

Viviane de Fátima Benedetti

**Caracterização genética do vírus da dengue (DENV)  
circulante nas regiões da Bahia 2021**

**Versão original**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

**São Paulo**

**2022**

Viviane de Fátima Benedetti

**Caracterização genética do vírus da dengue (DENV)  
circulante nas regiões da Bahia 2021**

**Versão original**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção de título de Mestre em  
Ciências.

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais  
e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de  
Andrade Zanotto

**São Paulo**

**2022**

BENEDETTI, Viviane de Fátima. *Caracterização genética do vírus da dengue (DENV) circulante nas regiões da Bahia 2021*. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical; 2022.

Aprovado em

Banca Examinadora

Prof Dr (a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof Dr (a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof Dr (a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Benedetti, Viviane de Fátima

Caracterização genética do vírus da dengue (DENV)  
circulante nas regiões da Bahia 2021 / Viviane de  
Fátima Benedetti. -- São Paulo, 2022.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Medicina Tropical. Área de  
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.  
Orientador: Paolo Marinho de Andrade Zanotto.

Descritores: 1.Saúde pública 2.Vírus 3.Flavivirus  
4.Alphavirus 5.Epidemias 6.Genética

USP/FM/DBD-205/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## RESUMO

BENEDETTI, Viviane de Fátima. *Caracterização genética do vírus da dengue (DENV) circulante nas regiões da Bahia 2021*. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical; 2022.

Dentre os arbovírus de maior relevância para infecção em humanos destacam-se aqueles pertencentes às famílias Flaviviridae e Alphaviridae. O DENV dentre o gênero *Flavivirus* é um dos principais vírus em termos de morbidade, mortalidade e impacto econômico em diferentes áreas do mundo. O DENV foi reintroduzido no Brasil na década de 80, e desde então, introduções contínuas são documentadas e são responsáveis pelo aumento do número de casos a cada surto. O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus que se destaca no gênero dos *Alphavirus*, causando diversos surtos em vários países nas Américas. O vírus foi introduzido no Brasil em 2014 e, desde então, vários estados brasileiros notificam surtos de grande importância. O objetivo principal deste trabalho é desenvolver a caracterização genética associada a infecções causadas pelo DENV no estado da Bahia. Assim como as distribuições de distintos isolados virais, considerando a co-circulação de diferentes arbovírus nas epidemias. A epidemia causada pela presença concomitante de distintos vírus representa um grave problema de saúde pública para o Brasil. As amostras isoladas neste trabalho, inicialmente diagnosticadas para DENV, apresentaram positividade para DENV, ZIKV e CHIK. A proximidade entre os países, estados e cidades proporciona um aumento das infecções, impedindo um melhor entendimento do fluxo de pessoas infectadas e dos mosquitos, intensificando o desafio no combate aos surtos.

Palavras- Chave: Saúde Pública. Vírus. *Flavivirus*. *Alphavirus*. Epidemias. Genética.

## ABSTRAT

BENEDETTI, Viviane de Fatima. *Genetic characterization of the dengue virus (DENV) circulating in the regions of Bahia 2021*. [dissertation] São Paulo: University of São Paulo, Institute of Tropical Medicine; 2022.

Among the most relevant arboviruses that infects humans, those belonging to the family Flaviviridae and Alphaviridae are highlighted. DENV among the genus *Flavivirus* is one of the main viruses in terms of morbidity, mortality and economic impact in different areas of the world. DENV was reintroduced in Brazil in the 1980s, and since then, continuous introductions have been documented and are responsible for the increase in the number of cases with each outbreak. The Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus that stands out in the *Alphavirus* genus, causing several outbreaks in several countries in the Americas. The virus was introduced in Brazil in 2014 and, since then, several Brazilian states have reported major outbreaks. The main objective of this work is to develop the genetic characterization associated with infections caused by DENV in the state of Bahia. As well as the distributions of different viral isolates, considering the co-circulation of different arboviruses in epidemics. The epidemics caused by the concomitant presence of different viruses represents a serious public health problem for Brazil. The samples isolated in this work, initially diagnosed for DENV, were positive for DENV, ZIKV and CHIK. The proximity between countries, states and cities provides an increase in infections, preventing a better understanding of the flow of infected people and mosquitoes, intensifying the challenge in combating outbreaks.

Keywords: Public Health. Virus. *Flavivirus*. *Alphavirus*. Epidemics. genetics.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
1.1 Características gerais do vírus - DENV .....	9
1.1.1 Ciclo Replicativo e Ciclo de transmissão - DENV .....	12
1.1.1.1 Vírus Dengue no Brasil .....	14
1.2 Características gerais do vírus – CHIKV .....	17
1.2.1 Ciclo replicativo e ciclo de transmissão - CHIKV .....	17
1.2.2 Vírus CHIKV no Brasil .....	18
2. OBJETIVOS .....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
3.1 Material de estudo .....	20
3.1.1 Diagnóstico Molecular .....	21
3.1.1.1 Sequenciamento .....	23
4. RESULTADOS .....	29
4.1 Sequenciamento do gene da proteína E – DENV .....	32
4.1.1 Sequenciamento do gene da região E1 – CHIKV .....	33
5. DISCUSSÃO .....	34
6. CONCLUSÕES .....	35
7. REFERÊNCIAS .....	37

## 1. INTRODUÇÃO

As arboviroses constituem um grupo de doenças causadas pelos arbovírus (arthropod-borne viruses), cuja denominação se refere à transmissão por vetores artrópodes hematófagos do gênero *Aedes*, e o ciclo replicativo que se desenvolvem parcialmente nesses insetos. O ciclo de transmissão se mantém entre os hospedeiros invertebrados, em geral mosquitos e carrapatos, e hospedeiros vertebrados funcionam como amplificadores ou reservatórios na natureza, usualmente pássaros, roedores e primatas não humanos (1,2).

A infecção em humanos usualmente ocorre através de eventos de “spill over” envolvendo a introdução humana em ambiente silvestre e mudanças ambientais, como por exemplo, a urbanização rápida e sem planejamento no desenvolvimento de comunidades, etc. Emergência viral associada a degradação antrópica ocorre em circunstâncias apropriadas, como desequilíbrio ecológico, a alta densidade populacional e taxas de contato entre humanos e mosquito, para a reprodução de vetores (3,4). Ademais, fatores ambientais e sociais influenciam a introdução e fixação do vírus em função de diversos condicionantes, como: (i) degradação antrópica em regiões urbanizadas, como citado acima; (ii) alterações climáticas em localidades degradadas e densamente hiper populadas; (iii) gestão inadequada de recursos hídricos, lixo e de florestamento; (iv) Saneamento básico deficiente, dentre outros. Estes condicionantes contribuem para proliferação, desenvolvimento e, portanto o aumento dos níveis de infestação de vetores antropofílicos, responsáveis por transmitir arboviroses (5).

O ciclo urbano envolve hospedeiros pertencentes ao gênero *Aedes* principalmente o *A. aegypti* e o *A. albopictus*, com maior tendência de circular entre áreas silvestres degradadas pela ação humana, servindo de ligação entre os ambientes distintos (6).

Em geral, infecções por arbovírus são assintomáticas ou causam uma doença febril sistêmica, incluindo sintomas como mialgias, artralgia e sinais como exantemas, erupção cutânea, etc. (7). O fato de se observar apresentações clínicas semelhantes e a possibilidade de ocorrência



concomitante de infecções por diferentes arbovírus em um mesmo local constituem obstáculos ao diagnóstico diferencial apropriado durante epidemias. Alguns arbovírus podem circular silenciosamente, confundidos com os agentes mais frequentes da região (8), no caso DENV, ZIKV e CHIKV no Brasil. O diagnóstico laboratorial se faz, portanto, necessário para a determinação exata do agente etiológico (9,10).

Dentre os arbovírus de maior relevância para infecção em humanos destacam-se aqueles pertencentes aos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*. O DENV dentre os *Flavivirus* é um dos principais vírus em termos de morbidade, mortalidade e impacto econômico em diferentes áreas do mundo. O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus que se destaca no gênero dos *Alphavirus*, causando diversos surtos em vários países principalmente em países do Sudeste Asiático e da América Latina (11).

No Brasil, as arboviroses urbanas fazem parte de um cenário epidemiológico complexo, com a circulação simultânea dos quatro sorotipos dos vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), do vírus Chikungunya (CHIKV) e do vírus Zika (ZIKV). A tríplice epidemia causada pela presença concomitante dos vírus representa um grave problema de saúde pública para o Brasil, dado as condições ideais para a dispersão destes patógenos devido às suas dimensões continentais e intensas interconexões regionais. Além disso, a circulação simultânea destes três arbovírus compromete a eficiência do diagnóstico e as notificações virais. A proximidade das cidades contribui para o aumento das infecções impedindo um melhor entendimento do fluxo contínuo de pessoas infectadas e mosquitos, intensificando o desafio no combate aos surtos (3,4,12).

### **1.1 Características gerais do vírus - DENV**

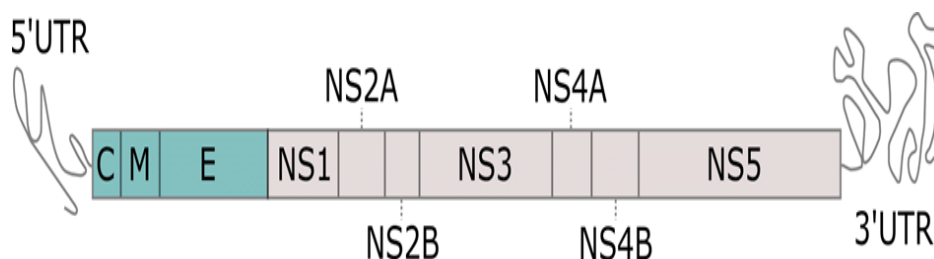
Os vírus da Dengue (DENV) são patógenos transmitidos por artrópodes responsáveis por doenças infecciosas emergentes e reemergentes no mundo todo. Representam um grande problema de Saúde Pública, causando grandes impactos econômicos. A dengue é atualmente a arbovirose

mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais em áreas urbanas e semiurbanas (5).

