenia acentuada (<100.000 plaquetas/ μL) associada com hemorragia, hepatomegalia e alteração na função renal (Tantawichien, 2012; Carod-Artal e cols., 2013). Manifestações hemorrágicas podem aparecer, como petéquias, equimoses, epistaxe, gengivorragia, menorrêia, hemorragia em diversos órgãos (gastrointestinal, intracraniana, etc.) (Tantawichien, 2012).

Nos casos graves de FHD e de SCH, o choque geralmente ocorre entre o terceiro e o sétimo dias do início da doença, é de curta duração e pode levar a óbito no período de 12 a 24 horas caso não utilize a terapia antichoque apropriada, na qual pode ser obtida uma rápida recuperação (Tomashek e Margolis, 2011).

Alguns pacientes podem, ainda, apresentar manifestações neurológicas que podem ser categorizadas como: encefalopatias, encefalites, síndrome imunomediada, disfunção muscular (por exemplo, Síndrome de Guillain-Barré,

Rabdomiólise) e disfunção neuro-oftalmológica (Singh e Aneja, 2012; Carod-Artal e cols., 2013).

A OMS classifica a FHD e a SCD em quatro categorias, de acordo com a gravidade. No Grau I o paciente apresenta febre acompanhada de sintomas inespecíficos, e prova do laço positiva (manifestação hemorragia); no Grau II, o indivíduo apresenta os mesmos sintomas do Grau I, somam-se hemorragias espontâneas (sangramentos na pele, petéquias, epistaxe, gengivorragia e outras); no Grau III o quando do paciente é agravado por colapsos circulatórios com pulso fraco e rápido, diminuição da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação; na última categoria de classificação, o Grau IV, o paciente apresenta uma grave piora, entrando em choque profundo, pressão arterial e pulso imperceptível (Síndrome do Choque da Dengue) (WHO, 2009).

1.7. Epidemiologia da Dengue no Mundo

Os mais antigos relatos de uma doença possivelmente causada pelo vírus da dengue encontram-se na Enciclopédia Chinesa e foram descritos durante as dinastias Chin (265 a 420 d.C.), Tang (610 d.C.) e Sung (992 d.C.) (Nobuchi, 1979). Desde então, diversas epidemias de febre pouco explicadas foram registradas ao longo da história. Neste sentido, epidemias registradas nas Antilhas Francesas em 1635 e no Panamá em 1699 poderiam ter sido dengue (Howe, 1977; Dick e cols., 2013). No século XVIII foi verificada uma ampla distribuição geográfica de uma doença muito similar à dengue, quando ocorreram as primeiras pandemias. Em Jacarta (na Indonésia) e no Egito foram registradas epidemias de febre em 1779, porém é incerto se foram causadas pelo DENV ou pelo vírus Chikungunya, que também é transmitido por espécies

do gênero *Aedes*. Nessa mesma época, uma epidemia de febre ocorreu na Filadélfia em 1780, sendo bastante provável que tenha sido dengue, dados não confirmados laboratorialmente (Carey, 1971). Posteriormente, no século XIX, casos de dengue foram identificados em Zanzibar, em Calcutá, e nas Américas ou Índias Ocidentais (Schlesinger e cols., 1977). No século XX muitas regiões foram acometidas por dengue, como Hong Kong, Estados Unidos, Austrália, Grécia, Japão, sudeste da Ásia, América Central e Caribe (Gubler, 1987); em 1943 no Japão e em 1945 no Havaí, foram isolados os dois primeiros sorotipos de DENV, o DENV-1 e o DENV-2, respectivamente (Messina e cols., 2014). Desde então, vários sorotipos do DENV têm se tornado endêmico na maioria dos países da América tropical e subtropical e são regularmente associados a surtos da doença (Messina e cols., 2014).

Depois da Segunda Guerra Mundial, as alterações ambientais e o intenso deslocamento humano somado ao intenso crescimento populacional e à urbanização descontrolada criaram condições ideais para o aumento da circulação do mosquito transmissor da doença, culminando com o início de uma pandemia de dengue (Gubler, 1998). Em 1954, na Ásia, foram identificados os primeiros casos de FHD e SCD (Halstead, 1966). Em 1970, a dengue foi reintroduzida nas Ilhas do Pacífico, e os casos de epidemias de dengue aumentaram tanto naquela região quanto nas Américas (Gubler, 1998).

A partir de 1980, foram notificadas epidemias em vários países, aumentando consideravelmente a magnitude do problema. Cabe citar as epidemias ocorridas no Brasil (1916-1982/1986-2002), Argentina (1916), Porto Rico (1915-1945-1972/1973-1986), Estados Unidos da América (1922-1980), Venezuela (1945/1946), México (1946-1978-1984), Colômbia (1971/1972-

1975/1976), El Salvador (1982), Suriname (1982), Bolívia (1987), Paraguai (1988), Equador (1988), Peru (1990) e Cuba (1944-1977/1981). A FHD e a SCD afetaram Cuba em 1981, evento de extrema importância na história da dengue nas Américas. Essa epidemia foi o primeiro relato de FHD e de SCD ocorrido fora do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental. O segundo surto ocorreu na Venezuela, em 1989-1990 (Dick e cols., 2012).

No ano de 2013, na Trigésima Conferência Internacional de Dengue e Febre Hemorrágica da Dengue, o Virologista Nikos Vasilakis anunciou a descoberta de um sorotipo de dengue filogeneticamente diferente dos outros quatro já encontrados. Esse novo sorotipo viral (DENV-5), foi encontrado em amostras de um surto ocorrido na Malásia no ano de 2007 (Normeli, 2013).

1.8. Epidemiologia da Dengue no Brasil

No Brasil, há referências de dengue desde o século XIX. Com a campanha brasileira de erradicação da febre amarela em 1903 com Emílio Ribas, e Oswaldo Cruz em 1904, houve um empenho muito grande do Governo Federal em eliminar o mosquito transmissor da febre amarela, o mosquito do *Ae. Aegypti*, que também é vetor do vírus da dengue. Depois de 1920, com assistência técnica e suporte da Fundação Rockefeller, a campanha de erradicação foi alcançada com sucesso (Franco, 1961; Figueiredo, 1998). Essa campanha foi muito eficiente até 1967, quando o mosquito foi novamente detectado no país, possibilitando o surgimento de epidemias. A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista, Rondônia, causada pelo DENV-1 e pelo DENV-4 (Siqueira e cols., 2005; Dick e cols., 2012). Em 1986, ocorreram epidemias em algumas capitais

da região Nordeste e no Rio de Janeiro, onde houve a circulação do DENV-1; a partir dessas regiões, o vírus disseminou-se para outros seis estados brasileiros (Schatzmayr e cols., 1986). A partir de 1990, o DENV-2 foi introduzido no Rio de Janeiro (Dick e cols., 2012), causando centenas de casos de FHD e SCD e um número incerto de óbitos (Figueiredo, 2006). Durante a década de noventa, a ampla dispersão do mosquito *Ae. aegypti* no território nacional levou à disseminação do DENV-1 e do DENV-2 para 20 dos 27 estados. Nos anos de 1990 a 2000 várias epidemias de dengue foram notificadas, sobretudo nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. Na segunda metade da década de 90 é que as regiões Centro-Oeste e Norte foram acometidas pela dengue (MS, 2009). O DENV-3 foi identificado pela primeira vez no Brasil em 2000, no Rio de Janeiro (Araújo e cols., 2012). Em 2001, o DENV-3 foi identificado no Estado de Roraima (Braga e Valle, 2007) e, posteriormente, sua ocorrência foi registrada em todo o país, exceto em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul (Figueiredo, 2006).

Entre 1982 e 2008, nenhum caso de infecção pelo DENV-4 foi reportado no Brasil. Em 2008, esse sorotipo foi detectado em três pacientes em Manaus, os quais sequer apresentavam histórico de viagem internacional (Figueiredo e cols., 2008). Nos anos seguintes, o DENV-4 se espalhou pelo país, causando várias epidemias tanto de DC quanto de FHD e de SCD.

Segundo o Ministério da Saúde, entre 1990 e 2012 os anos nos quais mais casos de DC foram notificados no Brasil foram 2002 e 2010. No ano de 2002, 676.472 casos foram notificados, onde a região Sudeste apresentou 51,1% das notificações, a região Nordeste 38,3%, região Centro-Oeste 6,6%, região Norte 2,8% e região Sul 1,1% (SVS, 2012), correspondendo a cerca de

80% dos casos de dengue em toda a América no mesmo ano (Braga e Valle, 2007). Em 2010, 1.011.548 casos foram notificados, sendo que a região Sudeste notificou 47% dos casos, a região Centro-Oeste 21,3%, a região Nordeste 17,5%, a região Norte 9,8% e a região Sul 4,2% (SVS, 2012). Durante o ano de 2008, foram reportados 734.384 casos suspeitos de dengue, com 9.957 casos complicados e 225 mortes (Dick e cols., 2012). No ano de 2009 o total de casos de FHD e de SCD notificados foi de 4.455 casos (SVS, 2012), número este ultrapassado em 2010, quando 17.489 casos de FHD e 656 mortes foram reportados (Dick e cols., 2012).

Em 2012, 97,5% dos casos de dengue na América do Sul foram registrados no Brasil, o que correspondeu a 565.000 casos (Lourenço-de-Oliveira e cols., 2013).

