



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**



**ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DAS
ARBOVIROSES E ASSOCIAÇÃO COM ÍNDICES VETORIAIS EM
ÁREAS ENDÊMICAS DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

SÊMILLY SUÉLEN DA SILVA SOUSA

São Luís - MA

2024

SÊMILLY SUÉLEN DA SILVA SOUSA

**ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DAS
ARBOVIROSES E ASSOCIAÇÃO COM ÍNDICES VETORIAIS EM
ÁREAS ENDÊMICAS DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, como requisito final para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro

Coorientadora: Prof. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz

SÃO LUÍS – MA

OUTUBRO/2024

S725e Sousa, Sêmilly Suélen da Silva

Estudo clínico-epidemiológico e laboratorial das arboviroses e associação com índices vetoriais em áreas endêmicas do estado do Maranhão, Brasil / Sêmilly Suélen da Silva Sousa. __Caxias: Campus Caxias, 2024.

112f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Maranhão – Campus Caxias, Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Rede BIONORTE.

Orientadora: Prof^a. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz.

1. Arboviroses. 2. Detecção viral. 3. Índices larvários. 4. Caracterização epidemiológica. I. Título.

CDU 616.98

SÊMILLY SUÉLEN DA SILVA SOUSA

**ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DAS
ARBOVIROSES E ASSOCIAÇÃO COM ÍNDICES VETORIAIS EM
ÁREAS ENDÊMICAS DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE,
na Universidade Estadual do Maranhão - UEMA,
como requisito final para a obtenção do Título de
Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 9 /10/ 2024

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 VALERIA CRISTINA SOARES PINHEIRO
Data: 15/01/2025 14:18:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA, Campus Caxias

Documento assinado digitalmente
 LÍDIO GONÇALVES LIMA NETO
Data: 18/12/2024 16:30:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto
Centro Universitário do Maranhão (UNICEUMA)

Documento assinado digitalmente
 JOAQUIM PINTO NUNES NETO
Data: 10/12/2024 11:14:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto
Instituto Evandro Chagas-IEC

Documento assinado digitalmente
 ELIANA VIEIRA PINTO DA SILVA
Data: 10/12/2024 09:55:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Eliana Vieira Pinto Da Silva
Instituto Evandro Chagas-IEC

Documento assinado digitalmente
 BRUNO TARDELLI DINIZ NUNES
Data: 12/12/2024 09:07:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Tardelli Diniz Nunes
Instituto Evandro Chagas-IEC

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, SÊMILLY SUÉLEN DA SILVA SOUSA, (X) autorizo () não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada **“ESTUDO CLINICO-EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES E ASSOCIAÇÃO COM ÍNDICES VETORIAIS EM ÁREAS ENDÊMICAS DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL”** no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Local/Data: São Luís, 9 de outubro de 2024.



Documento assinado digitalmente

SEMILLY SUELEN DA SILVA SOUSA

Data: 09/12/2024 21:17:06-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sêmilly Suélen da Silva Sousa

Dedico este trabalho à minha filha, Sophia Isabelle Sousa Melo, que mesmo tão pequena, sempre foi muito compreensiva e apoiadora. Você é o combustível diário para todo meu esforço e dedicação. Eu te amo muito!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo cuidado constante e por sempre estar comigo, me confortando, fortalecendo e concedendo do seu amor, graça e misericórdia.

À minha orientadora, Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro, por todo apoio orientação e ensinamentos valiosos que a mim foram/são repassados, pela preocupação e pela forma pertinente que tem acompanhado e contribuído com a realização deste trabalho. Muito obrigada por cada crítica construtiva, conversas e reflexões, que por muitas vezes foram injeções de realidade, necessárias e também incentivadoras, quando eu achava que não daria conta. Cada palavra foi fundamental para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Sou eternamente grata por todo aprendizado e convivência, desde a graduação até aqui.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz, agradeço pelo apoio para que este trabalho fosse desenvolvido, por ter me recebido em estágio no Instituto Evandro Chagas e pelos esclarecimentos sempre que necessário. Muito obrigada por toda ajuda!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pelo incentivo concedido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) no âmbito do Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em saúde (PPSUS) pelo financiamento do projeto que viabilizou o desenvolvimento desta tese.

Às Secretarias de Saúde dos municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus do Maranhão, pelo pronto atendimento e auxílio na concessão dos dados. Em especial à secretaria de saúde de Caxias, Dra. Monica Melo, à coordenadora da vigilância epidemiológica Verônica Aragão, e às enfermeiras Carla Fernanda, Bruna Beleza, Maria Conceição Vilanova e à técnica dona Graça por toda colaboração.

À Universidade Estadual do Maranhão - Campus Caxias, pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho.

À Profa. Dra. Carine Aragão que sempre esteve disponível para esclarecer as minhas dúvidas, desde a escrita inicial até a prática, que me acompanhou no IEC e me ensinou boa parte da realização das técnicas, muito obrigada por cada áudio explicativo, por cada retorno e por todo apoio e companhia! Que Deus a abençoe intimamente mais!

Ao técnico do IEC, Wilson Rosa Júnior, pelo apoio com a manipulação das amostras e por toda ajuda com a identificação;

Ao Prof. Dr. Joaquim, por ter gentilmente me recebido e dado todo suporte quando fui pela primeira vez ao IEC e também por colaborar com nosso trabalho;

À Glennda, pela companhia, parceria e por toda ajuda e apoio na realização das técnicas;

Ao Dr. Sandro Patroca, por todo apoio e paciência na realização do sequenciamento;

À minha filha e grande amor da minha vida, minha Sophia Melo, que mesmo tão pequena, me apoia e entende as minhas muitas ausências. Eu amo você!

Ao meu esposo Dênis Melo por me apoiar, me acompanhar nas coletas e, principalmente, por me ajudar com a Sophia. Muito obrigada, meu amor!

Aos meus pais, João e Inalda, eu louvo a Deus pela vida de vocês, sou grata por todos os ensinamentos, apoio, amor, confiança e orações. As palavras de fé de vocês são bálsamo do céu para acalmar o meu coração em momentos de preocupação. Eu amo muito vocês!

À minha avó Sebastiana, muito obrigada por ser essa mulher de Deus que sempre orou e ora por mim, a sua força, fé e determinação me inspiram. Eu te amo, minha rainha!

Às minhas irmãs Sâmia e Sarah, por cada conversa, apoio e incentivo. Eu amo vocês!

A toda equipe do Laboratório de Entomologia Médica – LABEM, pela parceria e apoio, em especial à Katiane, à Aylane e à Juliete, parceiras do doutorado, à Max e ao Judson pelas conversas descontraídas e animadoras. À Karen e ao Dr. Romário por toda ajuda na execução do trabalho, às maravilhosas Profa. Dra. Suely, Profa. Dra. Rosinha, e à querida Tamires, por toda preocupação, apoio e amizade;

Ao Sr. Francisco Leonardo pela colaboração nas vistas às regionais dos municípios e pela solicitude de sempre;

Aos meus amigos e irmãos em Cristo, Werverton e João Paulo, que compreensivelmente e sem relutar me cobriam quando eu não podia ir à EBD (Escola Bíblica Dominical) ministrar aula para os jovens, porque precisava ficar em casa estudando. Que Deus retribua esse favor infinitamente mais na vida e ministério de vocês.