O DENV é um vírus com capsídeo icosaédrico e envelopado, o que dá a ele um aspecto esférico. Os vírions medem aproximadamente 40 a 80 nm de diâmetro. O capsídeo proteico (C), é envolvido por um envelope lipídico, ornado por proteínas transmembrana (M), e de natureza glicoproteica (E) (6).

O genoma viral é constituído por uma fita simples de RNA com polaridade positiva, com aproximadamente 11 Kilobases (Kb). Codificam três proteínas estruturais, proteína do capsídeo (C), proteína do envelope pré-M, precursora da proteína de membrana (M) e glicoproteínas que formam as espículas (E), e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 1) (6,13).

**Figura 1. Organização genômica dos Flavivirus**



Proteínas estruturais (C, prM, E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) flanqueadas pelas regiões não codificantes (5' e 3' UTR). Figura adaptada de: Guzman et al. 2010.

Com base na diversidade genética, e distribuição geográfica, foram identificados genótipos distintos em cada sorotipo, que podem se diferenciar em termos de virulência e transmissibilidade viral. Em cada genótipo, linhagens e sub-linhagens virais foram caracterizadas (13).

Há certo nível de variação no gene codificante da proteína E que determina alterações na sua composição entre os vírus dengue, inclusive nos epítomos que constituem antígenos de superfície para produção da resposta

imune no hospedeiro. Devido à sua importância, esses epítomos definem a classificação do vírus em quatro sorotipos relacionados, mas antígenicamente distintos designados por DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (6).

### **Características clínicas e imunológicas associadas à infecção causada pelo DENV**

Os sintomas e sinais manifestados durante a infecção causada pelo DENV variam de Dengue com sinais de alarme (DAS) e Dengue grave (DG) (14), com complicações clínicas importante e desenvolve em uma pequena porcentagem dos pacientes (4,15). As infecções assintomáticas (numa proporção de aproximadamente 4 para 1 pessoa infectada) desempenham um papel importante nas epidemias de DENV contribuindo para a maior transmissão do vírus, dificultando a detecção precoce do aumento da incidência, embora esta relação seja dinâmica ao longo do tempo (4,16).

A infecção primária causada por um dos quatro sorotipos virais induz uma resposta imune, que leva a uma proteção de longo prazo para os DENV homólogos. No entanto, uma infecção secundária com sorotipos diferentes pode resultar numa resposta imune diferenciada, incluindo formas mais graves de doença (16). A manifestação clínica severa após a segunda infecção com outro sorotipo seria explicada por uma exacerbação imune induzida por anticorpos sub-neutralizantes (do inglês, antibody dependent enhancement – ADE) (15).

O ADE ocorre quando anticorpos sub-neutralizantes geradas contra um sorotipo anterior, facilitam a entrada do vírus nas células imunes do hospedeiro, levando ao aumento da carga viral. Ou seja, anticorpos sub-neutralizantes (ligados às partículas virais na segunda infecção) ligam-se aos receptores Fc do anticorpo que algumas destas células possuem na membrana plasmática. Esse segundo vírus pode usar esse mecanismo para infectar monócitos e macrófagos humanos, fazendo com que a segunda infecção causada por um sorotipo distinto da primeira infecção viral seja facilitada e agravada (15,17,18).

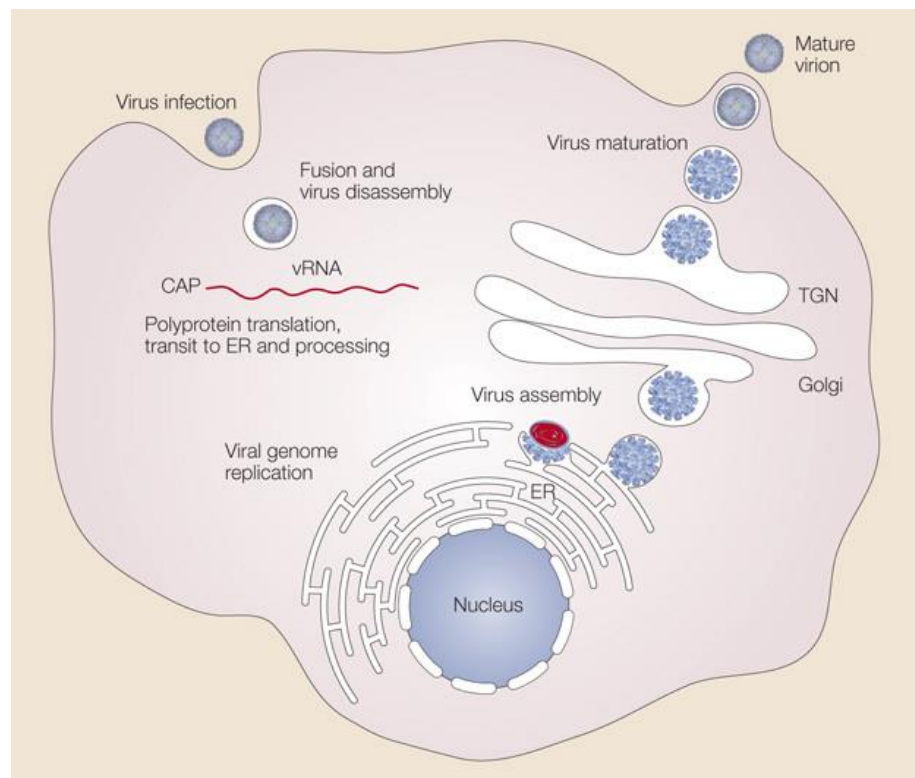
### 1.1.1 Ciclo Replicativo e Ciclo de transmissão - DENV

O DENV inicia-se seu processo de infecção no homem após serem inoculados através da picada da fêmea do mosquito *Aedes* spp. previamente infectada. Qualquer um dos quatro sorotipos pode causar altos níveis de viremia em humanos que dura em média 4–5 dias (variação, 2–12 dias) (17,18)

A entrada dos vírus nas células hospedeiras envolve a endocitose mediada por receptores celulares específicos para proteínas do envelope viral (E). Na rota endocítica, o DENV internalizado em um endossomo funde com um lisossomo onde o vírion sofre catálise ácida e ocorrendo a liberação do nucleocapsídeo viral (isto é, fusão pH mediada). A replicação viral se inicia com a síntese de RNA da fita negativa do genoma completo, molde para a síntese de fitas positivas adicionais, possibilitando a produção de proteínas não estruturais e as estruturais que possibilitam a morfogênese de novas partículas. A progênie viral saem da célula infectada por rompimento do compartimento intracelular membranoso e brotamento (19). A infecção inicia no endotélio vicinal ao sítio de infecção onde ocorre a viremia primária envolvendo linfonodos mais próximos e depois progênie viral é espalhada pelo organismo humano (20).

Durante a viremia secundária, o DENV replica em células musculares estriadas e lisas, fibroblastos e também linfonodos, circulando livremente no plasma e interior de células fagocíticas (monócitos e macrófagos); multiplicando-se e disseminando-se por todo organismo (17).

**Figura 2 :Replicação do vírus dengue**



Fonte: <https://www.nature.com/scitable/content/dengue-virus-replication-22401525/>

### **Ciclo de transmissão do DENV, homem-mosquito-homem**

As análises de difusão espacial em ambientes urbanos indicam que quando se inicia a identificação de casos clínicos relacionados ao vírus nestes ambientes, o vírus já deve estar praticamente distribuído por toda a cidade (circulação críptica), sendo um fenômeno frequentemente documentado em ambientes urbanos brasileiros (4). Os grupos de risco em áreas endêmicas são divididos em crianças acima de um ano de idade e jovens adultos susceptíveis (17,18). Casos graves de dengue podem ocorrer em infecções primárias com crianças menores de um ano, associados aos anticorpos adquiridos através de transferências placentárias de mães imunes a DENV durante a gravidez (21). Está bem estabelecido que infecção primária causada por um dos quatro sorotipos virais induz uma resposta imune, que leva a uma

produção de anticorpos (17). Estes anticorpos possuem um papel distinto durante os primeiros anos de vida da criança. Ao nascimento, os anticorpos de resposta imune primária para o DENV materno conferem proteção para a criança, ao passar de alguns meses diminuem a títulos sub-neutralizantes, facilitando a infecção pelo DENV, potencializadas pelo mecanismo de ADE (do inglês, antibody dependent enhancement) (21), descrito anteriormente. Conforme observado nos países do continente asiático, a co-circulação de todos os sorotipos (DENV 1-4), apresenta uma mudança no padrão da doença, registrando casos mais graves. Devido ao acúmulo de imunidade contra o DENV em pessoas mais velhas, a faixa etária que desenvolve a doença é a dos mais jovens (4).

#### **1.1.1.1 Vírus Dengue no Brasil**

Nas Américas, a dengue tem sido documentada desde o Séc. XVII (22). No Brasil, a circulação do DENV foi seriamente restrita ou impedida, da primeira metade do Séc. XX até os meados da década de 1960, quando o *Aedes aegypti* foi reintroduzido. A dengue passou então à condição de doença reemergente nos anos de 1981-1982 com a identificação dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (23). Atualmente, observa-se uma ampla distribuição do DENV, com a co-circulação dos quatro sorotipos em diversas regiões do país. O vírus DENV-1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia), iniciando um processo de intensa dispersão viral, com epidemias que atingiram progressivamente todas as regiões brasileiras (24). Em 1990-1991, ocorreram à entrada do DENV-2, seguido pelo DENV-3 em 2001 e a reintrodução do DENV-4 em 2010 (22,25–27) .