De janeiro a março de 2013 foram notificados 635.100 casos suspeitos de dengue comparados a 167.200 no mesmo período no ano de 2012, ou seja, um aumento de 279%. Apesar do aumento no número de notificações, os casos graves notificados diminuíram de 1.316 para 1.243. Já a quantidade de óbitos passou de 102 para 108 casos. Os estados com maior incidência são Mato Grosso do Sul (2.947,8), Goiás (1.366,9) e Espírito Santos (801,5). Ainda, segundo o Ministro da Saúde, Alexandre Padilha, no Brasil há maior circulação do DENV-4 seguido do DENV-1 (Neri, 2013). Até a presente data o DENV-5 não foi notificado no Brasil.

O Ministério da Saúde, em 1996, propõe o Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), ao longo do seu processo de implantação observou-se a inviabilidade técnica de erradicar o mosquito a curto e médio prazos. Em 2002, o Ministério da Saúde juntamente com a Fundação Nacional de Saúde

(FUNASA), apresentam o Programa Nacional de Controle da Dengue com o objetivo de reduzir a infestação pelo *Ae. aegypti*, reduzir a incidência de dengue e reduzir a letalidade por FHD (Brasília, 2002). As Secretarias de Saúde de cada Estado monitoram a ocorrência do mosquito *Ae. aegypti* através do programa de Levantamento Rápido de Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAA), no qual agentes de saúde analisam a presença de larvas do mosquito nos domicílios de todo o país. A partir desse levantamento, tem-se o Índice de Infestação Predial, parâmetro utilizado para o controle do vetor transmissor e da disseminação da doença (Brasil, 2013).

1.9. Epidemiologia da Dengue no Rio Grande do Sul

No Estado do Rio Grande do Sul (RS), o primeiro surto de DC foi reportado por Mariano (1916), porém sem confirmação laboratorial.

Segundo os dados do Ministério da Saúde de 1990 a 2012, a dengue voltou a circular somente em 1996. A partir desse ano, exceto o ano de 1997, sempre ocorreram notificações dessa doença no RS, porém até 2006 todos os casos eram importados (SVS, 2012).

Nos anos de 2001, 2002 e 2003, a cidade de Porto Alegre sediou o Fórum Social Mundial, evento que ocorreu no verão e atraiu pessoas de vários países de diferentes regiões geográficas. Muito provavelmente o evento contribuiu para o registro de casos importados de dengue, que só em 2002 chegou a 436 casos (dados não publicados).

1.10. Diagnóstico Laboratorial da Dengue

A dengue não é uma doença de difícil diagnóstico diferencial, porém, quando ocorrem situações não epidêmicas ou suspeita da doença em viajantes, se torna mais difícil devido à clínica da dengue ser facilmente confundida com outras doenças, como infecção por flavivírus não dengue (incluindo febre amarela, encefalite Japonesa, encefalite Saint Louis, febre chicungunya), outras causas de febre como a leptospirose, malária, febre tifóide, sarampo, enterovirose, gripe por influenza, e febres hemorrágicas como a febre da Criméia, febre do Congo, hantavirose e ebola (WHO, 2009; Simmons e cols., 2012).

O diagnóstico eficiente e preciso para dengue é de importância primária no cuidado clínico, nas atividades de vigilância, no controle de surtos, bem como para pesquisas acadêmicas, desenvolvimento de vacinas e ensaios clínicos (WHO, 2009).

Os métodos diagnósticos para confirmação de infecção pelo DENV podem envolver técnicas de detecção de vírus, ácido nucleico viral, antígenos, anticorpos ou uma combinação dessas técnicas. Após o início da doença, o vírus pode ser detectado em soro, plasma, células sanguíneas circulantes e outros tecidos, por quatro a cinco dias. Durante o estágio inicial da doença, técnicas de isolamento viral, detecção de ácido nucléico ou detecção de antígeno podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção. No final da fase aguda da infecção, a sorologia é o método de escolha para o diagnóstico (Simmons e cols., 2012; Bäck e Lundkvist, 2013).

1.10.1. Métodos Viroológicos

Os sistemas utilizados para isolamento do DENV são quatro: inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos; uso de cultivo em linhagens celulares específicas (Vero, BHK-21, SW13, AP61 e LLC-MK₂); inoculação intratorácica em mosquitos adultos, e uso de cultura em células de mosquitos (células C6/36 de *Ae. albopictus*) (Gubler, 1998; Guzmán e Kourí, 2002). Devido à alta sensibilidade na técnica de inoculação em mosquitos, este ainda é o método de escolha para o isolamento do DENV, principalmente em casos fatais. O cultivo viral das células C6/36 a partir da inoculação das mesmas com amostras de pacientes em fase aguda é atualmente o método de escolha para isolamento e replicação viral (Guzmán e Kourí, 2002, Guzman e cols., 2010).

O método de escolha para a identificação do DENV a partir de cultura é a imunofluorescência indireta (IFI) com uso de anticorpo monoclonal espécie-específico para os quatro sorotipos da dengue (Guzman e cols., 2010). O sucesso na identificação do vírus depende de vários fatores. O manuseio da amostra e a conservação do material são de extrema importância. O nível de viremia pode variar dependendo do tempo após o início dos sintomas, título de anticorpos ou a cepa do vírus infectante. O pico de viremia inicia um pouco antes do início dos sintomas e permanece detectável, em média, por 4 a 5 dias. O sucesso no isolamento do vírus diminui rapidamente com o aparecimento do anticorpo IgM (Gubler, 1998).

Técnicas de detecção molecular, baseadas na detecção do RNA viral durante a fase virêmica, vêm sendo desenvolvidas (Ortiz e cols., 2012). Dentre elas, a hibridização de ácidos nucleicos e a transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) são as mais utilizadas.

Oligonucleotídeos iniciadores de cadeia (*primers*) específicos para o DENV e sequências consenso localizadas em diferentes genes dos flavivírus têm sido amplamente utilizados para detecção e identificação dos sorotipos da dengue (Guzmán e Kourí, 1996; Bäck, 2013).

Com a evolução dos testes moleculares e de equipamentos como o termociclador em tempo real (para realização de reações em cadeia da polimerase quantitativa– qPCR), naturalmente está havendo uma migração dos métodos diagnósticos para esta plataforma. A utilização da qPCR significa um avanço no diagnóstico das arboviroses, fornecendo respostas rápidas e precisas sobre as infecções, incluindo a quantificação da carga viral.

No caso de vírus de RNA, como o DENV, utiliza-se a qRT-PCR, em que primeiramente é realizada a transcrição reversa para síntese do DNA complementar ao RNA (cDNA), seguida por qPCR. Os produtos de amplificação também podem ser submetidos ao sequenciamento, que também serve de base para genotipagem e estudos filogenéticos. O emprego dessa técnica pode permitir um adequado monitoramento epidemiológico da dengue. Ainda, o emprego da qRT-PCR apresenta a conveniência de uma única amostra clínica fornecer um diagnóstico diferencial entre a dengue e a febre amarela, principalmente nos casos de febre hemorrágica (Bronzoni e cols., 2005), além da identificação do sorotipo viral.

1.10.2. Métodos Sorológicos

Cinco métodos sorológicos são utilizados rotineiramente para o diagnóstico da infecção por dengue: inibição de hemaglutinação (HI); fixação do complemento (FC); teste de neutralização (TN); ELISA (do inglês *Enzyme*

Linked Immunosorbent Assay) indireto para IgG; e reação imunoenzimática de captura para IgM (MAC-ELISA) (Guzman e cols., 2010). Muitos *kits* comerciais para anticorpos IgM e IgG são encontrados, porém estes *kits* têm uma alta taxa de resultado falso positivo comparado com os testes padrão, especialmente em amostras com densidade óptica na faixa do inconclusivo (Gubler, 1998).

O MAC-ELISA é um teste sorológico padrão amplamente utilizado para o diagnóstico da dengue. A técnica é simples, rápida e requer equipamentos simples (Gubler, 1998). O MAC-ELISA utiliza anticorpos monoclonais caprinos anti-IgM humana, que são imobilizados em uma placa tipo ELISA, na qual é adicionada a amostra de soro diluída para que ocorra a ligação IgM–anticorpo anti-IgM. Após lavagem, são adicionados antígenos dos quatro subtipos de DENV, os quais se ligam ao complexo caso haja anticorpos IgM para os respectivos antígenos. Por fim, é adicionado o conjugado, que consiste de uma proteína com afinidade ao complexo ligado e à substância cromogênica que fará a revelação da reação (Kuno e cols., 1987). O MAC-ELISA apresenta maior especificidade do que o ELISA indireto, com menor possibilidade de reação cruzada e de resultados falso-positivos, porém com grande possibilidade de reação cruzada para outros flavivírus (Guzman e cols., 2010).

Na fase aguda da infecção por dengue podem ser observados os padrões de resposta sorológica primária e secundária. O padrão primário envolve um indivíduo que não é imune a flavovirose, enquanto o padrão de resposta secundária ocorre com indivíduos com infecção aguda por dengue e que já tiveram prévia infecção por flavivírus. Um indivíduo infectado por um sorotipo não poderá ser infectado com o mesmo sorotipo (Guzmán e Kourí, 1996).

Considerando a recente introdução do DENV no Estado do Rio Grande do Sul, poucos estudos descrevem o perfil epidemiológico da infecção na região. Alguns estudos filogenéticos do DENV no Brasil com amostras de pacientes incluem algumas amostras do RS. Ainda assim, estudos mais aprofundados são necessários a fim de se compreender a epidemiologia molecular da dengue. Desta forma, este trabalho propõe uma análise dos dados epidemiológicos de dengue no RS de 2007 a 2013 e dos sorotipos virais circulantes no período.