Às minhas companheiras do Departamento Infantil da igreja, sempre compreensivas e auxiliadoras. Eu louvo a Deus pela vida de vocês, Arletinha, Marta, Paloma, Jay, Rayra, Marcus e Vandinha! Que o Altíssimo os abençoe copiosamente.

Sou grata a Deus pela vida de todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização dessa pesquisa. Peço a Deus que abençoe poderosamente a vida e a família de cada um.

Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a Ele seja a glória na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém!

Efésios 3:20,21

RESUMO

SOUSA, Sêmilly Suêlen da Silva. Estudo clínico-epidemiológico e laboratorial das arboviroses e associação com índices vetoriais em áreas endêmicas do Estado do Maranhão, Brasil. 2024. 113f. Tese. (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE) Universidade Estadual do Maranhão., São Luís, 2024

As arboviroses urbanas transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* são endêmicas no Brasil, e apesar de serem preveníveis ainda registram elevado número de casos e causam óbitos. Possuem sintomas semelhantes, o que dificulta o diagnóstico clínico preciso. Objetivou-se realizar o estudo clínico-epidemiológico e laboratorial das arboviroses com a utilização de técnicas de biologia molecular e associar os aspectos epidemiológicos das arboviroses com índices vetoriais de *Aedes aegypti* de áreas endêmicas do Maranhão. Foram realizadas coletas de sangue venoso em indivíduos com suspeita de arboviroses dos municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus do Maranhão nos meses de janeiro a julho de 2019 (Caxias) e de fevereiro a junho de 2022. As amostras foram submetidas à extração de RNA e depois, testadas por RT-qPCR para investigação de infecção por *Orthoflavivirus denguei* (DENV-1 a 4), *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV) e *Chikungunya virus* (CHIKV). Utilizou-se o cultivo celular para a tentativa do isolamento viral, a fim de realizar posterior sequenciamento nucleotídico. Foram analisadas 171 amostras humanas, sendo que, 72 apresentaram positividade, das quais 68 (39,7%) eram de Caxias; 2 (1,1%) de Codó; 1 (0,6%) de Peritoró; e 1 (0,6%) de São Mateus. Um total de 58 amostras (85, 3%) positivas corresponderam à infecções causadas por DENV-1, 4 (quatro) (5,9%) por DENV-2, uma (1) (1,5%) por DENV- 3 e em 6 (seis) (7,3%) amostras foi detectada a presença de CHIKV, sendo uma coinfeção causada por DENV-1 e CHIKV observada em Caxias. O genótipo V do DENV-1 foi constatado em quatro amostras analisadas e o genótipo ECSA do CHIKV em uma amostra. O maior número de amostras humanas coletadas e positivas foi obtido em Caxias, onde houve a detecção de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e CHIKV, confirmando a circulação desses vírus no interior do Maranhão. A caracterização dos pacientes positivos mostrou que os homens, pardos, na faixa etária de 5 a 9 anos, e os moradores da zona urbana foram os mais acometidos por arboviroses. A febre foi o sintoma mais frequente em ambos os sexos, seguida por cefaleia em homens e mialgia seguida por náusea em mulheres. O maior número de casos positivos em Caxias, foi observado na Vila Paraíso, seguido pela Nova Caxias e Seriema bairros periféricos da cidade. O DENV-3 foi detectado no bairro Vila São José (Caxias-MA). Houve efeito positivo do LIRAA sobre a incidência de dengue ($r^2 = 0,0352$; $p = 0,0062$) no Maranhão. Todos os municípios do estado que em algum ciclo de 2022 apresentaram índices de infestação de *Ae. aegypti* em situação de alerta ou alto risco, também exibiram elevadas incidências de dengue ou de chikungunya. A pesquisa evidencia a importância da realização de mais estudos de monitoramento virológico, entomológico e epidemiológico que forneçam um panorama da situação das arboviroses nas áreas onde são endêmicas e favoreçam a elaboração de medidas preventivas eficazes que efetivamente colaborem com o controle e a redução dos surtos e epidemias dessas doenças.

Palavras chave: Arboviroses; Detecção Viral; Índices larvários; Caracterização epidemiológica.

ABSTRACT

SOUSA, Semilly Suélen da Silva. Clinical, epidemiological and laboratory study of arboviruses and association with vector indices in endemic areas of the State of Maranhão, Brazil. 2024. 113 f. Thesis. (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology- BIONORTE Network) State University of Maranhão., São Luís, 2024.

The main arboviral diseases registered in Brazil are dengue, chikungunya and zika, transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito. They have similar symptoms, which makes accurate clinical diagnosis difficult. The objective was to conduct a clinical-epidemiological and laboratory study of arboviruses using molecular biology techniques and to associate the epidemiological aspects of arboviruses with vector indices of *Aedes aegypti* from endemic areas of Maranhão. Venous blood samples were collected from individuals with suspected arboviruses in the municipalities of Caxias, Codó, Peritoró, and São Mateus do Maranhão from January to July 2019 (Caxias) and from February to June 2022. Samples were subjected to RNA extraction and then tested by RT-qPCR to investigate infection by dengue (DENV-1 to 4), Zika (ZIKV), and Chikungunya (CHIKV) viruses. Positive samples were inoculated into cell culture to isolate the virus and increase the viral load for subsequent nucleotide sequencing. A total of 171 human samples were analyzed, of which 72 were positive, 68 (39.7%) from Caxias; two (2) (1.1%) from Codó; one (1) (0.6%) from Peritoró; and one (1) (0.6%) from São Mateus. A total of 58 positive samples (85.3%) corresponded to infections caused by DENV-1, 4 (5.9%) by DENV-2, one (1) (1.5%) by DENV-3 and in 6 (7.3%) samples, the presence of CHIKV was detected, being a co-infection caused by DENV-1 and CHIKV observed in Caxias. DENV-1 genotype V was detected in four samples analyzed and CHIKV ECSA genotype was detected in one sample. The largest number of human positive samples collected was obtained in Caxias, where DENV-1, DENV-2, DENV-3 and CHIKV were detected, confirming the circulation of these viruses in the interior of Maranhão. The characterization of positive patients showed that males, brown skin, aged 5 to 9 years, and residents of urban areas were the most affected by arboviruses. Fever was the most frequent symptom in both sexes, followed by headache in men and myalgia and nausea in women. The highest number of positive cases in Caxias was observed in Vila Paraíso, followed by Nova Caxias and Seriema peripheral neighborhoods of the city. DENV-3 was detected in the Vila São José neighborhood (Caxias-MA). There was a positive effect of LIRAA on the incidence of dengue ($r^2 = 0.0352$; $p = 0.0062$) in Maranhão. All municipalities in the state that in any cycle of 2022 presented infestation rates of *Ae. aegypti* in a situation of alert or high risk, also exhibited high incidences of dengue or chikungunya. The research highlights the importance of carrying out more virological, entomological and epidemiological monitoring studies that provide an overview of the situation of arboviruses in areas where they are endemic and favor the development of effective preventive measures that effectively collaborate with the control and reduction of outbreaks and epidemics of these diseases.