No período de 2010 a 2019 foram notificados 9.559.582 casos de dengue no Brasil, com destaque para o ano de 2015, que apresentou o maior número de casos, de aproximadamente 1.650.000 notificados no país (28,29). Dentre as 23.976 amostras processadas para isolamento viral, 39,3%

apresentaram para DENV-1 (94,1%), seguido de DENV-4 (4,8%), DENV-2 (0,7%) e DENV-3 (0,4%) (29).

Em 2019, a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de dengue, resultando 65,7 % casos, em relação ao total do país. São Paulo é o estado que apresenta o maior número de exames realizados, com 55,1% dos resultados laboratorialmente confirmados (30). As amostras processadas para a identificação dos sorotipos do DENV indicam que 85,2% das amostras foram positivas para DENV-2 (30).

A distribuição dos casos prováveis de dengue no Brasil, no período de janeiro a junho de 2020 apresenta um aumento do número de casos. 91,7% dos casos de dengue, relacionado ocorreram neste período. No entanto, a partir do segundo semestre de 2020, foram notificados 8,3% dos casos prováveis no país, observando uma diminuição dos casos em relação ao ano de 2019. Ressaltando que no ano de 2020, o surgimento do SARS-CoV-2 levou à mobilização de laboratórios e funcionários de saúde pública em detrimento das práticas de diagnóstico e controle de arbovírus (12). Talvez, como consequência ocorreu uma diminuição dos registros de casos e de óbitos por dengue, em consequência a subnotificação ou atrasos nas notificações associadas à mobilização das equipes de vigilância e o receio da população em procurar atendimento nas unidades de saúde (12,31). O sorotipo DENV-2 foi predominante, presente em 79,1% das amostras testadas no país no período analisado (31).

Em 2021, houve uma redução de 46 % de casos registrados para o mesmo período analisado de 2020. Dentre as amostras testadas no período, o DENV-1 representou 51,0% das amostras positivas, enquanto o DENV-2 com 48,9% (32).

A situação epidemiológica de 2022 até o mês de maio em comparação com o ano de 2021 indicou que houve um aumento de 135,1% de casos registrados, apresentando detecção do sorotipo de DENV-1 (89,4%) e (10,6%) DENV-2. A Região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência de dengue, até o momento (33).

## **Vírus Dengue na Bahia**

A introdução do DENV na Bahia em 1987 ocorreu no Oeste do Estado, o sorotipo identificado foi o DENV-1 e cerca de 623 casos foram notificados como suspeitos. A epidemia restringiu-se apenas à área urbana, possibilitando medidas de contenção e combate ao principal vetor, controlando a epidemia para outros municípios limítrofes. Ao ser eliminado o mosquito, o vírus aparentemente deixou de circular de forma intensa (34,35).

No ano de 1994 o DENV voltou a ser notificado no Estado da Bahia quando o DENV-2 foi introduzido em uma cidade do extremo Sul do Estado, disseminando-se em seguida. No ano de 1996 a taxa de detecção alcançou aproximadamente 370/100.000 habitantes, observando um declínio em 1998 de 170/100.000 habitantes. Entre 1994 e 1996 o único sorotipo isolado foi o DEN-2 e, somente em 1997 o DENV-1 também passou a circular intensamente.

No período de 1994 a 2000, do total de municípios do estado, apenas 8,7% não notificaram casos de dengue durante o período. Em 1994, 4,8% dos municípios foram atingidos e em 1997 observou-se o maior contingente, com 73,3% dos municípios atingidos (34,36).

Os principais municípios que apresentaram maiores números de notificações, entre 1994 e 2000, foram aqueles situados próximos ao litoral e da BR-101 e os mais urbanizados como Salvador, com elevadas taxas de densidade populacional (35). Entre 2001 e 2010 foram notificados 362.564 casos de dengue, sendo que no ano de 2009 a maior taxa de incidência no estado foi de 710,3/100 mil habitantes. A dengue no estado da Bahia acompanhou o padrão apresentado na região Nordeste e no Brasil, com predominância do sorotipo DEN-3 entre os anos de 2001 a 2006 e DEN-2 de 2007 a 2009 segundo o Relatório de Situação do Sistema de Vigilância em Saúde para a Bahia. No entanto não ficou claro qual sorotipo foi predominante no ano de 2010 (35,37).



Em 2007 chamou atenção o percentual de casos registrados de 66,7 % em relação a todo país, incluindo cidades como Barreiras, na região do Estado da Bahia (35), incluindo cidades às quais pertence a população amostral deste presente estudo nos meses de Março à Junho de 2021. Quanto à distribuição de casos de dengue no município de Barreiras (BA), de janeiro de 2007 a março de 2013, foram notificados 68,8% casos prováveis de dengue, nos anos de 2009, 2011 e 2013, apresentaram uma taxa de incidência de 704,5, 429,3 e 247,2 por 100 mil habitantes, respectivamente. O DENV-1 circulou de 2009 a 2011, reaparecendo no primeiro trimestre de 2013. O DENV-2 circulou no município em 2008 e 2009, com retorno em 2011 e o DENV-3 foi encontrado de 2007 a 2010. Não houve registro de circulação do DENV-4 no município de Barreiras (38). Estudo realizado no município de Barreiras entre 2015 e 2016 apresenta uma diminuição nas notificações e relatam notificações os vírus Chikungunya e Zika, no ano de 2016 (39).

## **1.2 Características gerais do vírus – CHIKV**

O vírus Chikungunya (CHIKV, gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*) é um vírus transmitido por artrópodes que ocorre em regiões tropicais e subtropicais.

O CHIKV é um vírus de RNA fita simples de sentido positivo, com genoma em torno de 11,8 kb, codificando proteínas não estruturais (nsP1-nsP4) e proteínas estruturais (C, E1, E2, E3, 6 K). É classificado em quatro genótipos com base em sua diversidade genética e na distribuição geográfica inicial de suas linhagens, que incluem os genótipos asiático, centro-leste-sul-africano (ECSA), oeste africano (WA) e linhagem do Oceano Índico (IOL) (11,40,41).

### **1.2.1 Ciclo replicativo e ciclo de transmissão - CHIKV**

Por meio do processo de endocitose mediada por receptor, o CHIKV adsorve na célula alvo, o ambiente ácido no interior do endossoma desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, levando à

liberação do genoma viral no citoplasma. Esse, por sua vez, é traduzido em proteínas virais não estruturais. Após o processamento, o complexo de proteínas não estruturais forma a replicase viral, a qual catalisa a síntese de uma cadeia de RNA de sentido negativo para servir como molde para a síntese do genoma de sentido positivo e do RNA subgenômico. O RNA subgenômico é traduzido e produz a poliproteína estrutural, a qual é, então, clivada para produzir as proteínas estruturais individuais, seguida da montagem dos componentes virais. Por fim, a partícula viral madura (vírion) montada é liberada por brotamento através da membrana plasmática, onde adquire o envelope com glicoproteínas do hospedeiro incorporadas (42).

Transmitido principalmente por mosquitos *Aedes spp.* O CHIKV pode causar surtos onde os vetores são abundantes. Epidemias recentes têm sido facilitadas por mutações nas glicoproteínas de envelope que resultaram em populações de CHIKV mais adaptadas para transmissão pelo *A. albopictus*. A mutação na glicoproteína E1 do CHIKV, denominado E1:A226V, contribuiu para aumentar a infectividade e transmissão pelo *A. albopictus*, geralmente considerado como tendo uma capacidade vetorial de transmissão de arbovírus menor do que o *A. aegypti*. Essa adaptação do vírus facilitam surtos em regiões de clima temperado, sobrevivendo aos intensos invernos europeus, em locais onde o *A. aegypti* não está presente (41,43).

### 1.2.2 Vírus CHIKV no Brasil

Descrito pela primeira vez na Tanzânia, em 1952, o CHIKV já causou mais de 70 surtos epidêmicos significativos em todo o mundo, principalmente em países do Sudeste Asiático e da América Latina (40,41,44).

Surtos de CHIKV ocorreram na África, Ásia, Europa, regiões da Índia e do Pacífico e foi introduzido no Caribe em 2013, de onde se espalhou para a América Central e do Sul. No Brasil, o primeiro caso autóctone foi identificado em 2014, na Região Norte (Amapá) e Nordeste (Bahia), causado pelo genótipo asiático. Simultaneamente, casos autóctones do genótipo Leste/Central/Sul/Africano (ECSA) foram confirmados na região nordeste do

Brasil. Naquela localidade, no ano de 2019, houve a segunda maior notificação de incidências do CHIKV no país (31,41,44).

## **2. OBJETIVOS**

Compreender a característica genética associada a infecções causadas pelo DENV, assim como das distribuições de diferentes isolados virais, amostrados na região da Bahia no ano de 2021.

### **Objetivos específicos**

- Identificar os genótipos e linhagens circulantes na região da Bahia durante o surto.
- Sequenciamento e caracterização dos genomas dos vírus isolados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material de estudo

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Universidade Federal do Oeste da Bahia, CAAE: 42901721.9.0000.8060.

A população de estudo é composta por pacientes com sintomas e sinais clínicos relacionados às infecções causadas por arboviroses, atendidas na região do oeste da Bahia, com casos notificados nas cidades de Barreiras e Luís Eduardo Guimarães, nos meses de março a junho de 2021.

As amostras foram selecionadas conforme os sintomas e sinais clínicos e resultados sorológicos. Encaminhadas ao Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática (LEMB) juntamente com os dados ELISA – NS1, realizados pelo Laboratório escola da Faculdade Sul América - Centro Luís Eduardo Magalhães - Bahia.

Amostras de soro um total de 100 pacientes foi coletado pelas equipes de profissionais da saúde capacitados em unidades de atendimento municipais e hospitais, devidamente acondicionadas em Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, (900ul de Trizol para 300ul de amostra) mantendo a integridade do material genético (45), sendo encaminhadas e armazenadas a -80°C até que os testes moleculares fossem realizados.