1.11. Referências Bibliográficas

- Araújo JMG, Bello G, Romero H, Nogueira RMR. Origin and evolution of dengue vírus type 3 in Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2012Sep;6(9):e1784.
- Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses – an overview. Infect Evol Epidemiol. 2013Aug;3:10.3402/iee.v3i0.19839.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al.* The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496:504-7.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Dengue – Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes Aegypti* (LIRAA) para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil : metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- Braga IP, Valle D. *Aedes aegypti*: History of control in Brazil. Epidemiol Serv Saúde. 2007;16(2):113-8.
- Bronzoni RVM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. Duplex-RT-PCR followed by nested-PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. J Clin Microbiol. 2005 Feb;43(2):696-702.
- Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. Am J Trop Med Hyg. 1988;38:172-80.
- Cardoso JC, Corseuil E, Barata JMS. Culicinae (díptera, Culicidae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Bras Entomol. 2005Jun;49(2):275-87.

- Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci*. 1971 Jul;26(3):243-62. Revisado em: Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990 Oct;3(4):376-96.
- Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infections. *Lancet Neurol*. 2013;12:906-19.
- CDC. Centers for Disease Control and Preventions. Dengue and the *Aedes aegypti* mosquito. Puerto Rico: CDC;2012. Avaliado em: <http://www.cdc.gov/dengue/resources/30jan2012/aegyptifactsheet.pdf>.
- Chambers TJ, Chang SH, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome, organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:649-88.
- Consoli RAGB; Lourenço-de-Oliveira R. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 225 pp.
- Dick OB, Martín JLS, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(4):584-93.
- Eiras AE. Culicidae. In: Neves DP. *Parasitologia Humana*: 11ed. São Paulo: Atheneu; 2004. Capítulo 43.
- Figueiredo LTM. History, present and future of dengue fever in Brazil. In : Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, ed. *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998:155-63.
- Figueiredo LTM. Febre hemorrágica por vírus no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Mar-Abr;39(2):203-10.
- Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos SM, Melo MN, Viana SS, Mourão MP, *et al*. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Apr;14(4):667-9.
- Forattini OP. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*. 2ª edição, vol. 2. São Paulo: EdUSP; 2002.
- Forattini OP. Epidemiology and phylogenetic relationships of dengue viruses. *Dengue Bull*. 2003;27:91-4.
- Forattini OP, Brito M. Household water reservoirs and control of *Aedes aegypti*. *Rev Saude Publica*. 2003;37(5):676-7.
- Franco O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1961;13:43-8.
- Gerhard LG, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*. 2011Sep;3(9):1739-56.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. *P R Health Sci J*. 1987 Aug;6(2):107-11. Revisado em: Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990 Oct;3(4):376-96.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.

- Guzmán MG, Kourí G. Minireview. Clin Diagn Lab Immunol. 1996;3:621-27.
- Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. Lancet Infect Dis. 2002 Jan;2(1):33-42.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, *et al.* Dengue: a continuing global threat. Nat Rev Microbiol. 2010Dec;8(12 Suppl):S7-16.
- Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. Arch Virol. 2013Mar;158:1445-59.
- Halstead SB. Mosquito-borne hemorrhagic fevers of South and Southeast Asia. Bull. World Health Organ. 1966;35:3-15.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. Clin Microbiol Rev. 1990 Oct;3(4):376-96.
- Howe GM. A world geography of human diseases. Academic Press, Inc., New York, N.Y. 1977. Revisado em: Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev. 1998Jul;11(3):480-96.
- Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg. 1987Jan;36(1):153-9.
- Lourenço-de-Oliveira R, Rua AR, Vezzani D, Willat G, Vazielle M, Mousson L, *et al.* *Aedes aegypti* from temperate regions of South America are highly competent to transmit dengue virus. BMC Infect Dis. 2013Dec;13:610.
- Martins VEP, Alencar CH, Kamimura MT, Araújo FMC, De Simone SG, Dutra RF, *et al.* Occurrence of natural vertical transmission of Dengue-2 and Dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. PLoS ONE. 2012Jul7(7):e41386.
- Mariano F. A dengue. Considerações a respeito de sua incursão no Rio Grande do Sul, em 1916. Arch Bras Med. 1916;8:271-77 Revisado em: Dick OB, Martín JLS, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. Am J Trop Med Hyg. 2012;87(4):584-93.
- Maroun SLC, Marliere RCC, Barcellus RC, Barbosa CN, Ramos JRM, Moreira MEL. Case report: vertical dengue infection. J Pediatr (Rio J). 2008;84(6):556-59.
- Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott PM, Duda KA, *et al.* Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. Trends Microbiol. 2014. pii:s0966-842x(13)00273-4 [Epub ahead of print].
- Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: 7ª edição. Brasília: Ministério da Saúde. SVS; 2009. Caderno 9.
- Mcminn PC. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. J Gen Virol. 1997Nov;78:2711-22.
- Monath TP. Yellow fever: an update. Lancet Infect Dis. 2001;1: 11-20.

Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*. 2013Aug;5:299-309.

Neri F. Registro de suspeitas de dengue aumenta 279% de janeiro a março. Brasília: Globo.com; 2013. Avaliado em: <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2013/04/registro-de-suspeitas-de-dengue-aumenta-279-de-janeiro-marco.html>

Nobuchi H. The symptoms of a dengue-like illness reported in a Chinese medical encyclopedia (in Japanese). *Kanpo Rinsho*. 1979;26:422-5. Revisado em: Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.

Normile D. First new dengue virus type in 50 years. Bangkok: Science Insider; 2013. Avaliado em: <http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>.

Ortiz A, Capitan Z, Mendonza Y, Cisnero J, Moreno B, Zaldivar Y, *et al*. Simple, specific molecular typing of dengue virus isolates using one-step RT-PCR and restriction fragment length polymorphism. *J Virol Methods*. 2012;185:139-35.

Palencia DS. Mosquitoes larvae fauna (Diptera: Culicidae) from urban area of Armação dos Búzios city, Rio de Janeiro. *REB*. 2012;5(2):13-30.

Rosen L. Further observations on the mechanism of vertical transmission of Flaviviruses by *Aedes* mosquitos. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;39:123-6.

Sabin AB. Dengue. In T Rivers and F Horsfall (ed.), *Viral and rickettsial infections of man*. JB Lippincott Co., Philadelphia. 1959;361-373. Revisado em: Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990 Oct3(4):376-96.

Sam SS, Omar SFS, Teoh B, Abd-Jamil J, AbuBakar S. Review of dengue hemorrhagic fever fatal cases seem among adults: a retrospective study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013May2;7(5):e2194.

Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA. Na outbreak of Dengue vírus at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986;8: 245-6.

Schlesinger RW. Dengue viruses. Springer-Verlag, New York. 1977. Revisado em: Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990 October;3(4):376-96.

SES. Secretaria Estadual de Saúde. Plano de Contingência para Dengue no Estado do Rio Grande do Sul. Brasil: Comissão Estadual para Elaboração do Plano de Contingência para Dengue no Rio Grande do Sul; 2008. Avaliado em: <http://www1.saude.rs.gov.br/dados/1298557617151Plano%20Estadual%20de%20Contigencia%20Dengue%20RS.pdf>.

SES. Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. Análise da Situação. Brasil: Programa Estadual de controle da Dengue; 2011. Avaliado em: http://www.saude.rs.gov.br/upload/1356530312_ANALISE%20SITUACAO%20DENGUE%20RS%202007%20A%202011.pdf

SES. Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. Situação epidemiológica da dengue no Rio Grande do Sul - 2012. Brasil: Secretaria do

- Estado do Rio Grande do Sul; 2012. Avaliado em:
http://www.saude.rs.gov.br/upload/1358526617_Casos%20confirmados%20de%20Dengue%20no%20RS,2012%20%20revisado%20Marilina-1.pdf RS,
- SES. Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. Situação Epidemiológica da Dengue no Rio Grande do Sul – 2013. Brasil: SES; 2013. Avaliado em:
http://www.saude.rs.gov.br/upload/1368552308_Dados%20pagina%20dengue%2014.5.pdf
- Silva JS, Mariano ZF, Scopel I. The dengue fever in Brazil and combat dengue fever to the *Aedes aegypti*: of the try eradication to contol policies. Hygeia. 2008;3(6):163-75.
- Simmons CP, Farrar JJ, Chau NV, Wills B. Dengue. N Engl J Med. 2012Apr;366:1423-32.
- Siqueira JB, Martelli CMT, Coelho GE, Simplicio ACR, Hatch DC. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. Emerg Infect Dis. 2005Jan;11:48-53.
- Smith Dr. An update on mosquito cell expressed dengue virus receptor proteins. Insect Mol Biol. 2012;21(1):1-7.
- Singh P, Aneja S. Neurological manifestations of dengue. Pediatr Infect Dis. 2012(4):160-4.
- SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2012. Brasil: MS; 2012. Avaliado em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_classica_2012_at032013.pdf
- SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue. Brasil: Portal da Saúde; 2013. Avaliado em:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525.
- Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10(8):895-907.
- Tantawichien T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in adolescents and adults. Paediatr Int Child Health. 2012May;32(s1):22-7.
- Tomashek KM, Margolis HS. Dengue: a potencial transfusion-transmitted disease. Transfusion. 2011Aug;51(8):1654-60.
- Veza AC, Rosen L, Repik P, Dalrymple J, Bishop DHL. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. Am J Trop Med Hyg. 1980;29:643-52.
- Xavier I, Valle G, Lunkes D, Nedel AS, Anarbor V, Campos MMA, *et al.* Fatores epidemiológicos do dengue na região central do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007-2010. Cienc Rural. 2013Jan;43(1):78-90.
- Yacoub S, Mongkolsapaya J, Sreaton G. The pathogens of dengue. Curr Opin Infect Dis. 2013;26(3):284-89.

Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):523-40.

WHO. World Health Organization. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva: WHO; 2009. Avaliado em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143157/>

WHO. World Health Organization. Dengue and severe dengue. Fact sheet number 117. Geneva: WHO; 2013. Avaliado em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>.

2. Objetivos

O principal objetivo deste estudo é apresentar os dados epidemiológicos da dengue no Rio Grande do Sul, no período preestabelecido (de janeiro 2007 a maio de 2013), a partir dos resultados obtidos com a utilização das técnicas de transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e por MAC-ELISA, técnica padrão para detecção de imunoglobulina IgM.

Os objetivos específicos deste estudo compreendem em:

- a) Verificar a prevalência de dengue em amostras de soro encaminhadas ao IPB-LACEN/RS de pacientes sob suspeita de dengue por qRT-PCR e MAC-ELISA;
- b) Identificar os subtipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, circulantes no RS, por qRT-PCR;
- c) Caracterizar o perfil epidemiológico da dengue no período de 2007-2013 utilizando dados das fichas dos pacientes com suspeita de dengue no Estado do RS.

3. Artigo científico redigido em inglês

O Abstract foi aceito em 12 de Fevereiro de 2014 pelo editor da Revista “PLoS Neglected Tropical Diseases” na forma de presubmission inquiry (anexo 5.4). O manuscrito completo foi enviado em Fevereiro de 2014.

LABORATORY SURVEILLANCE OF DENGUE IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL, FROM 2007 TO 2013

Gabriela Luchiari Tumimoto

E-mail: gatumioto@gmail.com

Affiliation: Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil; Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central/Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/FEPPS-RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Tatiana Schäffer Gregianini

E-mail: tatiana-gregianini@fepps.rs.gov.br

Affiliation: Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central/Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/FEPPS-RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Bibiana Paula Dambrós

E-mail: bibianapaula@gmail.com

Affiliation: Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central/Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/FEPPS-RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Beatriz Carneiro Cestari

E-mail: beatrizccestari@gmail.com

Affiliation: Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central/Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/FEPPS-RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Zenaida Marion Alves Nunes

E-mail: marion@fepps.rs.gov.br

Affiliation: Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central/Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/FEPPS-RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Ana Beatriz Gorini da Veiga*

E-mail: anabgv@ufcspa.edu.br; anabgv76@gmail.com

Affiliation: Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil; Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil;

*Corresponding author: Ana B. Gorini da Veiga. Rua Sarmento Leite, 245/sala 309 – Centro, Porto Alegre, RS. CEP 90050-170. Brazil. E-mail: anabgv@ufcspa.edu.br; anabgv76@gmail.com

ABSTRACT

Background: According to official records, dengue was introduced in Brazil in the 80's; since then several epidemics have occurred. Meanwhile, in Rio Grande do Sul (RS, Southern Brazil) the first autochthonous case occurred only in 2007; since then, the number of dengue cases has increased in RS.

Methodology and Principal Findings: In this study we report laboratory surveillance of

dengue cases and seasonality of positive cases, describe serotypes and characterize the epidemiological pattern of dengue in RS from 2007 to 2013. A total of 9,779 serum samples from patients with suspected dengue fever were collected and submitted to serological test and/or dengue virus identification based on NS1 antigen and IgM antibody capture by MAC-ELISA. The first autochthonous dengue case in RS was confirmed in 2007 (DENV-3). While in 2008 and 2009 only imported cases were registered, autochthonous infection waves have been occurring since 2010. The highest number of dengue infections occurred in 2010, with DENV-1 and DENV-2 outbreaks in northwestern RS. In 2011, another DENV-1 and DENV-2 outbreak occurred in the northwestern region; moreover, DENV-4 was detected in travelers. In 2012, DENV-1 and DENV-4 co-circulated. DENV-2 circulation was only detected again in 2013, in high frequency (56.7%), co-circulating with DENV-4 (35%). Most infections occur in adults during summer. Differences in prevalence between genders were observed in 2007 (60% females), 2008 (60.8% males) and 2009 (77.5% males). Conclusions: According to results of dengue surveillance, there was an increase in the number of dengue cases in RS and of cities infested with *Aedes aegypti*, possibly as a consequence of introduction of new serotypes and the difficulty of health programs to eradicate the vector.

AUTHOR SUMMARY

Dengue is the most important human viral disease transmitted by arthropod vectors and is considered a serious public health problem, affecting 50-100 million people/year worldwide. This virus is widespread in tropical and subtropical areas. In Brazil, dengue was introduced in the 80's; since then several epidemics occurred. This study analyzes the epidemiological pattern, sazonality and circulating serotypes of positive dengue cases Rio Grande do Sul, Brazil, during 2007-2013. The first autochthonous case occurred in 2007, being serotyped as DENV-3. In 2008 and 2009 only imported cases were reported. The highest number of cases occurred in 2010, with co-circulation of

DENV-1 and DENV-2; these serotypes also co-circulated in 2011. DENV-1 and DENV-4 co-circulated in 2012. DENV-2 was again detected in 2013 in high frequency, as well as DENV-4. Differences in prevalence between genders were observed in 2007 (60% females), in 2008 (60.8% males) and in 2009 (77.5% males). Most infections occur in adults during summer, preceded by an increase in rainfall during spring which favors the mosquito's reproduction and dissemination. None of the cases had the outcome of death. Autochthonous cases increased from 5 in 2007 to 53 in 2013.

INTRODUCTION

Dengue fever (DF) is the most important arthropod-borne viral disease and is considered a serious public health problem [1], affecting between 50-100 million people/year worldwide, causing 250,000 cases of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF). Moreover, 2.5 billion people live in 100 dengue-endemic countries, including Brazil [2]. The clinical response to infection by dengue virus (DENV) causes a spectrum of disease symptoms [3, 4], from mild DF to severe DHF and Dengue Shock Syndrome (DSS). DENV is transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes* and consists of four closely related but antigenically distinct serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) [4]. All four serotypes can be distinguished by serological and molecular [5, 6] methods.

In Brazil, there are reports of dengue epidemics in 1916 and 1923, in the States of São Paulo and Rio de Janeiro (Southeast Brazil), respectively. However, the first officially reported DENV outbreak confirmed by laboratorial diagnostics was in 1981-1982, in the State of Roraima (Northern Brazil), with the introduction of DENV-1 and DENV-4, probably an extension of the DENV epidemics wave that occurred in Central America and in northern parts of South America [1].

In 1986-1987, DENV-1 caused an outbreak in Rio de Janeiro and then spread to other Brazilian states; in 1990, DENV-2 was also introduced in Rio de Janeiro [1, 7]. During

the 90's the vector *A. aegypti* spread throughout the national territory and led to dissemination of DENV-1 and DENV-2 to 20 of the 27 Brazilian States [7].

The first dengue cases caused by DENV-3 were reported in 2000 in Rio de Janeiro, and in 2001 in Roraima. Subsequently, it was identified in the entire country, except in the Southern states of Santa Catarina (SC) and Rio Grande do Sul (RS) [1].

Since its first introduction in the country in the late 80's, DENV-4 was identified again in Brazil only in 2008, in the city of Manaus, State of Amazonas (Northern Brazil) [8]. In the following years, DENV-4 spread nationwide and started to circulate together with the other serotypes in different regions of the country.

Today, all four serotypes circulate in Brazil, and dengue is a mandatory notifiable disease. Historically, the State of RS has registered dengue circulation since 1996, with imported cases of people coming from other areas [9]. Subsequent autochthonous cases were detected from 2007 to May 2013, with dengue outbreaks caused by DENV-1, DENV-2 and DENV-4 [10-13].

In the current study, we present results from the laboratory surveillance since the first autochthonous case identified in RS in 2007, the seasonality of positive cases, and the successive cases until May 2013. These findings are important to characterize the epidemiological pattern of dengue in RS, contributing for an effective surveillance and control of dengue outbreaks. This is the first report showing a time-series of dengue cases in RS, Brazil.

METHODS

Patients and Samples

This study included human serum samples sent to the Central Laboratory of Public Health (LACEN-RS) for dengue surveillance diagnosis. A total of 9,779 samples were collected between 2007 and 2013 from approximately 8,900 patients with clinically suspected DF. For each patient, the *Dengue Notification Form* – containing information such as demographic characteristics, date of notification, timing of sampling,

symptoms, travel history, results of laboratory tests – was filled out at time of sample collection. However, some data were neglected.

Samples were analyzed using commercially available tests (NS1 and IgM) and in-house IgM antibody capture ELISA (MAC-ELISA) as well as real time reverse transcription-polymerase chain (qRT-PCR) as described below, according to the days of onset of symptoms. Laboratory-confirmed dengue-positive serum samples were used as controls.

NS1 Antigen Detection

All samples collected within five days after onset of symptoms were submitted to analysis using the Platelia Dengue NS1 Ag kit (BIO-RAD Laboratories, France), according to the manufacturer's instructions.