Keywords: Arboviruses; Viral Detection; Larval Indices; Epidemiological Characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema estrutural de um <i>Orthoflavivirus</i>	20
Figura 2 - Representação esquemática do genoma dos <i>Orthoflavivirus</i> .	21
Figura 3 - Estrutura do vírus Chikungunya.	23
Figura 4 - Mosquito <i>Aedes aegypti</i> adulto	29
Figura 5 - Mapa do Maranhão evidenciando para os municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus do Maranhão	37
Figura 6 - Extração do RNA viral em amostras humanas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará	40
Figura 7 - Realização da técnica de RT- qPCR em amostras humanas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará	42
Figura 8 - Curvas de amplificação de RT-qPCR indicando as amostras positivas para DENV-1 do município de Caxias, Maranhão, mostrando os seus respectivos valores de CT	51
Figura 9 - Curva de amplificação de RT-qPCR indicando a amostra do município de Caxias, Maranhão, positiva o vírus Chikungunya, mostrando o seu respectivo valor de CT	51
Figura 10 - Curvas de amplificação de RT-qPCR indicando as amostras do município de Caxias, Maranhão, positivas para o vírus Dengue 2, mostrando os seus respectivos valores de CT	52
Figura 11 - Curva de amplificação de RT-qPCR indicando a amostra do município de Caxias, Maranhão, positiva para o vírus Dengue 3, mostrando o seu respectivo valor de CT	52
Figura 12 - Árvore Filogenética de diferentes cepas de vírus pertencentes ao DENV1	56
Figura 13 - Árvore Filogenética de diferentes cepas de vírus pertencentes ao CHIKV	57
Figura 14 - Número de casos positivos para o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e CHIKV	58
Figura 15 - Número de casos positivos para o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e CHIKV por faixa Etária	60
Figura 16 - Número de casos positivos por sintoma e por gênero	60
Figura 17 - Número de casos por dia de sintomas de coleta por sorotipo causador	61
Figura 18 - Distribuição espacial da incidência de dengue no Estado do Maranhão, 2022	62
Figura 19 - Número de casos positivos detectados por bairro do município de Caxias em 2019 e em 2022	63
Figura 20 - Análise de regressão simples do LIRAA sobre a Incidência de dengue no Maranhão em 2022	64
Figura 21 - Análises de validação dos resíduos	65

Figura 22 - Casos notificados de dengue, variáveis climáticas e LIRAA dos municípios do Maranhão em 2022	66
Figura 23 - Valores das análises para validação do modelo	67
Figura 24 - Casos notificados de dengue, variáveis climáticas e LIRAA de Caxias em 2022	68

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos genótipos do DENV e suas distribuições geográficas	22
Quadro 2 – Componentes da mistura de reação do ensaio <i>multiplex</i> de RT-qPCR para detecção de DENV	41
Quadro 3 – Componentes da mistura de reação do ensaio <i>singleplex</i> de RT-qPCR para detecção de ZIKV	41
Quadro 4 – Componentes da mistura de reação do ensaio <i>singleplex</i> de RT-qPCR para detecção de CHIKV.	42
Quadro 5 – Iniciadores e sondas utilizadas no ensaio RT-qPCR para detecção de DENV	43
Quadro 6 –Iniciadores e sondas utilizadas no ensaio RT-qPCR para detecção de CHIKV	43
Quadro 7 – Iniciadores e sondas utilizadas no ensaio RT-qPCR para detecção de ZIKV	43
Tabela 1 - Número de amostras clínicas analisadas e positivas para a presença de arbovírus, por ano e por município	50
Tabela 2 - Número de amostras clínicas positivas por município de origem e por arbovírus detectado	50
Tabela 3 - Valores de C_T obtidos nas amostras oriundas dos municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus, positivas pelo teste RT-qPCR	53
Tabela 4 - Amostras humanas submetidas ao isolamento viral em células C6/36	54
Tabela 5 - Métricas de dados gerados por amostra	55
Tabela 6 - Frequências absolutas e relativas, dos casos confirmados de dengue em Caxias. Codó, Peritoró e São Mateus do Maranhão, em 2019 e em 2022	59
Tabela 7 - Dados do LIRAa dos municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus do período de 2020 a 2022	65
Tabela 8 - Relação da incidência com as preditoras ambientais	66
Tabela 9 - Correlação entre o número de casos de casos prováveis de dengue e variáveis climáticas do município de Caxias, Maranhão, no período de 2020 a 2022	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC	Critério de Informação de Akaike de primeira ordem
AVL	Reagente de Tampão
AW1	Tampão de lavagem 1
AW2	Tampão de lavagem 2
CHIKV	Vírus Chikungunya
°C	Grau Celsius
DENV	Vírus da dengue
DATASUS	Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde
DCZ	Dengue, Zika e Chikungunya
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
ECP	Efeito Citopático
ECSA	Genótipo do Centro-Leste-Sul-Africano
G	Gravidade
IGM	Imunoglobulina M
IB	Índice de Breteau
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescência Indireta
IIP	Índice de Infestação Predial
ITR	Índice de Tipo de Recipiente
LISA	Local Indicators of Spatial Association
MAYV	Vírus Mayaro
ML	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
NM	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
RT-qPCR	Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNC	Sistema Nervoso Central
SSE	Secretaria de Saúde do Estado
SUS	Sistema Único de Saúde
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema de Agravos e Notificações
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
ATLE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
UVZ	Unidade de Vigilância em Zoonoses
UL	Microlitro
WHO	World Health Organization
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Virus Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVO GERAL:.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 ARBOVÍRUS DE IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA.....	19
2.1.1 <i>Orthoflavivirus</i>	20
2.1.2 <i>Alphavirus</i>	27
2.2 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DAS ARBOVIROSES URBANAS NO BRASIL.....	24
2.2.1 Dengue	24
2.2.2 Chikungunya.....	26
2.2.3 Zika	27
2.3 BIOECOLOGIA DE <i>Aedes aegypti</i> : PRINCIPAL VETOR DE ARBOVÍRUS NO BRASIL	28
2.4 CICLO DE TRANSMISSÃO DOS ARBOVÍRUS DENV, CHIKV E ZIKV	30
2.5 INDICADORES DE INFESTAÇÃO DE <i>Aedes aegypti</i>	31
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES.....	32
2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE ÀS ARBOVIROSES	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 ÁREA DE ESTUDO	36
3.2 PROCEDIMENTOS ÉTICOS E LEGAIS.....	37
3.3 AMOSTRAGEM.....	37
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO PARA A COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	38
3.5 COLETA DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS.....	38
3.6 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	38
3.7 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL E RT-qPCR	39
3.8 CULTIVO CELULAR CLONE C6/36	43
3.8.1 Isolamento viral em C6/ 36	44
3.8.2 Imunofluorescência Indireta (IFI).....	44
3.9 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	45
3.9.1 Extração do RNA, síntese do cDNA, preparo da biblioteca e sequenciamento.....	45
3.9.2 Montagem do genoma e análise filogenética	45
3.10 COLETA DOS DADOS DO LIRA, CLIMÁTICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	46
3.11 ANÁLISE DOS DADOS	47
3.11.1 Análise dos dados epidemiológicos e climáticos.....	47