O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante (Trizol, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA,). A detecção molecular foi feita por qRT-PCR (conforme descrito posteriormente) realizada no LEMB/ICB/USP para DENV (45). As amostras negativas para DENV foram subsequentemente avaliadas para outras arboviroses, tais como os vírus pertencentes aos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus* usando qRT-PCR. Para definir os 4 sorotipos de DENV, o RNA extraído foi submetido à transcrição reversa seguida de reação da polimerase em cadeia com o cDNA obtido, e à reação de semi-nested (46,47).Diagnóstico Sorológico

Todas as amostras de soro coletadas de pacientes sintomáticos foram analisadas utilizando a técnica de ELISA-NS1, conforme recomendação do fabricante (Euroimmun). As amostras que apresentaram resultados negativos para DENV foram submetidas a testes de ELISA-IgM para CHIKV, realizados no Laboratório escola da Faculdade Sul América na Bahia.

### 3.1.1 Diagnóstico Molecular

De todas as amostras de soro coletadas, foram extraídas o material genético, conforme o protocolo de extração de RNA. Iniciamos o protocolo com 300ul de amostra e 900ul de Trizol desenvolvido de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), com um volume de diluição em 50ul DEPC (45). O valor de Ct das amostras foram estimados através da técnica de qRT\_PCR, utilizando um conjunto de primers e sonda projetados para os vírus DENV (48), ZIKV (49), CHIKV (50), YFV (51) e MAYV (52). Reações foram conduzidas em um volume de 15 µL contendo 5 µL de RNA viral, 7,5 µL de tampão RT-PCR 2x, 0,5µL da mistura de primer direto e reverso e sonda com a concentração de 10 µM (para a concentração final de 400 nM de cada um), 0,6µL de mistura enzimática 25x RT-PCR e 1,4 µL de água livre de nuclease foram incubados a 45°C por 10 min para a síntese de cDNA, 95°C 10 min para inativação da transcriptase reversa, ciclos de PCR e detecção de 45 ciclos de 15 seg a 95°C, 45 seg a 60°C para a etapa de coleta de dados com o sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O RNA extraído, conforme descrito anteriormente, foi convertido em cDNA com kits de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystem) usando iniciadores aleatórios. Resumidamente, reações de 20 µL contendo 5 µL de ácidos nucleicos, 2 µL de iniciador aleatório 10 mM, 1 µL de RT multiScribe, 2,5 µL de tampão RT 10X, 1 µL (0,1 M) de DTT, 0,8 µL (10 mM) de cada dNTPs e 7,7 µL de água livre de nuclease foram incubados a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, com etapa de inativação de 85°C por 5 min.

Os amplicons (produtos da reação de PCR) foram gerados em reações de 22  $\mu\text{L}$ , contendo 3  $\mu\text{L}$  de cDNA de DENV previamente descritos, 0,2  $\mu\text{L}$  cada (10 mM) de iniciadores diretos e reversos (D1 e D2) (46), 12,5  $\mu\text{L}$  de PlatinumTaq DNA Polimerase de Alta Fidelidade (Invitrogen), 2,5  $\mu\text{L}$  de Tampão de PCR 10X (atingindo uma concentração final de 1,13 x por reação), 1  $\mu\text{L}$  (50 mM) de  $\text{MgSO}_4$ , 0,5  $\mu\text{L}$  (10 mM) de dNTPs e 14,9  $\mu\text{L}$  de água sem nuclease. As condições de ciclagem com termocicladores MJ Research PTC-200 Peltier da Bio-Rad consistiram em amplificação foram realizadas da seguinte forma: 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 35 s, 57°C por 45 s, seguido por uma extensão final e 72°C por 2 minutos.

Para a segunda amplificação, reação de “semi-nested”, de 25  $\mu\text{l}$  com 2,5 $\mu\text{L}$  do amplicons produzidos na primeira amplificação diluído 1:80 em água DEPC, 12,5  $\mu\text{L}$  de PlatinumTaq DNA Polimerase de Alta Fidelidade (Invitrogen), 0,2  $\mu\text{L}$  cada (10 mM) de iniciadores diretos e reversos específicos para sorotipos DENV: D1, TS1, TS2, TS3 e TS4, para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 respectivamente (Tabela1) (48,53), e 9  $\mu\text{L}$  de água sem nuclease . As condições de ciclagem com termocicladores MJ Research PTC-200 Peltier da Bio-Rad consistiram em amplificação que foram realizadas da seguinte forma: 94°C por 2 min, 30 ciclos térmicos de 94°C por 35s, 56°C por 45s, 72°C por 2min, seguindo por uma extensão final de 72°C por 7min. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 5% submetidos à eletroforese a 70 Volts por 90 min em tampão TAE 1%, utilizando a escada de 100 bp ((Ludwig – Biotecnologia), visualizados por meio de transiluminador de luz ultravioleta.

**Tabela 1. Relação de oligonucleotídeos utilizados para amplificação e tipagem do vírus dengue**

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	Posição Genômica (nt)	Tamanho do Fragmento (pb)
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG-3'	134-161	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	616-644	511
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGG-3'	568-586	482
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252	119
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392

Fonte: LANCIOTTI et al., 1992.

### 3.1.1.1 Sequenciamento

#### Sequenciamento do gene da proteína E – DENV

A proteína E é o principal componente da superfície viral. Como a região do gene da proteína E apresenta grande variabilidade nucleotídica, as análises filogenéticas foram realizadas com base nas sequências deste gene.

Para amplificação e sequenciamento da proteína E de DENV-1, “primers” (iniciadores) específicos foram desenhados. Para a seleção dos primers, utilizamos sequências completas em formato FASTA adquirida no site (National Center for Biotechnology Information - NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), para todas as sequências disponíveis deste sorotipo, foram alinhadas e editamos utilizando o programa ALIVIEW (54). AS sequências utilizadas disponíveis no site do NCBI até Agosto de 2021, números de acesso: FJ384655, AB519681, GU131863, FJ850081, FJ850070, FJ850087, FJ850084, FJ850075, FJ850093, FJ850077, FJ850071, FJ850073, FJ850090, JX669464, JX669464 JX669461, JX669469, JX669475, JX669472, JX669474, JX669467, JX669471, JX669470, JX669468, JX669473, JX669466, JX669465, JX669462, KP188543, KP188542, KP188541, KP188540, KP188539, KP188548, KP188547, KP188546 , KP188545, KP188544, KP188568, KP188567, MW208044, MW208043, MW208056. Os critérios utilizados para a síntese dos “primers” específicos para amplificação parcial do genoma do vírus DENV, estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos usados para amplificação parcial do genoma do vírus DENV.**

Proteína E			
Primer	Posição	pb	Temperatura
1	1 - 697	696	54-58
2	409 - 1115	706	57-59
3	680 - 1401	721	58-60
4	1118 - 1806	688	59-60

Fonte: próprio autor

Os primers foram sintetizados por empresa terceirizada (Exxtend: solução em oligos e padronizados para o uso no laboratório LEMB com concentrações de 10pmol/uL diluídos conforme instruções do fabricante.

As sequências do gene da proteína E de alguns pacientes com sorotipo identificado ( tabela 3), foram submetidas a sequenciamento nucleotídeos.

**Tabela 3. Pacientes identificados para o sorotipo de DENV 1.**

PCR	Amostras	CT
A	BA2	24,0
B	BA9	25,5
C	BA33	26,3
D	BA38	27,8
E	BA42	24,8
Controle	-	-

Fonte: próprio autor

Estes genes foram amplificados por RT-PCR utilizando o par de primers para cada amostras de DENV-1 (tabel 4). A reação foi realizada num volume de 20  $\mu$ L mais 2  $\mu$ L de cDNA, contendo: 0,5  $\mu$ L de dNTP; 0,5  $\mu$ L de diversas combinações dos “primers forward” (F) e “reverse” (R) (tabela 3); 0,1 de  $\mu$ L de PlatinumTaq DNA Polimerase de Alta Fidelidade (Invitrogen)



complementada com a adição de 2,5 µL de Tampão de PCR 10X (atingindo uma concentração final de 1,13 x por reação) e 14,9 µL de água sem nuclease. A amplificação foi realizada em termocicladores MJ Research PTC-200 Peltier da Bio-Rad, como segue: 94°C por 2 minutos, 40 ciclos a 94°C, por 15 segundos e 56°C, por 3 minutos, 68°C, por 1 minuto e 20 segundos, seguida de uma extensão final a 68°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em géis de agarose 5% e submetidos à eletroforese a 70 Volts por 90 min em tampão TAE 1%, utilizando a escada de 100 bp ((Ludwig – Biotecnologia), visualizados por meio de transiluminador de luz ultravioleta.

**Tabela 4. Iniciadores (“primers”) desenhados e utilizados para a PCR e sequenciamento de genoma dos vírus DENV-1.**

Primer	sequências (5' - 3')
EF-1	TCTAGAAACAAGAACYGAAAC
ER-1	GCTTGAGGTGTTATGGTTGC
EF-2	AAGATGTCCAACACAAGGAG
ER-2	GCTTAAATGAGCCTGTGCAC
EF-3	ACCATAACACCTCAAGCTCC
ER-3	TCGAACATTTTCCCTATGCTGC
EF-4	GAGAAGGAAGTGGCTGAGAC
ER-4	GACAGTCTTTTTGGGGAGTCAG

Fonte : próprio autor

Os “ forward primers” estão indicados com a letra “F” junto com a letra E (envelope), e os “reverse primers” indicados com a letra “R”. Os números indicam a quantidade de iniciadores utilizados no sequenciamento (4 “primers”).

## **Sequenciamento do gene da região E1 – CHIKV**

Em nosso laboratório (LEMB), já possuímos os primers necessários para a amplificação e sequenciamento do gene da região E1 – CHIKV.