DENV Serotyping by qRT-PCR

Dengue virus serotyping was based on qRT-PCR as described by Johnson *et al.* (2005) [14]. Total viral RNA was extracted from NS1-reagent serum specimens obtained within 5 days of onset of symptoms. In singleplex reaction mixtures, 7 μ L of RNA was combined with 25pmol of each primer and 4.5pmol of the dye-labeled probe in a 25 μ L reaction volume, using the SuperScriptIII Platinum One-Step qRT-PCR System Kit (Invitrogen-Life Technologies, CA). Reaction conditions were 20min at 50°C; 2min at 95°C, 45 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 30s, in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Antibody Tests (IgM)

Samples collected after six days of onset of symptoms were tested using the Dengue IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Panbio-Australia), according to manufacturer's instructions. Results from ELISA were confirmed using MAC-ELISA according to Kuno *et al.* (1987) [15]. The antigens for this test were provided by Evandro Chagas Institute, State of Pará.

Statistical Analyses and Ethics Statement

Descriptive statistics for the study population characteristics and laboratory findings

were performed using SPSS Inc. (Chicago, IL, Version 17.0). χ^2 test was applied for comparisons among proportions (standardized adjusted residuals ≥ 2 was used when the number of the cases observed was greater than the expected) and $p < 0.05$ was considered significant. The study was approved by the Ethics Committee of LACEN-RS and of UFCSPA.

RESULTS

The laboratory surveillance of dengue was established in RS in 2001 at LACEN-RS. In the present study, we analyzed all the suspected dengue cases in RS (9,779 samples) that were diagnosed at LACEN-RS, from 2007 to May 2013.

Figure 1 shows the seasonality of dengue infections, considering the monthly distribution of positive cases along the period (2007-2013). The number of cases starts to increase in January and February, during summer, displaying a peak in March and April. On the other hand, from July to November (winter and spring), the few cases detected are often imported cases.

In 2007, a total of 1,529 dengue suspected cases were notified and 15.6% (238) were positive based on IgM antibody test and viral isolation. The frequency was similar in the age groups analyzed (Table 1), and higher in female than in male (143 and 95, respectively, Figure 2). Serotyping as well as the confirmatory tests was assessed at Adolfo Lutz Institute (IAL), with identification of DENV-3.

During 2008 only imported cases were reported and computed. Of the 917 notifications, 10.6% were dengue positive, with higher prevalence in the age group under 10 years old; the frequency of infection was higher among males (60.8%). There were only imported cases in that year; the few samples had been collected more than five days after the onset of symptoms, thus serotyping was not possible. Nevertheless, one of these samples was serotyped as DENV-1 by qRT-PCR at LACEN-RS in 2011. In 2009, only imported dengue cases were computed as well, with fewer notifications

(297) than 2008. Positivity was 13.5%, the most affected gender was male (77.5%), and no difference among age groups was found. There is no information about serotype circulation in 2009 because collected samples were inappropriate to viral isolation. The travel history of patients that possibly acquired DENV outside the State and then came back to RS is shown in Table 2.

In 2010, a total of 2,345 suspected cases of dengue were reported in RS, among which 41.7% were autochthonous (375/900). This was the year with the highest number of dengue infections (38.4%). Viral isolation confirmed DENV-1 outbreak in Santa Rosa (14.5%) and DENV-2 in Ijuí (39%) and Santo Ângelo (9.4%), cities located in the Northwest region of RS (near the border with the state of Santa Catarina and with Argentina). The most affected age groups were young people aged up to 20 years and above 60 years old. A total of 397 patients reported travel within the RS and other regions.

Since 2011, dengue cases are being monitored by LACEN-RS using MAC-ELISA, NS1 and qRT-PCR to identify dengue serotypes. The proportions of dengue serotypes from 2007 to 2013 were analyzed using the standardized adjusted residuals. The statistically significant associations are shown in Table 3.

DENV-1 was detected in 92.7% of the cases serotyped in 2011. Another outbreak occurred in Santa Rosa with concomitant circulation of DENV-1 (47.8%) and DENV-2 (with low frequency). Moreover, in that year DENV-4 was first detected in RS in three (5.5%) people who arrived from Northern Brazil. The first sample of DENV-4 strain (from Amazonas) was sent to IAL to perform a phylogenetic analysis [12].

In 2012, an outbreak occurred again in Santa Rosa with concomitant circulation of DENV-1 and DENV-4; the latter was the most (56.5%) common serotype in RS. The age group 21-30 years old was the most affected. DENV-2 was not detected in 2012 in RS. On the other hand, DENV-2 circulation was detected again in 2013 in high frequency (56.7%), as well as DENV-4 (35%). A large number of patients (2,238) were investigated in 2013 and 21-30 years old were the most affected group. DENV-1 and

DENV-4 were detected in 13% (49/376) of the dengue cases in Santa Rosa, and DENV-1, DENV-2 or DENV-4 were detected in 50.8% (191/376) of patients from Porto Alegre (capital city of RS, Eastern region).

DISCUSSION

According to official records, dengue virus was introduced in Brazil in the 80's, and since then, all serotypes have been circulating in different regions of the country. In RS, Southern-most State of Brazil, the first imported dengue cases were notified in 1996, and the first autochthonous cases were confirmed in 2007 in cities located in Northwestern RS (Giruá, Horizontina, Tucurundi, Três de Maio) and Northern RS (Erechim) [16]. Accordingly, autochthonous dengue transmission, secondary to imported cases, has been well documented in other geographical regions where *Aedes* spp. are present [4].

Based on this, dengue was probably introduced in the State by people coming from other regions. Considering that *Aedes aegypti* mosquitoes circulate in RS, the virus soon found its host vector, getting installed in the region.

Most epidemiological studies do not show significant differences in the prevalence of dengue between genders. Accordingly, in the years that RS registered autochthonous cases, difference between male and female was observed only in 2007, when the prevalence was more frequent in females (60%); on the other hand, in 2008 and 2009, when all cases were imported, dengue was more frequent in males (60.8% and 77.5%, respectively). Further more, in 2008 the greatest number of positive cases (64/97) was found in adults (21-50 years old), although the most prevalent significant age group was children (n=7, using standardized adjusted residuals). These findings suggest that dengue infections in that year in RS might have been associated with business travel, which usually involves adult men.

A study involving patients with dengue in Pakistan (2013) reported that DF and DHF were more frequent in men (70% and 74%, respectively), while DSS was more

frequent in women (64%) [17]. In our study, the severity of the disease and clinical symptoms were not informed, therefore it is not possible to make such a correlation. Notably, none of the cases analyzed had the outcome of death.

In the majority of other Brazilian States, DENV-3 was prevalent from 2002 to 2006, being displaced by DENV-2 from 2007 to 2009 [18]. This pattern was not observed in RS, as DENV-3 was identified in samples from 2007, then only imported cases occurred in 2008 and 2009 in the State. In 2010, DENV-2 was the most common serotype in RS, while in Brazil there was a higher rate of DENV-1 [10].

Between 2011 and 2013, the dynamics of circulating dengue serotypes were similar in RS and in the rest of the country (Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde MS/SVS, unpublished data). In 2011 and 2012, DENV-2 was gradually displaced by DENV-4; notably, while DENV-4 was identified in only 5.5% of the cases in 2011, in 2013 it accounted for 35% of the cases, spreading through eight cities in RS. Regarding DENV-2, after a low circulation in 2011 and a silent circulation in 2012, this serotype reemerged in 2013 in 56.7% of the cases. Inversely, DENV-1 decreased from 92.7% in 2011 to 8.3% in 2013 in RS.

Phylogenetic analysis of the first autochthonous cases of DENV-4 infection in RS and in the State of São Paulo showed that the 2011 DENV-4 strains are closely related to strains that have been circulating since 1981, when DENV-4 was first introduced in South America, suggesting that the virus has gone through recent evolution for at least 4 to 6 years [13]. DENV-4 may have penetrated the Brazilian population earlier than 2010, causing milder disease; therefore, and also due to a higher prevalence of DENV-1 and DENV-2, the virus could have been present but not detected. The reemergence of DENV-4 is evidences that the replacement of a dominant circulating genotype is associated with the rising of a previously rare lineage [13].

The highest number of notifications and many autochthonous cases occurred in 2010, the year with the highest number of positive dengue infections (38.4%), compared to other years when the frequency did not exceed 17.5%. In 2011, 276 infections

occurred and 18% were in Porto Alegre. Even though there were fewer notifications in 2012, dengue infections increased by 23.5% in Porto Alegre. Thereafter, the number of cities with autochthonous dengue cases increased, from 5 cities in 2007 to 53 in 2013. In all years analyzed, seasonality of dengue followed a pattern similar to what is observed in other Brazilian states, with a rise in dengue infections occurring during summer, being preceded by an increase in rainfall during spring (Figure 1) (data from the National Institute of Space Research), which favors the mosquito's reproduction and dissemination [19]. Other factors are associated with an increase in dengue cases, such as population growth; global warming; lack in sewer and waste management; increase in travel of people; and deterioration of infrastructure and/or unpreparedness of public health systems to control infectious diseases, specially those transmitted by arthropods [4].

Even though the number of dengue cases in RS increased in the last years, it was proportionally lower than in other regions of Brazil [20]. This condition may be associated with the climate of the region, with rigorous winters that are not suitable for mosquito reproduction, different from the rest of Brazil where temperatures are high year-around [3].