3.11.2 Análises do LIRAa.....	48
4 RESULTADOS	50
4.1 ANÁLISE DE AMOSTRAS COM SUSPEITAS DE INFECÇÃO POR DENV, CHIKV E ZIKV	50
4.2 ISOLAMENTO VIRAL E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO	54
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES COM INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS	58
4.3.1 Distribuição espacial da incidência de dengue no estado do Maranhão e em Caxias.....	61
4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE O LIRAa E OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DENGUE.....	63
4.4.1 Análise do LIRAa sobre a incidência de dengue no Maranhão em 2022..	63
4.4.2 Análise de dengue, LIRAa e variáveis climáticas	66
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	89
APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	91
ANEXO 1 - Artigo 1.....	94
ANEXO 2 - Artigo 2.....	102

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são importantes problemas de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais, devido a vários fatores que favorecem a transmissão e a replicação dos vírus que as causam (VIANA *et al.*, 2018). O crescimento populacional, as mudanças climáticas, a urbanização não planejada, e a expansão geográfica do vetor, favorecem a disseminação e permanência dos arbovírus no ambiente ocasionando infecções de espectro preocupante (GIRARD *et al.*, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2020; TAJUDEEN *et al.*, 2021).

Os arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes) são responsáveis pela ocorrência de vários surtos, com milhões de pessoas afetadas em diferentes países, na última década (ESPINAL *et al.*, 2019; HUANG, HIGGS; LANDINGHAM, 2019). O Brasil está entre os países mais atingidos do mundo, sendo que a grande maioria dos arbovírus circulantes no país, constituem-se sério problema econômico de saúde global ou regional, em decorrência do expressivo número de casos anuais e a debilidade que provocam nas pessoas infectadas (LETA *et al.*, 2018; THOMPSON; DEL CAMPO; CONSTENALA, 2020).

Dentre os arbovírus que circulam em território brasileiro, destacam-se os pertencentes aos gêneros *Orthoflavivirus* e *Alphavirus*, os quais, são transmitidos ao homem em ciclos urbanos, principalmente, por mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) infectados. (BRASIL, 2019; WHO, 2020). *Orthoflavivirus denguei* (vírus da dengue - DENV) e *Orthoflavivirus zikaense* (vírus Zika - ZIKV) pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Orthoflavivirus*, enquanto *Alphavirus chikungunya* (vírus Chikungunya - CHIKV) pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* (WILDER-SMITH *et al.*, 2017). Outros arbovírus de importância epidemiológica, corresponde à *Orthoflavivirus flavi* (vírus da Febre amarela - YFV), um *orthoflavivirus* também transmitido por *Ae. aegypti* no ciclo urbano, que porém, não apresenta registro de casos desde a década de 40; e o vírus Mayaro (MAYV; *Togaviridae*), que depois do CHIKV é o mais importante *Alphavirus* em circulação no Brasil (ROMERO - ALVAREZ, 2018).

O DENV é considerado o *Orthoflavivirus* de maior impacto no Brasil, devido ao elevado número de casos e óbitos de dengue registrados anualmente (WHO, 2020). Nos últimos anos, ocorreram importantes epidemias dessa doença, marcadas principalmente pela mudança do perfil epidemiológico da população, emergência e re-emergências de diferentes sorotipos em diversas regiões do país, e pelo aumento no quantitativo de casos graves (DONALÍSIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017; BRASIL, 2019; BRASIL; 2022).

Não obstante ao problema causado pela dengue; em 2014, a febre chikungunya teve os primeiros casos registrados no Brasil, no município de Oiapoque, Estado do Amapá (Região

Norte) e em Feira de Santana na Bahia (Região Nordeste) (NUNES *et al.*, 2015). Em 2015, a febre Zika foi detectada no país ocasionando o maior surto da história dessa doença, quando atingiu grandes proporções, principalmente no nordeste brasileiro (FANTINATO *et al.*, 2016).

No Estado do Maranhão, foram registradas 1.381 notificações de dengue em 2021 e 7.369 em 2022, o que corresponde a um aumento de 434% (5.988), com 5.412 casos confirmados. A febre chikungunya, só em 2022 foi responsável pelo registro de 2.295 notificações da doença no Estado com 1.619 confirmações. Tratando-se da febre zika, 296 casos prováveis foram registrados no Maranhão em 2022, e 28 confirmados. o equivalente a um aumento de 240 casos (429%) em comparação com o ano anterior. Neste mesmo período, nos municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus, situados no interior do Maranhão, foram notificados 233, 47, 1 e 18 casos prováveis de dengue, respectivamente (MARANHÃO, SSE - MA/BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 52/2022).

Os sintomas dessas três arboviroses urbanas são semelhantes, o que dificulta a suspeita inicial pelo profissional de saúde, e pode em algum grau, dificultar a adoção do manejo clínico adequado, e predispor a ocorrência de formas graves, levando eventualmente a óbitos (CALVO *et al.*, 2016; DONALÍSIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; PORTILHO, LIMA e CAIRES, 2022). Além disso, a circulação dos quatro sorotipos de DENV, associada a co-circulação do ZIKV e CHIKV, favorecem a ocorrência de coinfeções, e também de equívocos no diagnóstico, o que desperta para a necessidade de mais investigações sobre o perfil clínico-epidemiológico e laboratorial dos pacientes destas áreas (DE SOUSA *et al.*, 2020). A situação é agravada considerando-se que as dificuldades de diagnóstico em todo país (BRASIL, 2020).

Aliado a estes obstáculos e inerentes às infecções virais, verifica-se a falta de terapia específica, que posterga o tratamento das arboviroses ao controle sintomático das manifestações clínicas, e a possibilidade de reação cruzada na sorologia IgM (Imunoglobulina M) entre o DENV e o ZIKV, método mais utilizado no país para identificação de arbovírus (BRASIL, 2016).