As sequências do gene da região E1 - CHIKV de alguns pacientes identificados foram submetidas a sequenciamento nucleotídeo, após o rRNA do hospedeiro ser removido das amostras de RNA total extraídas positivas, como descrito anteriormente

Os genes foram amplificados por RT-PCR utilizando o par de “primers forward” (F) 10826 e “reverse” (R) 12006 (55) para cada amostras de CHIKV. Os “primers” em estoque que apresentavam uma concentração de 100pmol/uL, foram diluídos a uma concentração de 10 pmol/  $\mu$ L.

O volume total da reação é de 20  $\mu$ L somando a 2  $\mu$ L de cDNA, contendo 1  $\mu$ L de dNTP; 1  $\mu$ L do “forward primer” (F) e 1  $\mu$ L de “reverse primer” (R) ; 0,3 de  $\mu$ L de PlatinumTaq DNA Polimerase de Alta Fidelidade (Invitrogen) se juntamente com 2,5  $\mu$ L de Tampão de PCR 10X (atingindo uma concentração final de 1,13 x por reação) e 15,2 de água sem nuclease. A amplificação foi realizada em termocicladores MJ Research PTC-200 Peltier da Bio-Rad, como segue: 94 °C em 2 minutos, 40 ciclos a 94°C, em 15 segundos, 56°C em 30 segundos, 68°C em 3 minutos seguida de uma extensão final a 68°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% submetidos à eletroforese a 60 Volts por 60 min em tampão TAE 1%, utilizando a escada de 1Kb ((Ludwig – Biotecnologia), visualizados por meio de transiluminador de luz ultravioleta.

## **Análise das Sequências e Filogenia**

Os produtos de amplificação foram analisados por alunos pesquisadores e colaboradores da Universidade Federal do Oeste da Bahia, com a orientação do Professor Doutor Jaime Henrique Amorim.

Foram enviados primers de DENV -1 em concentrações 100 $\mu$ M, os primers e as amostras de RT-PCR foram liofilizados e posteriormente diluídos para realização do sequenciamento.

Segundo os pesquisadores da Bahia, os amplicons de PCR foram ajustados para uma concentração de 5-10 ng/ $\mu$ L para cada amostra. As reações de preparação final foram realizadas com NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (NEB, EUA) e codificadas usando o kit ONT Native Barcoding Expansion (EXP-NBD104) (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido), de acordo com os protocolos dos fabricantes. As amostras foram então combinadas e purificadas usando AMPure XP Beads (Beckman Coulter, EUA) e carregadas em Oxford Nanopore MinION SpotON Flow Cells R9.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). A chamada de bases de alta precisão foi realizada usando a ferramenta Oxford Nanopore Guppy (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido).

Montagem dos genomas dos isolados de DENV, foram realizadas no nosso laboratório (LEMB), as sequências de adaptadores e as de baixa qualidade foram removidas com o programa Qcat.(56). Para garantir uma alta qualidade das sequências genômicas dos isolados, foi utilizado o programa de controle de qualidade Fastqc (57), que foram mapeadas no genoma com o programa Minimap2 (58,59), Para montagem de consenso e cobertura foi utilizado o programa Ugene (60).

Para realizar as análises filogenéticas, foi criada uma base de dados contendo sequências do gene da proteína E de DENV-1, correspondentes a isolados de diferentes países e estados do Brasil, as quais foram copiadas em formato FASTA no site ( National Center for Biotechnology Information - NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) que possui a base de dados de sequências, o GenBank. As sequências idênticas, mutantes, clones e vetores foram excluídos utilizando os programas a MAFFT (61,62), ALIVIEW (54).

O banco de dados contém as seguintes informações: código de acesso ao GenBank, país e ano de isolamento e sorotipo. Para cada cepa isolada neste trabalho, foi criado um código contendo o Estado brasileiro no

qual as amostras foram adquiridas (BA), sequência da amostra apresentadas em números (1,2,3,4,5) e ano de isolamento (2021).

Para construir a árvore filogenética foram utilizados os o programas IQ-TREE (63,64) e Fig-Tree (65) nas sequências de nucleotídeos codificantes e livres de recombinantes.

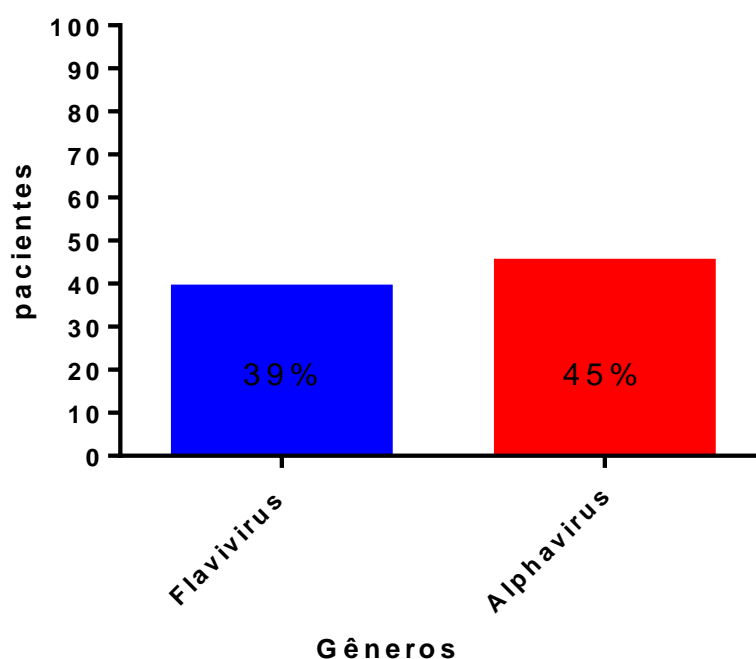
O suporte para as topologias inferidas durante as análises filogenéticas foi obtido pelo método de bootstrap utilizando 1000 réplicas, reconstruídos com máxima verossimilhança (do inglês, Maximum Likelihood - ML).

## 4. RESULTADOS

Do total de 100 amostras que compõe a população neste estudo, 10% foram encaminhadas no mês de Março, 16% no mês de Maio e 74% mês de junho do ano de 2021. Em referência ao período sintomático, 42,2% das amostras foram coletadas quando o paciente apresentava um dia de sintomas, 22% com dois dias de sintomas, 16 % com três dias de sintomas, 7% com quatro dias de sintomas, 12% com cinco dias de sintomas e 1% não foi informado a data da realização da coleta.

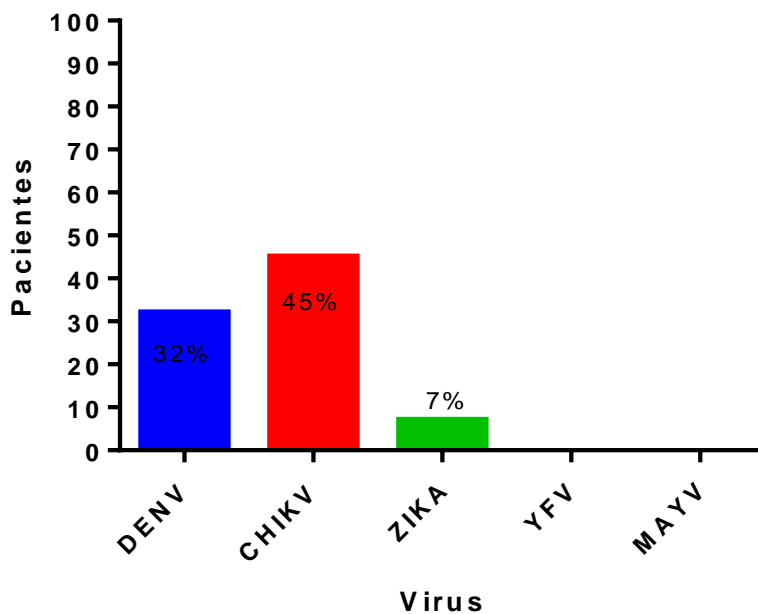
Os resultados moleculares, indicaram um índice de positividade de 39% (39/100) para *Flavivirus*, e 45% (45/100) para *Alphavirus*.

**Figura 3. Diagnóstico molecular**

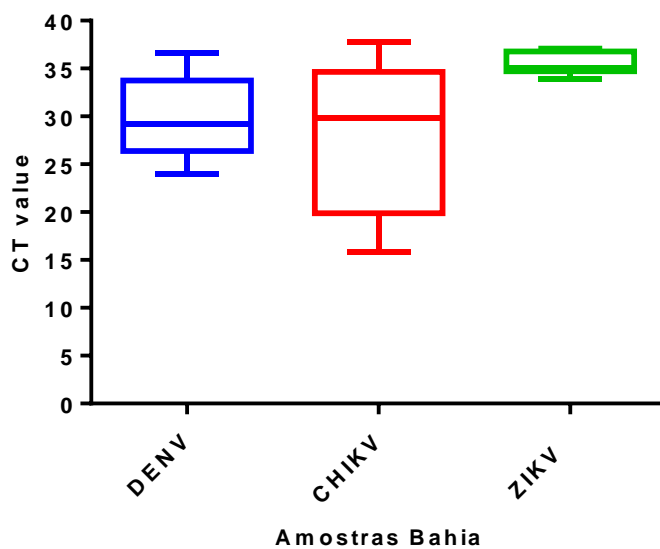


Flavivirus 39% e Aphavirus 45%. Fonte: próprio autor

Considerando a investigação individualizada para o gênero *Flavivirus*, foi observado 32% (32/100) de positividade para DENV, para ZIKV 07% (7/100) e YFV 0,0% (0/100). O gênero *Alphavirus* apresentou 0% para MAYV (0/100) e 45% (45/100) para CHIKV, sendo observando casos de co-infecção entre DENV, CHIKV e ZIKV.