Control of DENV spread relies primarily on reduction of vector populations, which is usually done by elimination of still water sources and use of insecticides. Despite the effort of the State Program for Surveillance of *A. aegypti*, detection of the vector increased in RS, confirming the persistence of infested cities and the emergence of new occurrences. In 2007 there were 52 cities infested with *A. aegypti*, while in May 2013 this number has risen to 116 (496 cities), putting RS in a status of endemic region [21].

There are no effective antiviral drugs to treat DF, neither vaccine to prevent infection. Therefore, further studies about the molecular characteristics of the virus are important in order to better understand its replication cycle and its biology, thus contributing for the development of effective drugs to be used in the prevention and treatment of

dengue.

Molecular studies are also fundamental to understand viral evolution, viral dynamics and its interaction with hosts, and to predict the severity of the disease. DENV phylogenetics and phylodynamics in RS should be taken into account in future studies. These analyses will contribute for the surveillance of DENV, as well as prediction of locations and times with greatest potential [22], especially considering that new serotypes are emerging, such as DENV-5 [23], which sooner or later might be introduced in RS.

Finally, considering that dengue was recently introduced in RS, the control of further outbreaks requires a network composed of well-trained and skilled health professionals, entomologists, environment surveillance agents, laboratory technicians and molecular biologists, as well as social education and governmental support.

Acknowledgments

We thank the Graduate Program in Pathology of UFCSPA, LACEN-RS, Secretary of Health and the Environmental Surveillance of the Secretary of Health for support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GLT, TSG, BPD, ZMAM. Performed the experiments: GLT, TSG, BPD, BCC. Analyzed the data: GLT, TSG, ABGV. Contributed reagents/materials/analysis tools: GLT, TSG, BPD, BCC, ZMAN, ABGV. Wrote the paper: GLT, TSG, ABGV. Provided critical comment on the manuscript: ABGV, TSG, BPD, BCC, ZMAM.

REFERENCES

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª edição, Brasília. 2009.
2. World Health Organization. (2013) Dengue and severe dengue. Fact sheet

number 117. Geneva: World Health Organization. Available at URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>.

3. World Health Organization. (2009) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization.
4. Gubler DJ (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-96.
5. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM (1988) A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 38: 172-80.
6. Vezza AC, Rosen L, Repik P, Dalrymple J, Bishop DHL (1980) Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 29: 643-52.
7. Siqueira JB Jr, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL (2005) Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 48-53.
8. Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos SM, Melo MN, Viana SS, Mourão MPG, *et al.* (2008) Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14: 667-9.
9. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde MS/SVS. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2012 (2012). Available at URL:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_classica_2012_at032013.pdf
10. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde MS/SVS. Ministério da Saúde. Relatório de Situação Rio Grande do Sul (2010). Available at URL:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/13_rio_grande_do_sul_final.pdf.
11. Secretaria Estadual de Saúde SES. Situação Epidemiológica da Dengue no Rio Grande do Sul – 2012 (2012). Available at URL:
http://www.saude.rs.gov.br/upload/1358526617_Casos%20confirmados%20de%20Dengue%20no%20RS,2012%20%20revisado%20Marilina-1.pdf.
12. Secretaria Estadual de Saúde SES. Situação Epidemiológica da Dengue no Rio Grande do Sul – 2013 (2013). Available at URL:

http://www.saude.rs.gov.br/upload/1368552308_Dados%20pagina%20dengue%2014.5.pdf.

13. de Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, *et al.* (2011) Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1439.

14. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS (2005) Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *J. Clin. Microbiol* 43: 4977-83.

15. Kuno G, Gómez I, Gubler DJ (1997) Detecting artificial anti-dengue Ig M immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 36:153-9.

16. Secretaria Estadual de Saúde SES. Plano de Contingência para Dengue no Estado do Rio Grande do Sul (2008). Available at URL:
<http://www1.saude.rs.gov.br/dados/1298557617151Plano%20Estadual%20de%20Contigencia%20Dengue%20RS.pdf>

17. Khan MI, Anwar E, Agha A, Hassnien NS, Ullah E, Syed IA, *et al.* (2013) Factors predicting severe dengue in patients with dengue fever. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 5:e2013014.

18. Nogueira RM, de Araujo JM, Scharzmayr HG (2007) Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Pub* 22: 358-63.

19. Teixeira MG, Siqueira JB Jr, Ferreira GLC, Bricks L, Joint G (2013) Epidemiological Trends of Dengue Diseases in Brazil (2000-2010): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 7(12): e2520.

20. Organização Pan-Americana da Saúde OPAS. Dados de dengue no Brasil, 2013 (2013). Available at URL:
http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3159&Itemid=1.

21. Secretaria Estadual de Saúde SES. Boletim Informativo do Programa Estadual de

Vigilância do *Aedes aegypti* (PEVAa) (2013) Available at URL:

http://www.saude.rs.gov.br/lista/567/Vigil%C3%A2ncia_Ambiental_%3E_Boletim_dengue.

22. Weaver SC, Vasilakis N (2009) Molecular evolution of dengue viruses:

Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 9: 523-40.

23. Normile D First new dengue virus type in 50 years. Bangkok: Science Insider

(2013). Available at URL: <http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>.

Table 1: Dengue cases in the State of Rio Grande do Sul according to age (2007-2013).

Year	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	total
Age(years)	n(%) ^a	n(%) ^a	n(%) ^a	n(%) ^a	n(%) ^a	n(%) ^a	n(%) ^a	n
<1-10	8(3.4)	7(7.2) ^b	1(2.5)	39(4.3) ^b	4(1.4)	1(0.8)	10(2.7)	70
11-20	0	6(6.2)	3(7.5)	118(13.1) ^b	30(10.9)	10(8.4)	50(13.3)	217
21-30	36(15.1)	22(22.7)	7(17.5)	126(14)	51(18.5)	35(29.4) ^b	80(21.3) ^b	357
31-40	40(16.8)	21(21.6)	11(27.5)	141(15.7)	58(21)	17(14.3)	78(20.7)	366
41-50	51(21.4)	21(21.6)	6(15)	175(19.4)	57(20.7)	23(19.3)	69(18.4)	402
51-60	35(14.7)	7(7.2)	7(17.5)	110(12.2)	43(15.6)	18(15.1)	58(15.4)	278
>60	21(8.8)	6(6.2)	0	138(15.3) ^b	31(11.2)	15(12.6)	31(8.2)	242
N.I. ^c	47(19.7)	7(7.2)	5(12.5)	53(5.9)	2(0.7)	0	0	114
total	238	97	40	900	276	119	376	2,046

^aNumber of positive cases and percentages are ratio among positive cases by total samples tested by year.

^bStandardized adjusted residuals ≥ 2 according to data of test $\chi^2=294.49$ $p<0.001$.

^cN.I.: not informed

Table 2. Travel history of imported dengue cases in 2008 and 2009.

Country or region of origin	2008		2009	
	dengue cases	serotypes	dengue cases	serotypes
Brazil Northern Region	14	DENV-1,2,3	4	DENV-1,2
Brazil Northeast Region	15	DENV-1,2,3	4	DENV-1,2,3
Brazil Southeast Region	40	DENV-1,2,3	5	DENV-1,2,3
Brazil Midwest Region	14	DENV-1,2,3	15	DENV-1,2,3
Bolivia	1	N.I.	2	N.I.
El Salvador	0	–	1	N.I.

N.I.: not identified.

Table 3: Dengue cases in the State of Rio Grande do Sul according to serotypes (2007-2013).

Year	Serotypes (%) ^a			
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
2007	–	–	2(100) ^b	–
2008	1(100)	–	–	–
2009	–	–	–	–
2010	4(15.4)	22(84.6) ^b	–	–
2011	51 (92.7) ^b	1 (1.8)	–	3 (5.5)
2012	10 (43.5)	–	–	13 (56.5) ^b
2013	8 (8.3)	55 (56.7) ^b	–	34 (35) ^b

^a Percentages are ratio among dengue serotypes by positive samples.

^b Standardized adjusted residuals ≥ 2 according to data of test $\chi^2=358.2$ $p<0.001$.