Essas circunstâncias combinadas com a precariedade do atendimento à saúde no Nordeste do Brasil, justificam a necessidade de mais estudos direcionados ao monitoramento da circulação de arbovírus urbanos em diferentes áreas, principalmente, em locais com grande quantidade de pessoas vivendo em condições inópias, e onde há subnotificação de casos, o que impossibilita o conhecimento da real situação epidemiológica das arboviroses ocorrentes nestas áreas.

Outro agravante, relaciona-se a ampla distribuição do vetor *Ae. aegypti* em território brasileiro, cujo controle ainda se constitui um desafio para os serviços de vigilância entomológica. Na mesma proporção de importância estão os fatores impactantes

socioeconômicos, pelo enorme encargo na manutenção da cadeia produtiva, pelo definhamento dos pacientes e o elevado grau de afastamento de suas atividades básicas, ocasionando um grande prejuízo às regiões afetadas (LOPES; ROSAWA; LINHARES, 2014).

Acredita-se que, a ocorrência de infecções por DENV, CHIKV e ZIKV em pacientes atendidos pela rede pública de saúde do Maranhão, seja maior do que os registros disponíveis, e a associação dos dados epidemiológicos com os índices vetoriais pode fornecer um panorama da situação e favorecer a adoção de medidas preventivas eficientes.

Nesse sentido, estudos que verifiquem a circulação desses arbovírus são importantes antes da ocorrência de epidemias, com o intuito de evitá-las. Ao passo que, a detecção precoce específica da infecção e o acesso a cuidados médicos adequados reduzem as taxas de mortalidade para menos de 1%, sendo, portanto, fundamental para a determinação da conduta médica adequada (OPAS, 2019). A utilização das técnicas moleculares, junto a associação com os índices larvários, bem como a elucidação dos fatores epidemiológicos, é imprescindível para a melhoria das estratégias auxiliares na detecção de arbovírus de importância médica e para a prevenção às arboviroses urbanas nos municípios endêmicos.

Nesta perspectiva, objetivou-se realizar o estudo clínico-epidemiológico e laboratorial das arboviroses urbanas com a utilização de técnicas de biologia molecular para detecção de arbovírus, associar os índices larvários com os dados de dengue e climáticos e caracterizar o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes infectados. Os dados gerados serão importantes para mostrar os arbovírus circulantes e fortalecer as vigilâncias nas ações de prevenção, contribuindo assim com a redução dos casos de arboviroses e da grande demanda na rede pública de saúde.

1.1 OBJETIVO GERAL:

✓ Realizar o estudo clínico-epidemiológico e laboratorial dos pacientes acometidos por arboviroses urbanas e associar os dados com os índices vetoriais em áreas endêmicas do Estado do Maranhão, Brasil.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Investigar a presença de *Orthoflavivirus denguei*, *Orthoflavivirus zikaense* e *Alphavirus chikungunya* em amostras com suspeitas de infecção;
- ✓ Caracterizar a sequência genômica das amostras positivas;
- ✓ Caracterizar o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes que apresentarem resultado positivo para infecção por arbovírus;
- ✓ Associar os aspectos epidemiológicos da dengue com os índices vetorial predial de *Aedes aegypti* (LIRAA), e os dados da dengue e do LIRAA com as variáveis climáticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ARBOVÍRUS DE IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA

Um arbovírus (*Arthropod-borne virus*) é um vírus que pode ser transmitido pela picada de um artrópode (animal invertebrado) para outros animais ou seres humanos (RUST, 2012). No entanto, recebem esta designação não apenas pela veiculação através de artrópodes, mas, principalmente, porque parte de seu ciclo replicativo ocorre no corpo dos insetos (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Estima-se que existam mais de 545 espécies de arbovírus, sendo mais de 150 relacionadas à doenças em seres humanos, e a maioria zoonótica (GLUBER, 2001; CLETON *et al.* 2012). Esses vírus são mantidos na natureza por meio de transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos, ou entre hospedeiros artrópodes por via transovariana e/ou venérea (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). São capazes de se reproduzir em hospedeiros vertebrados, multiplicar-se em tecidos de artrópodes e após um período de incubação extrínseco, serem transmitidos a novos vertebrados suscetíveis pela hematofagia desses insetos (WHO, 1988).

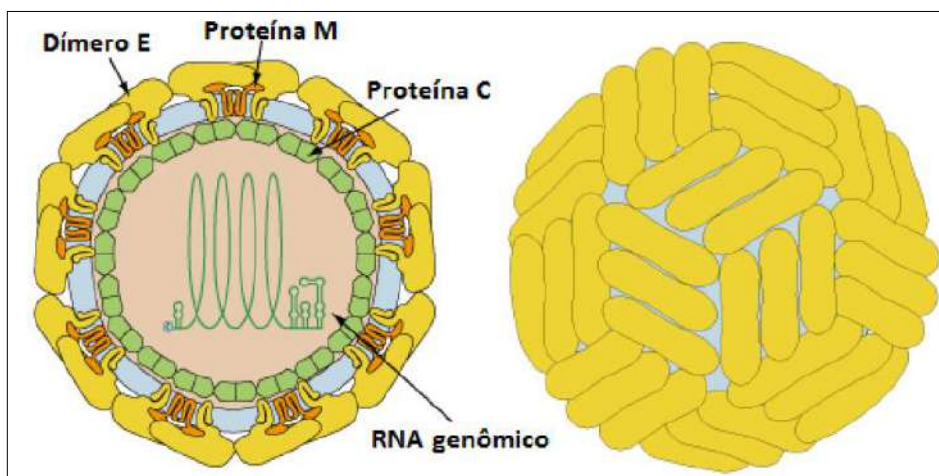
Atualmente, são conhecidas aproximadamente sete famílias virais que abrigam arbovírus capazes de infectar humanos e animais (*Peribunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Sedoreoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Asfaviridae* e *Phenuiviridae*) e, que, por esse motivo, têm se tornado importantes na saúde pública (CRUZ e VASCONCELOS, 2008; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; VASILAKIS *et al.*, 2019). Os arbovírus clinicamente mais significativos pertencem aos gêneros *Orthoflavivirus* (membro da família *Flaviviridae*) e *Alphavirus* (membro da família *Togaviridae*) (GO; BALASURIYA; LEE, 2014).

Os *Orthoflavivirus* DENV, ZIKV, YFV, e os *Alphavirus* CHIKV e MAYV, estão entre os arbovírus mais epidêmicos em humanos nas últimas décadas (GOULD *et al.*, 2017), sendo que, o DENV, CHIKV e ZIKV são considerados os vírus mais importantes no cenário global (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). No contexto epidemiológico brasileiro esses arbovírus aparecem como os de maior circulação, por terem encontrado condições ambientais favoráveis no país, e, principalmente, pela notável capacidade de adaptação que possuem atrelada a possibilidade de emergirem e se estabelecerem em novas áreas geográficas (DONALÍSIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017).