**Figura 4. Diagnóstico molecular**

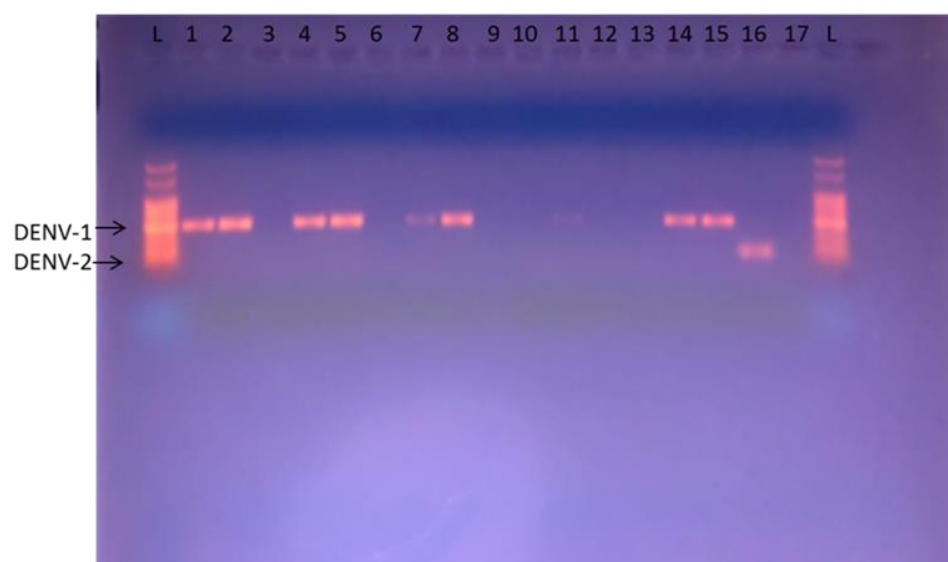
DENV 32%, CHIKV 45%, ZIKA 7%, YFV 0% e MAYV 0%. Fonte: próprio autor

**Figura 5. Índices de positividade (CTvalue) para DENV, CHIKV e ZIKV.**

Foram consideradas amostras com CT >36,6. CT >37,8 e CT > 37,1 respectivamente. Fonte: próprio autor

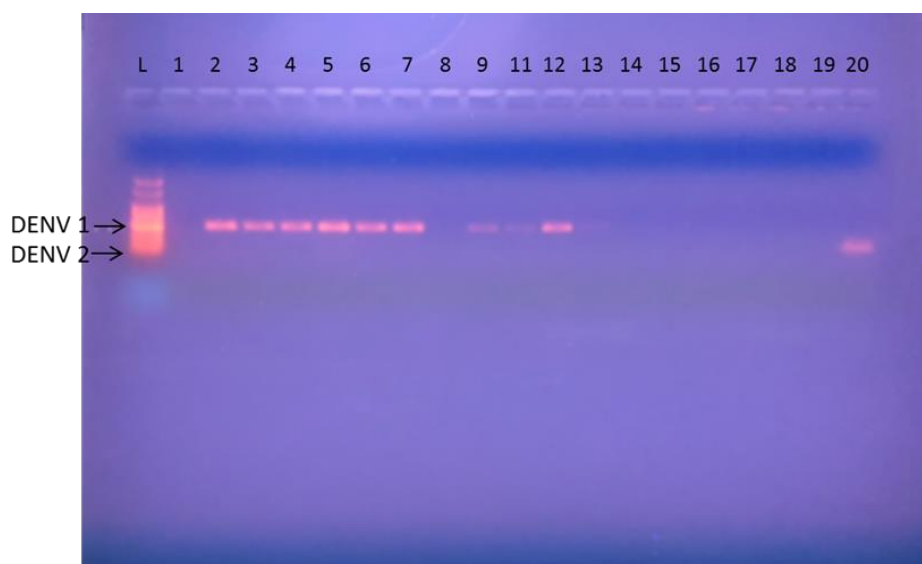
Na investigação dos 4 sorotipos (DENV 1-4), foi observado positividade para DEN-1 com 18% (18/100) no total de amostras e 56,25 % (18/32) no total de amostras positivas para DENV (Figuras 5 e 6).

**Figura 6. Eletroforese dos amplicons da sorotipagem - DENV**



Eletroforese dos amplicons das amostras positivas para DENV-1. DENV-2 o controle. Amostras enviadas 31-03 e 20-05 de 2021. Fonte: próprio autor

**Figura 7. Eletroforese dos amplicons da sorotipagem - DENV**

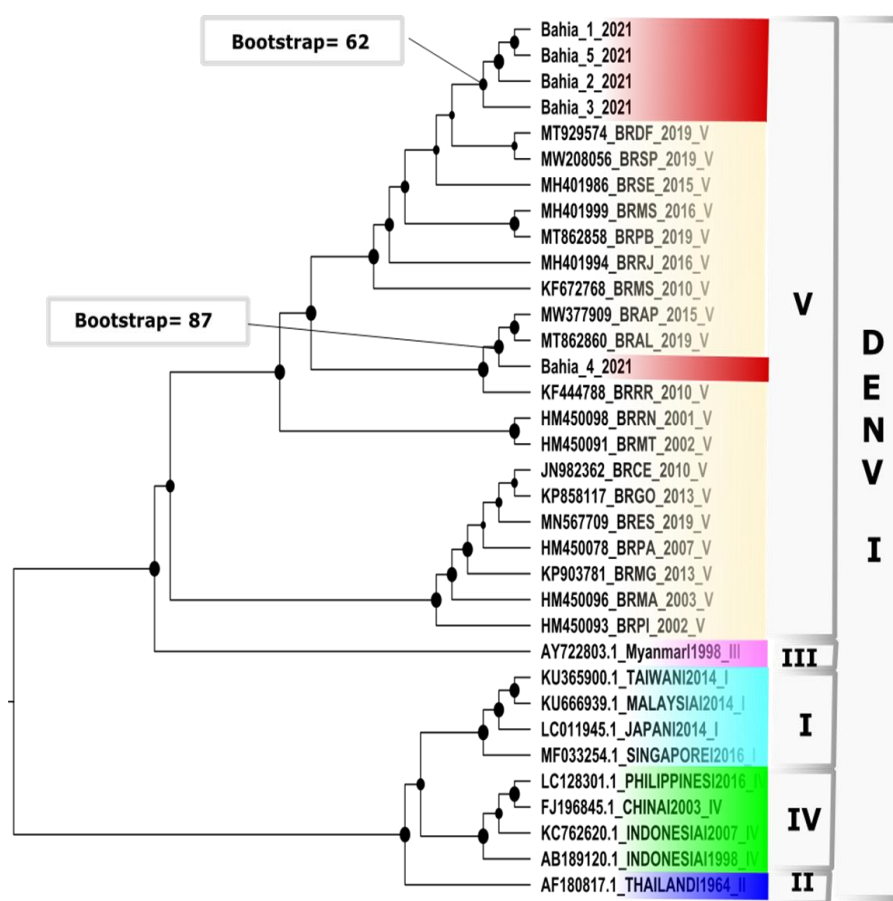


Eletroforese dos da sorotipagem das amostras positivas para DENV-1. DENV-2 o controle. Amostras enviadas em 30-06- 2021

#### 4.1 Sequenciamento do gene da proteína E – DENV

Os isolados dos estado ada Bahia 1, 2, 3 e 5, das cidades de Barreira e Luís Eduardo Magalhães, encontram estreitamente relacionados a outras cepas isoladas no Distrito Federal (DF) e São Paulo (SP) 2019 e, também a amostra do isolado Bahia 4, está relacionado a cepas isoladas no Estado de Alagoas (AL) 2019 e Amapá 2015 (AP).

**Figura 8. Análise filogenética do DENV-I, com base na sequência do gene da proteína E.**



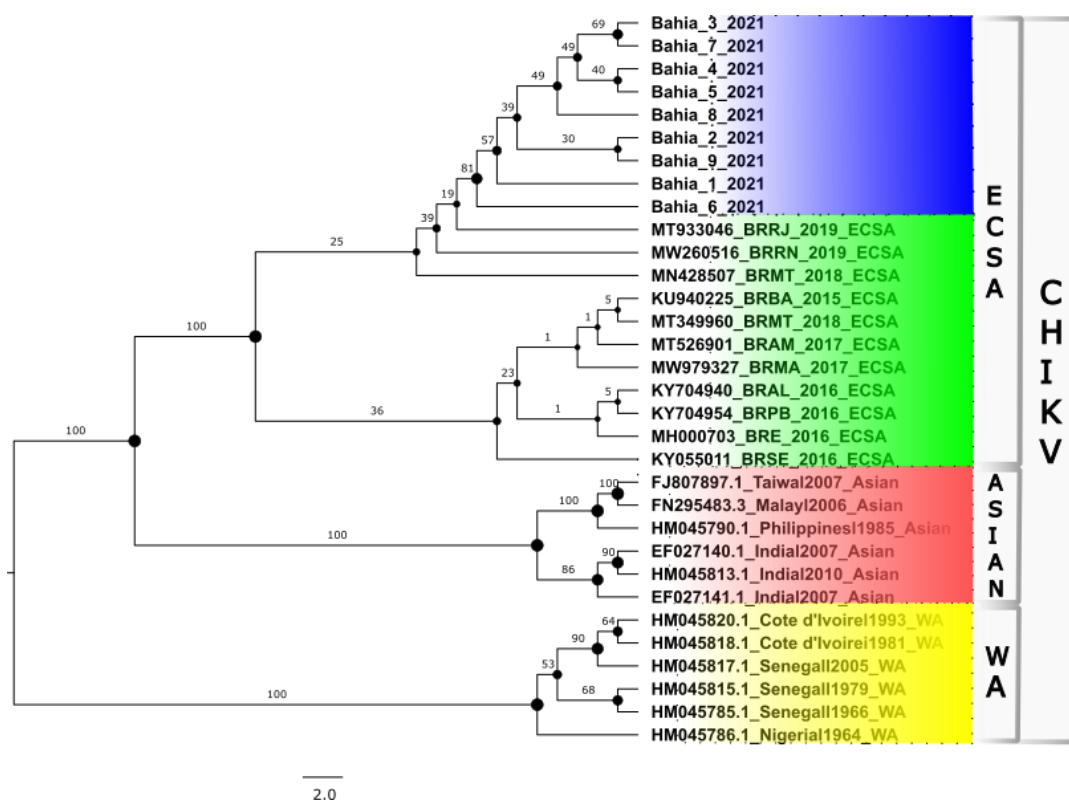
A árvore filogenética foi construída pelo método de máxima verossimilhança com bootstrap de 1000 replicações. Os cinco isolados de DENV-1, geradas no estudo, foram alinhados com 29 sequências de referência globais. A identificação das amostras de DENV-1 no presente estudo segue a seguinte rotulação: número de identificação/país/ano de isolamento/ genótipo. Os isolados Bahia 1, Bahia 2, Bahia 3 e Bahia 4 e Bahia 5 (destacados em vermelho).