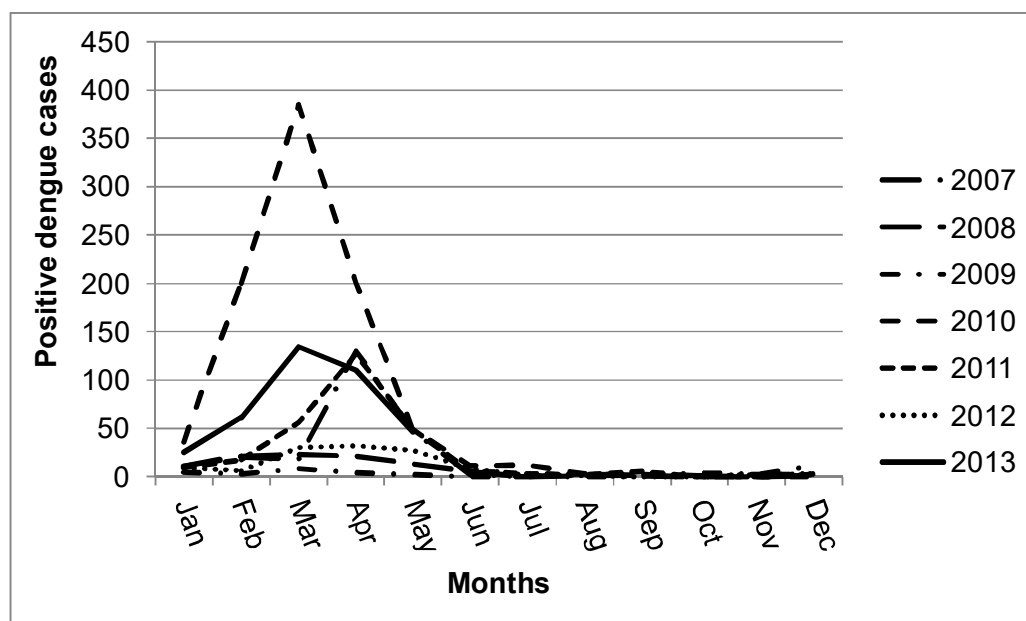
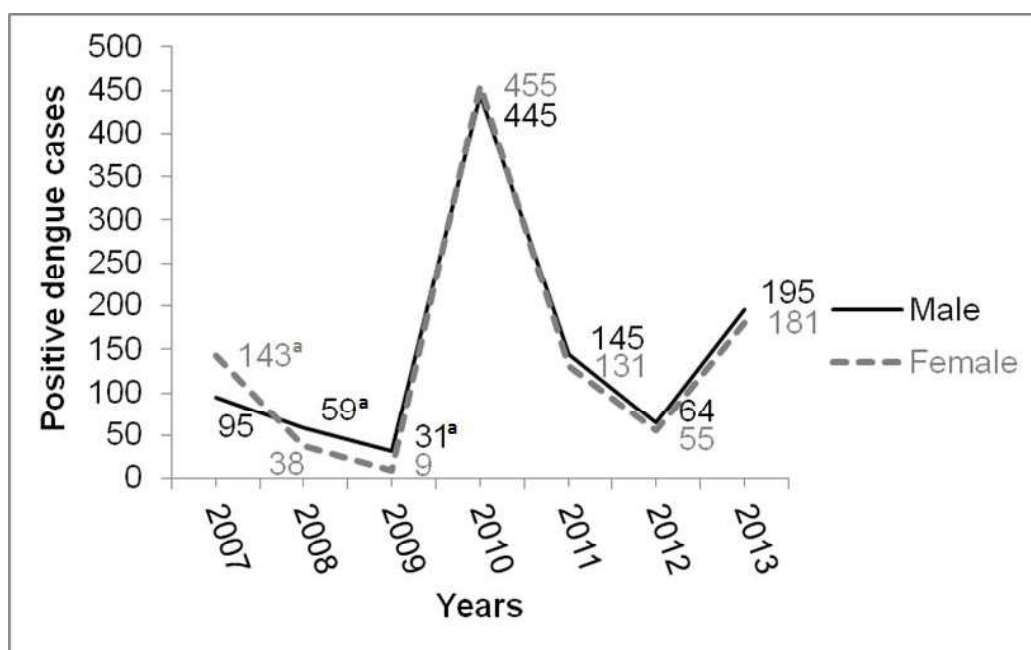


Figure 1. Seasonality of positive dengue cases in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, according to months (2007-2013).



^a Standardized adjusted residuals ≥ 2 according to data of test $\chi^2=28.12$ $p<0.001$.

Figure 2. Frequency distribution of positive dengue cases in the State of Rio Grande do Sul according to gender (2007-2013).

4. Considerações finais

Este trabalho descreve o perfil epidemiológico da dengue no Estado do Rio Grande do Sul, sendo o primeiro estudo científico apresentando dados concretos, contribuindo significativamente para o conhecimento e controle da doença no Estado¹.

Os resultados obtidos atingiram os objetivos propostos para este estudo. As principais conclusões do estudo foram:

- Os primeiros casos autóctones de dengue no RS ocorreram em 2007, em cidades localizadas no norte e noroeste do RS.

- Nos anos de 2008 e 2009 foram reportados apenas casos importados, diferente dos outros anos estudados.

- O ano com maior prevalência de dengue foi 2010 (38,4% dos casos notificados), enquanto que nos outros anos esse número não excedeu 17,5% dos casos notificados.

- O número de cidades com casos de dengue autóctones passou de cinco em 2007 para 53 em 2013.

- Houve diferença na prevalência entre homens e mulheres em 2007, 2008 e 2009: enquanto a prevalência foi maior em mulheres em 2007 (60%), em 2008 e 2009 mais homens foram infectados (60,8% e 77,5% respectivamente).

¹ O presente estudo foi aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA (Parecer N° 332.274/13; **anexo 5.2.**) e da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) (Parecer N° 371.278/13, **anexo 5.3.**).

- O primeiro sorotipo de dengue introduzido no RS foi o DENV-3 em 2007; a partir de 2010, os sorotipos DENV-2, DENV-1 e DENV-4 passaram a ser introduzidos, a cada ano, no Estado, e desde 2007 o DENV-3 não foi mais identificado.

- Nos anos analisados nenhuma morte por dengue foi notificada.

Uma contribuição adicional do trabalho foi poder observar a sazonalidade dos casos de dengue e se constatar que a sazonalidade da dengue no RS compreendeu o período de verão, precedido por um aumento da chuva na primavera (dado disponível no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais).

Estudos adicionais são importantes e necessários para compreender o comportamento da dengue no RS. Análises do perfil clínico dos pacientes com dengue podem contribuir para o tratamento e manejo de casos futuros da doença, além de estudo moleculares do vírus da dengue para entender a evolução viral, a dinâmica viral e a interação com o hospedeiro.

O controle do vetor e uma maior conscientização da população quanto à doença, ao mosquito, à forma de transmissão e às medidas de controle do agente transmissor são algum dos desafios do Estado para conter a doença, já que ainda não há nenhuma droga antiviral efetiva para o tratamento, nem vacina para prevenir a infecção.

Por fim, à medida que o número de casos de doenças infecciosas emergentes e reemergentes vêm aumentando e que novas técnicas moleculares vêm sendo desenvolvidas, faz-se necessária uma abordagem multi- e transdisciplinar para o estudo dessas doenças, a fim de buscar medidas de prevenção, tratamento e controle das mesmas. Assim, estudos de

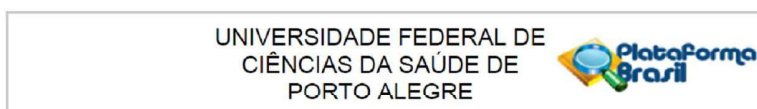
epidemiologia molecular combinando dados epidemiológicos com análise das bases moleculares dessas doenças – genoma e filogenia dos agentes patogênicos, interação patógeno-hospedeiro, características genéticas do hospedeiro, dentre outros aspectos – contribuem para a correta identificação do patógeno, para a tomada de uma conduta adequada no tratamento do paciente e para o entendimento de como o patógeno se adapta e se instala no hospedeiro levando à infecção, além de ser fundamental para o diagnóstico, o controle e o tratamento das mesmas.

5. Anexos

5.1. Atividades Acadêmicas

- Publicação do artigo intitulado “Dengue Virus Type 4 Phylogenetics in Brazil 2011: Looking Beyond the Veil” na revista: PLOS Neglected Tropical Diseases. (de Souza et al. PLOS Neg Trop Dis 5: e1439, 2011).
- Publicação do artigo intitulado “Oseltamivir-resistant influenza A9H1N1)pdm09 virus in southern Brazil” na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. (Marx et al. Mem Inst Oswaldo Cruz 108: 392-94, 2013).
- Publicação do artigo intitulado “Epidemiological Profile of Influenza Cases in Southern Brazil in the Post-Pandemic Period” na revista Journal of Antivirals & Antiretrovirals (Baccin et al. J Antivir Antiretrovir 5: 145-150, 2013).
- Docente no curso “Vigilância Entomológica da Febre Amarela e Outras Arborivoses e Atualização em Técnicas de Coleta de Mosquitos (Diptera, Culicidae) no Rio Grande do Sul”, apresentando o tema “Técnicas para Diagnóstico Laboratorial de Arbovírus”, em 2011.
- Apresentação dos resultados finais do projeto intitulado “Prevalência de Metapneumovírus Humano em Amostras Sazonais e Pandêmicas de Pacientes com Síndrome Gripal e/ou Síndrome Respiratória Aguda Grave Encaminhadas ao LACEN-RS/FEPPS em 2009”, na FEPPS em 2012.
- Participação no Seminário Estadual de Influenza promovido pelo CEVS em 2013.
- Participação no “Treinamento Fundamentos da PCR Qualitativa em Tempo Real (qPCR): uma abordagem teórico prática, oferecido pela Life Technologies Brasil Comércio e Indústria de Produtos para Biotecnologia Ltda”, em 2013.
- Participação no evento de extensão “IX Jornada do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA: “Câncer – Perspectivas em Pesquisa e Aplicações Clínicas” e II Jornada do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA” e apresentação do Pôster Virtual do Trabalho intitulado “Avaliação Epidemiológica do Vírus da Dengue em Humanos no RS”, na UFCSPA em 2013.