2.1.1 *Orthoflavivirus*

O gênero *Orthoflavivirus*, pertence à família *Flaviviridae* e é composto por 53 espécies virais, incluindo patógenos humanos importantes como o DENV, ZIKV, o *Orthoflavivirus nilense* (Virus do Oeste do Nilo - WVN) e o *Orthoflavivirus japonicum* (Virus da Encefalite Japonesa - JEV) (GOULD *et al.*, 2004; ICTV, 2023). São vírus de RNA de aproximadamente 11 kilobases (Kb) de tamanho, que possuem um Capsídeo (C) com simetria icosaédrica esférica, envolto por um envelope viral constituído por uma bicamada lipídica, com aproximadamente 40 a 60 nanômetros (nm) de diâmetro, onde estão implantadas pequenas proteínas de membrana (M) e espículas de natureza glicoproteica (E) (THERKELSEN *et al.*, 2018; ICTV, 2023) (Figura 1). A glicoproteína estrutural E é responsável pelo reconhecimento celular e pela promoção da entrada, que é mediada por um processo de fusão entre o envelope viral e a membrana celular, enquanto as proteínas NS (do inglês, Non Structural) auxiliam na replicação do genoma viral (LINDENBACH, 2022).

Figura 1- Esquema estrutural de um *Orthoflavivirus*.



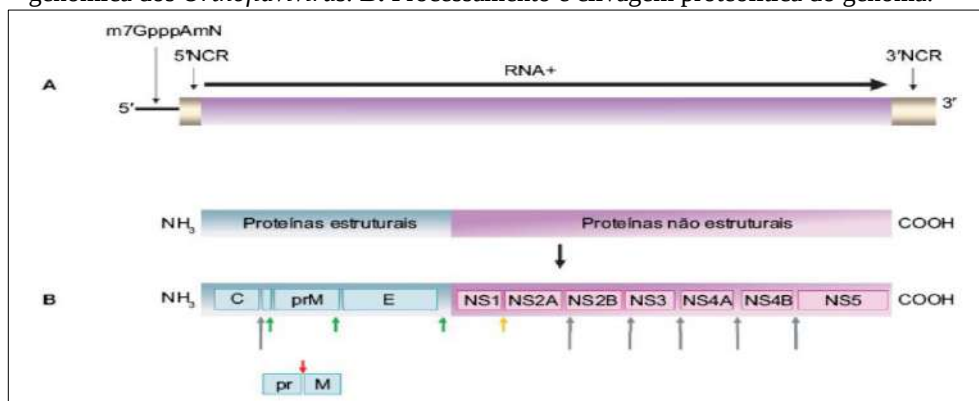
Fonte: Zhang *et al.*, 2003.

O genoma dos *Orthoflavivirus* caracteriza-se por possuir uma única sequência de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) que codifica as proteínas virais, que é flanqueada por duas regiões não codificantes (NCR, *noncoding region*) de tamanho variável, sendo uma grande denominada de 3' NCR, e uma pequena, 5' NCR. As regiões não codificantes são importantes para a regulação e a expressão do vírus (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015) (Figura 2).

O DENV é o mais importante *Orthoflavivirus* estudado, seu genoma é constituído por um RNA de fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 10 kb (kilobases), com a extremidade 5' capeada, mas não apresentando a extremidade 3' poliadenilada. Possui uma

única sequência aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) com 10.233 nucleotídeos (nt) que codificam as proteínas virais, que é flanqueada por duas NCR, necessárias à regulação e a expressão do vírus (HENCHAL e PUTNAK, 1990).

Figura 2 - Representação esquemática do genoma dos *Orthoflavivirus*. **A.** Organização genômica dos *Orthoflavivirus*. **B.** Processamento e clivagem proteolítica do genoma.



Fonte: Santos; Romanos; Wigg, 2015.

O genoma viral codifica para três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína do envelope pré-M, precursora de M e a proteína E. Além destas, o genoma codifica sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que desempenham funções reguladoras e de expressão do vírus, como a replicação, virulência e patogenicidade (SANTOS *et al.*, 2002; SLONCZEWSKI; FOSTER, 2010; REY; STIASNY; HEINZ, 2017; ICTV, 2023).

As primeiras células infectadas, após a inoculação viral que ocorre através da picada do mosquito, são as células dendríticas na pele (células de Langerhans). Inicia-se a replicação na porta de entrada e posterior migração para os linfonodos. A seguir, o vírus atinge a corrente sanguínea (viremia) provocando a fase febril aguda, que dura, geralmente, de dois a sete dias (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Os vírus são capazes de induzir a morte de células não infectadas, de modo que, em um paciente com dengue, são inicialmente observadas petéquias (pontos hemorrágicos) espalhadas pelo corpo e plaquetopenia, seguida por uma leucocitose (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Os quatro sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) apresentam características antigênicas distintas e estão divididos em 20 genótipos, os quais, por sua vez, foram definidos por Rico-Hesse (1990), como o agrupamento de DENV que não tem divergência nucleotídica superior a 6% na sequência (LINDENBACH *et al.*, 2007; HARAPAN *et al.*, 2020). A divisão dos genótipos por sorotipos de DENV, bem como a distribuição geográfica de cada um é apresentada no quadro 1.

Quadro 1. Classificação dos genótipos do DENV e suas distribuições geográficas.

Sorotipo	Genótipo	Distribuição
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China e África Oriental
	II	Tailândia (entre 1950 e 1960)
	III	Silvestre coletada na Malásia e cepa malaia 36.046 (2005)
	IV	Ilhas do Pacífico Ocidental e da Austrália
	V	Américas, África Ocidental e algumas cepas da Ásia
DENV-2	asiático 1	Malásia e Tailândia
	asiático 2	Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Ampla distribuição
	Americano	América Latina, Caribe, subcontinente indiano e ilhas do Pacífico
	asiático americano	Tailândia e do Vietnã e cepas coletadas nas Américas
	Silvestre	África Ocidental e no Sudeste Asiático
DENV-3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas e ilhas do Pacífico Sul
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Sri Lanka, Índia, África e Samoa e cepas de 1962 da Tailândia
	IV	Porto Rico, América Latina e Central e a cepa 1965 Tahiti
	V	Filipinas, Japão, China e Brasil
DENV-4	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão
	II	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Cepas tailandesas que são distintas de outros isolados tailandeses
	IV	Silvestres da Malásia

Fonte: Chen e Vasilakis, 2011, com adaptações.

No Brasil, circulam simultaneamente os quatro sorotipos virais da dengue, com mais ênfase para os sorotipos 1 e 2. O genótipo do sorotipo 2 mais predominante é o genótipo 3, também conhecido como genótipo asiático-americano e o genótipo V de DENV-1 é o mais prevalente em território nacional (BRASIL/COE, 2024).