#### 4.1.1 Sequenciamento do gene da região E1 – CHIKV

Os valores de bootstrap indicam associação filogenética com os isolados do sudeste Brasileiro, sendo agrupados com os isolados do Rio de Janeiro. Infere-se assim que tais isolados pertençam à linhagem ECSA, os isolados da Bahia (2020 – 2021) formam um grupo monofilético com elevado valor de suporte, indicando que eles possuam a mesma origem evolutiva e a posição apical dos nossos isolado sugerem migração do Sudeste para a Bahia. As sequências brasileiras pertencentes ao genótipo ECSA estão agrupadas com as sequências caracterizadas no presente estudo de Bahia (2020- 2021).

**Figura-9: Análise filogenética do CHIKV, com base nas sequências parciais da região E1-3’NTR.**



A árvore filogenética foi construída pelo método de máxima verossimilhança com bootstrap de 1000 repetições. O conjunto de dados consiste em 32 sequências de CHIKV com genótipos da África ocidental (n= 06) destacadas em amarelo, genótipos asiáticos (n=06) destacados em vermelho, genótipos ECSA (n=11) destacadas na cor verde, e as sequências geradas neste estudo (n=9) destacadas na cor azul. Todas as sequências utilizadas estão identificadas (rotuladas) no formato: número de acesso/ país/ ano do isolamento.

## 5. DISCUSSÃO

Através do diagnóstico molecular, pudemos estudar a origem e de isolados do sorotipo DENV-1 e de CHIKV amostrados na Bahia. Os resultados corroboram com os dados do Boletim Epidemiológico (Semana Epidemiológica 25 e Semana Epidemiológica 30 – 2021)(14,66), para o mesmo período amostral. Crucialmente as amostras processadas neste período, inicialmente diagnosticadas para DENV, apresentaram positividade para Flavivirus e Alphavirus, revelando casos de co-infecção entre DENV, ZIKV e CHIK. (Figuras 2,3,4). Esta informação é muito relevante uma vez que não é bem entendida as implicações destas associações no contexto de transmissão e patogênese.

Os padrões filogenéticos, obtidos através do sequenciamento do gene da proteína E do DENV, sugere que o DENV-1 introduzido no ano de 2021 nos municípios de Barreiras e Luís Eduardo Magalhães – Bahia, indica, a possibilidade de co-circulação de duas linhagens distintas com suporte de 62% e 87% por bootstrap e com isolados do Distrito Federal/ ou São Paulo e Amapá/ ou Alagoas /ou Roraima, agregando-se ao genótipo V. A associação dos isolados da Bahia com estas outras localidades sugere movimentação do vírus entre a Bahia e estas localidades. A árvore filogenética foi construída incluindo os isolados DENV-1 neste estudo e outros isolados a nível mundial (Figura 7).

A incidência de dengue é uma consequência da persistência do vetor em áreas urbanas, possivelmente resultado de uma baixa eficácia dos métodos de controle (18). As administrações estaduais e municipais de Saúde Pública no Brasil podem estar subnotificando o número casos de infecções arbovirozes. Possivelmente a demora no diagnóstico e notificação viral, combinadas com a proximidade das cidades, contribui para o aumento das infecções ao longo do ano, impedindo um melhor entendimento do fluxo contínuo de pessoas infectadas e mosquitos, intensificando o desafio no combate aos surtos DENV (4).

Por sua vez, o padrão de adjacência da árvore inferida na análise filogenética desenvolvida com o sequenciamento do gene da região E1 do

CHIKV nas amostras isoladas da Bahia indicaram uma associação com outras amostras brasileiras suportada 100% das vezes em replicações de bootstrap e sugere uma relação próxima a um isolado do Rio de Janeiro (MT933046\_BRRJ), e com isolados do Rio Grande do Norte e Mato Grosso. Dado que todas as amostras usadas na comparação são mais antigas que as que coletamos na Bahia, pode-se sugerir que os vírus isolados na Bahia em 2021, pertencem a um grupo monofilético (com 81% de suporte) que provavelmente migrou destas localidades. Ademais, concluí-se que as amostras isoladas neste trabalho, comparadas com outros isolados a nível mundial, pertencem ao grupo monofilético (suportado 100% das vezes por bootstrap) associado ao genótipo ECSA (Figura 8). Todavia, devido ao número amostral, não é possível afirmar que não existam outras linhagens de CHIKV circulando na região da Bahia, pois não detectamos nas amostras pesquisadas, embora foi previsto que os genótipos asiáticos e ECSA acabariam se espalhando por todo o país (67,68). Argumenta-se que a importação da linhagem ECSA tenha ocorrido de forma randômica por viajantes que tenham circulado entre os estados da Bahia e Sergipe.

## **6. CONCLUSÕES**

Os estudos de diferentes aspectos das doenças e principalmente dos vírus são de grande importância para aperfeiçoar os conhecimentos sobre a enfermidade. Em razão da situação epidemiológica apresentada e diante do quadro de co-circulação de arbovírus (CHIKV e DENV) no Nordeste durante o período analisado, o estudo das epidemias ocorridas nesta região representa grande importância para o entendimento da dispersão do DENV e CHIKV pelo Brasil.

A utilização e combinação dos métodos sorológicos, realizados na Faculdade Sulamérica – Centro Luís Eduardo Magalhães – Bahia e moleculares, realizados no LEMB, foram imprescindíveis para o diagnóstico diferencial das arboviroses, principalmente nas investigações dos casos de co-infecções e movimentação de linhagens.

O desenvolvimento de estudos mais abrangentes, incluindo o sequenciamento completo de genomas virais, são necessários para a investigação da evolução, migração, infectividade e patogenicidade viral.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke G-J, Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol*. 2012 Nov;55(3):191–203.
2. Rust RS. Human Arboviral Encephalitis. *Semin Pediatr Neurol*. 2012 Sep 1;19(3):130–51.
3. Ribeiro MO, Godoy DT, Fontana-Maurell M, Costa EM, Andrade EF, Rocha DR, et al. Analytical and clinical performance of molecular assay used by the Brazilian public laboratory network to detect and discriminate Zika, Dengue and Chikungunya viruses in blood. *Brazilian J Infect Dis*. 2021 Mar 1;25(2):101542.
4. Villabona-Arenas CJ, de Oliveira JL, de Sousa-Capra C, Balarini K, Pereira da Fonseca CRT, Zanotto PM de A. Epidemiological dynamics of an urban Dengue 4 outbreak in São Paulo, Brazil. *PeerJ [Internet]*. 2016 Apr 5;4:e1892. Available from: <https://peerj.com/articles/1892>
5. Viana DV, Ignotti E. The occurrence of dengue and systematic review. *Rev Bras Epidemiol*. 2013;16(2):240–56.
6. Cunha M dos P, Guimarães VN, Souza M, de Paula Cardoso D das D, de Almeida TNV, de Oliveira TS, et al. Phylodynamics of DENV-1 reveals the spatiotemporal co-circulation of two distinct lineages in 2013 and multiple introductions of dengue virus in Goiás, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2016 Sep 1;43:130–4.
7. Huang YJS, Higgs S, Vanlandingham DL. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Front Microbiol*. 2019;10(JAN):1–14.
8. Di Paola N, Mesquita FS, Oliveira DBL De, Villabona-Arenas CJ, Zaki Pour S, de Sousa-Capra C, et al. An Outbreak of Human Parvovirus B19 Hidden by Dengue Fever. *Clin Infect Dis [Internet]*. 2019 Feb 15;68(5):810–7. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/68/5/810/5126385>

9. de Souza Costa MC, Siqueira Maia LM, Costa de Souza V, Gonzaga AM, Correa de Azevedo V, Ramos Martins L, et al. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015–2016. *Acta Trop*. 2019 Feb 1;190:395–402.
10. Borghetti IA, Zambenedetti MR, Requião L, Vieira DS, Krieger MA, De Cássia Pontello Rampazzo R. External Control Viral-Like Particle Construction for Detection of Emergent Arboviruses by Real-Time Reverse-Transcription PCR. *Biomed Res Int*. 2019;2019.
11. Xavier J, Fonseca V, Bezerra JF, do Monte Alves M, Mares-Guia MA, Claro IM, et al. Chikungunya virus ECSA lineage reintroduction in the northeasternmost region of Brazil. *Int J Infect Dis [Internet]*. 2021 Apr;105:120–3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.01.026>
12. Silva SJR da, Magalhães JJF de, Pena L. Simultaneous Circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an Inconvenient Truth. *One Heal*. 2021 Jun 1;12.
13. dos Passos Cunha M, Ortiz-Baez AS, de Melo Freire CC, de Andrade Zanotto PM. Codon adaptation biases among sylvatic and urban genotypes of Dengue virus type 2. *Infect Genet Evol*. 2018 Oct 1;64:207–11.
14. Saúde S de vigilância em SM da S. Monitoramento dos casos de arboviroses pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya urbanas causados por vírus transmitidos e zika), semanas epidemiológicas 1 a 25, 2021. *Boletim Epidemiológico* 25. 2021;52:1–44.
15. St. John AL, Gubler DJ. Dengue Viruses (Flaviviridae). In: *Encyclopedia of Virology [Internet]*. Elsevier; 2021. p. 218–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128145159000151>
16. Pollett S, Melendrez MC, Maljkovic Berry I, Duchêne S, Salje H, Cummings DAT, et al. Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018.
17. Palomares-Reyes C, Silva-Caso W, del Valle LJ, Aguilar-Luis MA, Weilg C, Martins-Luna J, et al. Dengue diagnosis in an endemic area of Peru:

Clinical characteristics and positive frequencies by RT-PCR and serology for NS1, IgM, and IgG. *Int J Infect Dis*. 2019;

18. Wilder-Smith A, Ooi EE, Horstick O, Wills B. Dengue. Vol. 393, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2019. p. 350–63.