5.2. Parecer do Consubstanciado do CEP da Instituição Proponente



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação Epidemiológica do Vírus da Dengue em Humanos no Rio Grande do Sul

Pesquisador: Ana Beatriz Gorini da Veiga

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17710913.4.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 332.274

Data da Relatoria: 11/07/2013

Apresentação do Projeto:

A dengue é uma doença infecciosa viral, que tem como principal hospedeiro o homem, e como principal vetor de transmissão o mosquito do gênero *Aedes*. No Brasil, este presente em todos os estados, com relatos de 1981 com a introdução de um sorotipo viral até os dias de hoje, onde ocorre circulação dos quatro sorotipos. O Estado do Rio Grande do Sul (RS) vem apresentando crescente número de casos de dengue em humanos nos últimos anos, com início em 2007. O presente projeto tem por objetivo conhecer a circulação do vírus da dengue nas diferentes regiões do RS e identificar os diferentes subtipos virais por meio de um ensaio molecular baseado em transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e Reação Imunoenzimática de Captura de IgM (MAC-ELISA) para o diagnóstico da dengue em humanos. Amostras de sangue de humanos com suspeita de dengue no RS obtidas entre 2007 e 2013 serão submetidas à extração de RNA, à qRT-PCR para detecção do vírus da dengue e ao MAC-ELISA. Os resultados serão analisados a fim de se traçar um perfil da circulação da dengue no Estado do Rio Grande do Sul.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O principal objetivo deste projeto é apresentar os dados epidemiológicos de dengue no Rio Grande do Sul, no período preestabelecido (de 2007 a maio de 2013), a partir dos

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245
Bairro: CEP: 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 332.274

resultados obtidos pelo método molecular baseado na técnica de transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e por MAC-ELISA, técnica padrão para detecção de imunoglobulina IgM. Objetivo Secundário: 1) Verificar a prevalência de dengue em amostras de soro encaminhadas ao IPB-LACEN/RS de pacientes sob suspeita de dengue por qRT-PCR e MAC-ELISA;2) Identificar os subtipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 por qRT-PCR, circulantes no RS;3) Correlacionar a prevalência dos casos confirmados no IPB-LACE/RS com o Índice de Infestação Predial do mosquito *A. aegypti* (dados do Levantamento Rápido de Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAA) programa do Ministério da Saúde);4) Caracterizar o perfil epidemiológico do período de 2007-2013 utilizando dados das fichas dos pacientes com suspeita de dengue no Estado do RS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos. Benefícios: Melhor monitoramento da dengue no RS e conhecimento do perfil epidemiológico da doença no Estado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está associada a um projeto maior, o qual conta com financiamento e já foi aprovado pelo CEP. Serão utilizados recursos dos locais de realização da pesquisa, os quais manifestam sua anuência. Os custos serão pagos pelo projeto maior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão contemplados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o Parecer do relator.

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245
Bairro: CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (513)303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 332.274

PORTO ALEGRE, 12 de Julho de 2013

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245
Bairro: CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (513)303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

5.3. Parecer Consubstanciado do CEP da Instituição Coparticipante

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE
PRODUÇÃO E PESQUISA EM
SAÚDE/ FEPPS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação Epidemiológica do Vírus da Dengue em Humanos no Rio Grande do Sul

Pesquisador: Ana Beatriz Gorini da Veiga

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17710913.4.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 371.278

Data da Relatoria: 12/08/2013

Apresentação do Projeto:

Os autores apresentam um projeto com o objetivo de fazer uma Avaliação Epidemiológica do Vírus da Dengue em Humanos no Rio Grande do Sul.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

- O principal objetivo deste projeto é apresentar os dados epidemiológicos de dengue no Rio Grande do Sul, no período preestabelecido (de 2007 a maio de 2013), a partir dos resultados obtidos pelo método molecular baseado na técnica de transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e por MAC-ELISA, técnica padrão para detecção de imunoglobulina IgM.

Objetivos Específicos

- 1) Verificar a prevalência de dengue em amostras de soro encaminhadas ao IPB-LACEN/RS de pacientes sob suspeita de dengue por qRT-PCR e MAC-ELISA;
- 2) Identificar os subtipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 por qRT-PCR, circulantes no RS;
- 3) Correlacionar a prevalência dos casos confirmados no IPB-LACE/RS com o Índice de Infestação Predial do mosquito *A. aegypti* (dados do Levantamento Rápido de Índice de Infestação por *Aedes*

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400
Bairro: Jardim Botânico **CEP:** 90.610-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3288-4090 **Fax:** (51)3288-4069 **E-mail:** cep_fepps@fepps.rs.gov.br

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE
PRODUÇÃO E PESQUISA EM
SAÚDE/ FEPPS



Continuação do Parecer: 371.278

aegypti (LIRAA) programa do Ministério da Saúde);

4) Caracterizar o perfil epidemiológico do período de 2007-2013 utilizando dados das fichas dos pacientes com suspeita de dengue no Estado do RS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não há riscos, Benefícios: Conhecer o perfil epidemiológico da dengue no Rio Grande do Sul.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto tem como objetivo conhecer a circulação do vírus da dengue nas diferentes regiões do RS e identificar os diferentes subtipos virais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 26 de Agosto de 2013

Assinador por:

Ivete Terezinha Machado da Rocha
(Coordenador)

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400
Bairro: Jardim Botânico CEP: 90.610-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3288-4090 Fax: (51)3288-4069 E-mail: cap_fepps@fepps.rs.gov.br

5.4. Abstract aceito em 12 de Fevereiro de 2014 pelo editor Peter Hotez da Revista “PLoS Neglected Tropical Diseases” na forma de pre-submission inquiry



Gabriela Tumieto <gatumioto@gmail.com>

Fwd: Your presubmission inquiry

Ana B. Gorini da Veiga <anabgv@ufcspa.edu.br>
Para: Gabriela Tumieto <gatumioto@gmail.com>

13 de fevereiro de 2014 09:32

Dr^a Ana B. Gorini da Veiga
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA
Depto. Ciências Básicas da Saúde - Lab. Biologia Molecular
Núcleo de Inovação Tecnológica em Saúde - NIT-Saúde
R. Sarmiento Leite, 245
CEP 90050-170 Porto Alegre-RS
Tel. +55 51 3303-8763
E-mail: anabgv@ufcspa.edu.br
anabgv76@gmail.com
Skype: anabgv

----- Original Message -----

Subject: Your presubmission inquiry**Date:** 12 Feb 2014 18:19:58 -0500**From:** PLOS Neglected Tropical Diseases <plosntds@plos.org>**To:** Ana Beatriz Gorini da Veiga <anabgv@ufcspa.edu.br>

Dear Dr Gorini da Veiga

Thank you very much for your presubmission inquiry to PLoS Neglected Tropical Diseases.

We are interested in your work, "LABORATORY SURVEILLANCE OF DENGUE IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL, FROM 2007 TO 2013," and its relevance to neglected tropical diseases. The Editorial Board would like to invite you to submit your manuscript for full consideration at:
<http://www.editorialmanager.com/pntd>

This decision reflects the Board's interest in the study you have described. However, please understand that the editorial decision to send a paper out for peer-review can only be made after we have the opportunity to evaluate the full-length manuscript.

When you do submit, please include mention of this presubmission inquiry and the manuscript number (PNTD-D-14-00253) in the "Previous Interactions" section of the submission form.

We look forward to receiving your paper.

Sincerely,

Peter Hotez
Editor-in-Chief

LABORATORY SURVEILLANCE OF DENGUE IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL, FROM 2007 TO 2013

ABSTRACT

Background: According to official records, dengue was introduced in Brazil in the 80's; since then several epidemics have occurred. Meanwhile, in the State of Rio Grande do Sul (RS), the first autochthonous case occurred only in 2007; nevertheless, the number of dengue cases has increased in RS. This is the first report showing a time-series of dengue cases in RS, Southern Brazil.

Objectives and Methods: In this study we report laboratory surveillance of dengue cases, the seasonality of positive cases, describe serotypes and characterize the epidemiological pattern of dengue in RS from 2007 to 2013. A total of 9,799 serum samples from patients with suspected dengue fever were collected and submitted to serological test and/or dengue virus identification based on NS1 antigen and IgM antibody capture by MAC-ELISA. DENV serotype was determined by qRT-PCR. Demographic data were analyzed.

Results: The first autochthonous dengue case in RS occurred in 2007 and the serotype was identified as DENV-3. While in 2008 and 2009 only imported cases were registered, autochthonous infection waves have been occurring since 2010. The highest number of dengue infections (38.4% of the reported cases) occurred in 2010, with DENV-1 and DENV-2 outbreaks in three cities of northwestern RS. In 2011, another DENV-1 and DENV-2 outbreak occurred in the northwest of RS, with DENV-1 being detected in most serotyped cases; moreover, DENV-4 was detected in travelers. In 2012, DENV-1 and

DENV-4 co-circulated in RS. DENV-2 circulation was only detected again in 2013, in high frequency (56.7%), as well as DENV-4 (35%). Most infections occur in adults during summer (January and February) and the few imported cases are often detected in winter and spring. Differences in prevalence between genders were only observed in 2008 and 2009 (imported cases), being higher in males. None of the cases had the outcome of death.

Conclusions: The number of dengue cases in RS has increased since its introduction in 2007, with outbreak waves occurring throughout the State; circulating serotypes are DENV-1, DENV-2 and DENV-4. Such an increase might be a consequence of introduction of new serotypes, spread of *Aedes aegypti*, and difficulty of programs to eradicate the vector. Furthermore, considering that most of the imported cases were male travelers, business travel might also be associated with DENV introduction in RS. On the other hand, the increase in dengue cases in RS was proportionally lower than in other regions of Brazil, probably due to the climate of the region, with rigorous winters that are not suitable for mosquito reproduction, while in the rest of Brazil temperatures are high year-around. Further studies including clinical profile of patients will help in understanding dengue epidemics, in improving health surveillance and in controlling the disease.