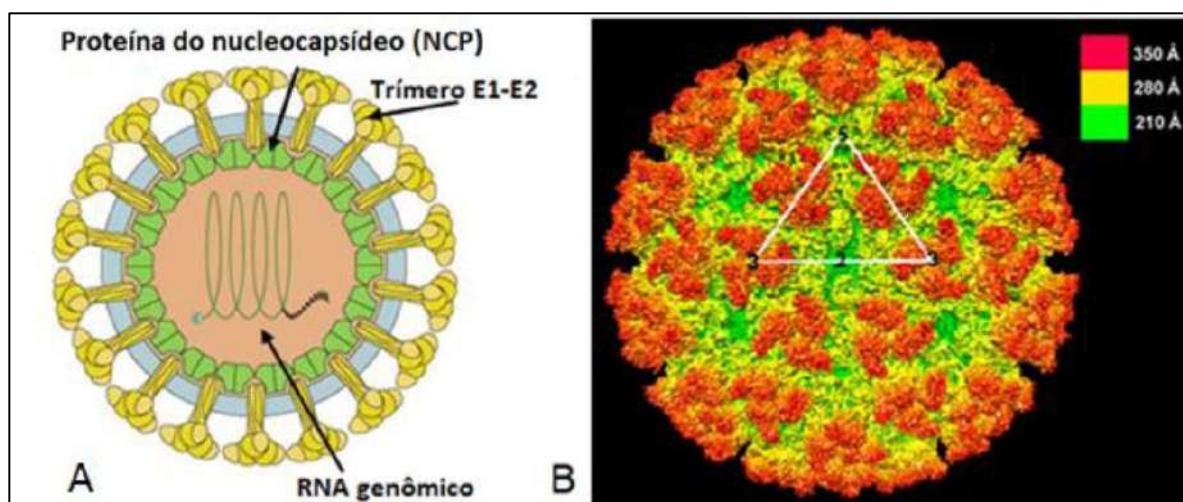
Quanto ao ZIKV, seu genoma possui estrutura semelhante a de outros *Orthoflavivirus* conhecidos, como por exemplo, o DENV (SIROHI *et al.*, 2016). Contém 10.794 nucleotídeos codificando 3.419 aminoácidos, composto por 2 regiões não codificantes (5' e 3') que flanqueiam um quadro de leitura aberto, que codifica uma poliproteína clivada no capsídeo, precursora de membrana, envelope e 7 proteínas não estruturais (KUNO e CHANG, 2007). Esse vírus apresenta um sorotipo viral com duas linhagens reconhecidas: a asiática e a africana, porém, até o momento, somente a asiática tem causado infecções no Brasil (GATHERER e KOHL, 2016; SUN *et al.*, 2017).

2.1.2 *Alphavirus*

O grupo dos *Alphavirus* pertence à família *Togaviridae* e compreende 30 espécies virais que, do ponto de vista clínico podem ser divididos em dois grupos: os vírus associados à encefalite (predominantemente os *Alphavirus* do Novo Mundo) e os vírus associados à exantema e poliartrite (os vírus do Velho Mundo) (WEAVER *et al.*, 2015). Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Alphavirus* que podem causar comprometimento das articulações em humanos no Brasil, destaca-se o CHIKV, membro do grupo dos vírus artritogênicos, provocou casos de meningoencefalite (primariamente em neonatos) e doença hemorrágica durante os surtos recentes. Há indícios de que o CHIKV infecte células do Sistema Nervoso Central (SNC), especificamente, as células do plexo coroide (SANTOS; ROMANO; WIGG., 2015).

As partículas virais de CHIKV possuem envelope lipoproteico contendo espículas de glicoproteínas virais, capsídeo de simetria icosaédrica e medem cerca de 60 a 70 nm de diâmetro (Figura 3). O seu genoma é constituído de RNA de fita simples de polaridade positiva (RNAfs+) de aproximadamente 11,8 kb. A terminação 5' do RNA genômico é capeada e a terminação 3' é poliadenilada; possui 2 sequências de ORF contidas entre NTR 5' e 3', de 76 nt. (SUN *et al.*, 2013).

Figura 3 - Estrutura do vírus Chikungunya. **A:** Esquema geral de um *Alphavirus*, adaptado de Viralzone (2016). **B:** Criomicroscopia eletrônica (crio- ME) de partículas semelhantes a CHIKV (virus-like particles - VLPs), ectodomínio colorido de acordo com a distância radial a partir do centro do vírus.



Fonte: Sun *et al.*, 2013.

A ORF contida na terminação 5' é traduzida a partir do RNA genômico e codifica uma poliproteína precursora de quatro proteínas não estruturais (NSP1-NSP4). A segunda ORF é traduzida a partir do RNA subgenômico 26S em uma poliproteína precursora das proteínas estruturais: a proteína de capsídeo; duas glicoproteínas de envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos denominados E3 e 6k. A organização genômica segue a ordem 5'-NSP1-NSP2-

NSP3-NSP4-C-E3-E2-6k-E1-poli (A)-3'. O CHIKV possui quatro genótipos: da África Oriental-Central-Sul (ECSA), da África Ocidental, da Ásia e da Linhagem do Oceano Índico (IOL), sendo que estes dois últimos derivaram da ECSA (LEPARC- GOFFART *et al.*, 2014). No Brasil, até o momento foram detectadas as linhagens, asiática e ECSA (PETERSEN; POWERS, 2016).

2.2 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DAS ARBOVIROSES URBANAS NO BRASIL

As arboviroses constituem-se um grande problema para a saúde pública, devido a uma série de fatores, que vão desde a diversidade de agentes infecciosos envolvidos e a pluralidade de manifestações clínicas, até a inexistência de apoio laboratorial suficiente. Outros fatores, estão relacionados à inexistência de medidas profiláticas para a maioria das infecções e dificuldades para o desenvolvimento de medidas sanitárias e educativas eficazes.

Por conseguinte, as arboviroses causadas por vírus transmitidos pelo mosquito *Ae. aegypti* têm se constituído um dos principais desafios para os serviços de saúde no mundo, sendo a dengue, de maior relevância no continente americano (OPAS, 2019). No Brasil, as arboviroses urbanas fazem parte de um cenário epidemiológico complexo, sobretudo, devido a simultânea circulação dos quatro sorotipos virais da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV- 4), a partir de 2014, do CHIKV e, em 2015, do ZIKV (BRASIL, 2020).

2.2.1 Dengue

A dengue é a arbovirose urbana mais globalizada e prevalente no Brasil. Apresenta crescimento crítico nos últimos 50 anos, e se manifesta como um grave problema para saúde pública. Cerca de metade da população mundial está em risco de infecção por dengue, com estimativas de 400 milhões de pessoas infectadas e 22.000 mortes registradas anualmente (JONES *et al.*, 2020). É uma doença febril, causada por um vírus pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Orthoflavivirus*, que possui quatro subtipos virais, DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV- 4 (GONÇALVES *et al.*, 2014).