19. Carvalho S. Caracterização molecular de vírus do dengue sorotipo-1 e desenvolvimento de cDNA infeccioso. *Defesa* [Internet]. 2009;112. Available from: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/8225>

20. Hasan S, Jamdar S, Alalowi M, Al Ageel Al Beajji S. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *J Int Soc Prev Community Dent* [Internet]. 2016;6(1):1. Available from: <http://www.jispcd.org/text.asp?2016/6/1/1/175416>

21. Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Med (Ribeirão Preto)* [Internet]. 1999 Mar 30;32(1):15–20. Available from: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/7749>

22. Nogueira RMR, Zagner SMO, Martins ISM, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1991 Jun [cited 2019 Jul 12];86(2):269–269. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761991000200018&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761991000200018&lng=en&tlng=en)

23. Dick OB, San Martín JL, Montoya RH, Del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. Vol. 87, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012. p. 584–93.

24. Hermann G. Schatzmayr, Hermann G, Rita Maria R. Nogueira, R. RM, Amélia P. A. Travassos, P., A. da Rosa A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. 1986;81:107–8.

25. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB de, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2001 Oct [cited 2019 Jul 12];96(7):925–6. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762001000700007&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762001000700007&lng=en&tlng=en)

26. de Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, et al. Dengue Virus Type 4 Phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the Veil. Powers AM, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2011 Dec 27 [cited 2019 Jul 12];5(12):e1439. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001439>

27. Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB de A, de Lima CPS, Carvalho VL, et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*. 2012 Nov;18(11):1858–64.

28. Maria A, Menezes F. Perfil epidemiológico da dengue no Brasil entre os anos de 2010 à 2019 Epidemiological profile of dengue in Brazil between 2010 and 2019. *Brazilian J Heal Rev*. v.4, n.3:13047–58.

29. Figueiredo F, Iii A, Maria V, Passos DA, Ii MC. Aumento da carga de dengue no Brasil e unidades federadas , 2000 e 2015 : análise do Global Burden of Disease Study 2015. *Rev Bras Epidemiol*. 2017;20 (Supl:205–16.

30. Coordenação-Geral de Emergências em Saúde Pública (CGEMSP/DSATE/SVS)\* Sumário. Vigilância em Saúde: monitoramento das manchas de óleo no litoral do Nordeste. *Bol Epidemiológico* 32. 2019;50.

31. Coordenação-Geral de Vigilância das Arboviroses do Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis da Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 31, 2021. *Bol Epidemiológico* 03. 2021;03:1–20.

32. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes. *Bol Epidemiológico* 44 [Internet]. 2021;52:1–10. Available from: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2021/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_36.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_36.pdf)



33. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. *Bol Epidemiológico* 17. 2022;53.

34. Teixeira M da G, Costa M da CN, Barreto ML, Barreto FR. Epidemiologia do dengue em Salvador-Bahia, 1995-1999. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2001 Jun;34(3):269–74. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822001000300007&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822001000300007&lng=pt&tlng=pt)

35. Mendes JS, Meliani PF, Spanghero PESF. DENGUE NA BAHIA ANÁLISE DA DINÂMICA ESPAÇOTEMPORAL NO PERÍODO DE 2001 A 2010. *CAMINHOS Geogr -revista online*. 2017;v. 18 n. 6:1–14.

36. Melo MSS, Barreto FR, Costa M da CN, Morato VC, Teixeira MG. Progression of dengue virus circulation in the State of Bahia, Brazil, 1994-2000. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2):139–44.

37. Saúde M da, Sistema. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. *Sist Nac Vigilância em Saúde Relatório Situação Bahia*. 2011;5ª edição:1–39.

38. Calado DC. Incidência dos casos de dengue ( 2007-2013 ) e distribuição sazonal de culicídeos ( 2012-2013 ) em Barreiras , Bahia \*. 2013;25(4):735–44. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822001000300007&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822001000300007&lng=pt&tlng=pt)

39. Tarcísio Erundino Silva RSB. ESPACIALIZAÇÃO EM MAPAS DOS CASOS DE DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA VÍRUS NA CIDADE DE BARREIRAS-BA-BRASIL. *Rev Geogr*. 2018;V. 35(3):235–47.

40. Cunha M dos P, Santos CA dos, Neto DF de L, Schanoski AS, Pour SZ, Passos SD, et al. Outbreak of chikungunya virus in a vulnerable population of Sergipe, Brazil—A molecular and serological survey. *J Clin Virol* [Internet]. 2017 Dec 1;97:44–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653217302913>

41. Maeda AY, Nogueira JS, Campos KR, Camargo CH, da Silva Vasami FG, Arvigo APB, et al. Circulation of Chikungunya virus East-Central-

South African genotype during the 2020–21 outbreak in São Paulo State, Brazil. *J Clin Virol Plus* [Internet]. 2022 Jun;2(2):100070. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcvp.2022.100070>

42. Moreira TP. Implementação de um modelo murino de infecção pelo Chikungunya virus para o estudo da patogênese e identificação de potenciais alvos terapêuticos. In: Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Microbiologia. 2018. p. 108.

43. Weaver SC. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol* [Internet]. 2013 Aug;21(8):360–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003>

44. Xavier J, Fonseca V, Bezerra JF, do Monte Alves M, Mares-Guia MA, Claro IM, et al. Chikungunya virus ECSA lineage reintroduction in the northeasternmost region of Brazil. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2021 Apr;105:120–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971221000370>

45. CHOMZYNSKI P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156–9.

46. Wagner D, de With K, Huzly D, Hufert F, Weidmann M, Breisinger S, et al. Nosocomial acquisition of dengue. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2004 Oct;10(10):1872–3. Available from: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/10/03-1037\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/10/03-1037_article.htm)

47. Costa CA da, Santos IGC Dos, Barbosa M da G. [Detection and typing of dengue viruses in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the City of Manaus, State of Amazonas]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2009;42(6):677–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209354>

48. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam A V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using

reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(3):545–51.

49. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232–9.

50. Patel P, Abd El Wahed A, Faye O, Prüger P, Kaiser M, Thaloengsok S, et al. A Field-Deployable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of the Chikungunya Virus. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016;10(9):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004953>

51. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Hanley KA, Buenemann M, et al. Patterns of a sylvatic yellow fever virus amplification in southeastern Senegal, 2010. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(6):1003–13.

52. Tesh RB, Higgs S, Hausser NL, Thangamani S, Kochel TJ, Ziegler SA, et al. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2011 Oct 1;85(4):750–7. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.2011.11-0359>

53. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G-J, Vorndamt AV. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. Vol. 30, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* 1992.

54. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinforma Appl* [Internet]. 2014;30(22):3276–8. Available from: <http://orm-bunkar.se/aliview>

55. Stapleford KA, Moratorio G, Henningsson R, Chen R, Matheus S, Enfissi A. Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. 2022;1–9.

56. Beynon RJ, Doherty MK, Pratt JM, Gaskell SJ. Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat Methods* [Internet]. 2005 Aug 21;2(8):587–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nmeth774>

57. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research* [Internet]. 2018 Aug 24;7:1338. Available from: <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.1>

58. Li H. New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. Alkan C, editor. *Bioinformatics* [Internet]. 2021 Dec 7;37(23):4572–4. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab705>

59. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Birol I, editor. *Bioinformatics* [Internet]. 2018 Sep 15;34(18):3094–100. Available from: <https://github.com/ruanjue/smartdenovo>;

60. Rose R, Golosova O, Sukhomlinov D, Tiunov A, Prospero M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. Available from: <http://ugene.net/>,

61. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013 Apr;30(4):772–80.

62. Katoh K, Standley DM. Article Fast Track MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/30/4/772/1073398>

63. Nguyen L-T, Schmidt HA, Haeseler A von, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268–74.

64. Nguyen L-T, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/32/1/268/2925592>

65. Andrew Rambaut, Tommy T. Lam, Luiz Max Carvalho and OG, Pybus. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* May;2(1).

66. Brasil. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e

zika), semanas epidemiológicas 1 a 42, 2021. Bol Epidemiológico Arboviroses. 2021;52(24):1–20.

67. Lessa-Aquino C, Trinta KS, Pestana CP, Ribeiro MO, Sucupira MVF, Boia MN, et al. Detection of East/Central/South African genotype Chikungunya virus during an outbreak in a southeastern state of Brazil. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2018 Dec 5;146(16):2056–8. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268818002467/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268818002467/type/journal_article)

68. Azevedo R do S da S, Oliveira CS, Vasconcelos PF da C. Chikungunya risk for Brazil. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2015;49:58. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102015000100509&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102015000100509&lng=en&tlng=en)