O DENV foi isolado em camundongos, em 1943, por Kimura e Hotta, e por Sabin e Schlesinger, em 1944, resultando no isolamento dos dois primeiros sorotipos, DENV-1 e DENV-2. Em 1956, durante uma epidemia que ocorreu nas Filipinas, o DENV-3 e DENV-4 foram isolados (HAMMON *et al.*, 1960; KIMURA; HOTTA, 1994).

Segundo o Ministério da Saúde (MS) do Brasil, o primeiro registro do DENV no país, confirmado laboratorialmente, aconteceu em Boa Vista, Roraima, em 1981-1982, causado pelos vírus DENV-1 e DENV- 4 (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997). Em 1989, o DENV-

2 foi isolado pela primeira vez no país, de um caso importado de Uganda, na África (SCHATZMAYR *et al.*, 1986). Em 1990, o primeiro surto autóctone de DENV-2 foi observado no Estado do Rio de Janeiro (ZAGNE *et al.*, 1994).

Em 2000, o DENV-3 foi isolado no Estado de São Paulo a partir de um caso importado (ROCCO; KAVAKAMA; SANTOS, 2001). Um ano após a sua introdução no Brasil, esse vírus causou um grande surto de dengue no estado do Rio de Janeiro e rapidamente se espalhou para vários outros estados da federação. Desta vez, vários estados do Sul do país apresentaram as primeiras infecções da doença, sendo a maioria em pessoas com mais de 15 anos de idade (BRASIL, 2017; OPAS, 2019).

Endêmica no Brasil, a dengue provoca significativo impacto econômico e social. No período de 2003 a 2019 foram notificados 11.137.664 casos prováveis da doença no país (BRASIL, 2019). Em 2022, a dengue sozinha foi responsável pelo registro de 1.450.270 casos prováveis, alcançando uma incidência de 679,9 casos por 100 mil habitantes. Neste mesmo ano, houve o registro de 1.473 casos de dengue grave, 18.145 casos de dengue com sinais de alarme, e a confirmação de 1.016 óbitos em território brasileiro (BRASIL, 2022). A elevação da dengue continuou em 2023, quando atingiu 1.623.772 notificações, e em 2024, que só no primeiro semestre, registrou a maior notificação da doença, alcançando mais de 6 milhões de casos, com registro de 4.591 óbitos e a circulação dos quatro sorotipos (BRASIL, 2023; 2024; WHO, 2024).

Desde as primeiras epidemias de dengue no Brasil, o Maranhão sempre mostrou número elevado de notificações. No período de 1986 até 2015 registrou o equivalente a 166 casos fatais da doença (GUERRA NUNES *et al.*, 2019; BRASIL, 2020). Em 2020, foram notificados 2.603 casos de dengue no Estado (incidência de 35,6 por 100 mil habitantes). Em 2021 foram registrados 1.367 casos e em 2022, mesmo com os esforços dos setores de saúde para evitar os surtos, 7.369 casos de dengue foram notificados, sofrendo uma redução em 2023 com o registro de 5.012 notificações e 10 óbitos (BRASIL/MS, 2021; 2022; 2023). Em 2024, até o mês de novembro, o número de casos prováveis aumentou para 11.208 e 18 óbitos (BRASIL/MS, 2024).

A dengue é a arbovirose que mais afeta o ser humano, pode ser assintomática, ou manifestar sintomas característicos: febre alta, mal-estar, cefaleia, dor nas articulações, dentre outros (BRASIL, 2017; DE SOUSA *et al.*, 2021). A identificação precisa do sorotipo causador da infecção, pode ser feita apenas por meio da avaliação de um profissional de saúde devidamente habilitado, e mediante exames específicos. É válido destacar que, quando uma pessoa é infectada por um sorotipo (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV- 4), ela adquire imunidade definitiva a ele (FORATINNI, 2002; BRASIL, 2019) e proteção de curto prazo

contra todos os outros sorotipos por 1 a 3 anos, além de subsequente proteção contra doenças mais graves (OPAS, 2014; SOO *et al.*, 2016).

No Brasil, a circulação dos quatro tipos de DENV e a alternância ou substituição do sorotipo predominante em uma área, determina o caráter endêmico ou epidêmico da doença. Em 2009, houve a substituição de DENV-2 por DENV-1 como sorotipo predominante; em 2013 ocorreu uma das maiores epidemias no país causada pelo DENV-1 e DENV-4. Em 2015, o DENV-2 re-emergiu e, em 2016, o DENV-1 foi associado a maioria dos casos registrados (NEPOMUCENO e BACHUR, 2021). Todos os DENV podem causar a forma grave da doença e levar à óbito, contudo, os riscos de uma manifestação mais severa aumentam em infecções sequenciais (OPAS, 2014; BRASIL, 2019).

A partir de 2014, o MS brasileiro começou a adotar a nova classificação dos casos de dengue estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que desde então, passou a se apresentar como: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave, mediante a evolução da doença (WHO, 2014).

O período de incubação da dengue é de dois a sete dias (BRASIL, 2019). Após este período o indivíduo infectado tende a apresentar os seguintes sintomas: febre alta (39° a 40°), de início abrupto, seguida de cefaleia, mialgia, prostração, artralgia, entre outros (BRASIL, 2013). Os efeitos da doença podem ser fatais quando desenvolvem sintomas sistêmicos mais graves, incluindo vazamento capilar, hemorragia e choque (KHETARPAL; KHANNA, 2016).

Nesse sentido, considerando-se que os municípios brasileiros vêm sofrendo há anos com sucessivas epidemias de dengue, que ressurgem em ciclos sazonais, principalmente em decorrência do caráter endêmico da doença e do clima favorável para o seu desenvolvimento no país, é necessário que haja compreensão de sua dinâmica em cada localidade, a fim de que sejam implementadas ações que intervenham na cadeia de transmissão e favoreçam o tratamento da doença, na tentativa de diminuir a ocorrência de surtos e de evitar mortes por dengue (CASTRO; NUNES, 2017).

2.2.2 Chikungunya

A febre chikungunya é uma arbovirose tropical causada por um vírus originário da África, pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. O nome “Chikungunya” pode ser traduzido como “doença que dobra as articulações”, referindo-se à postura desencadeada pela artralgia crônica persistente e artrite que provoca nos indivíduos infectados (POWERS e LOGUE, 2007; WEAVER, 2018). Os primeiros sintomas da doença são caracterizados pelo aparecimento de febre alta de início súbito, dores no corpo, cefaleia, dor articular intensa, e

erupções cutâneas, que podem desencadear um estágio agudo e crônico, resultando em poliartralgia, muitas vezes debilitante para os pacientes (SOUZA, 2016; SUCHOWIECKI *et al.*, 2021).

O primeiro caso relatado de chikungunya nas Américas ocorreu em dezembro de 2013, em Saint Martin (SAHADEO *et al.*, 2017). Até janeiro de 2015, a infecção por CHIKV havia sido identificada em 42 países ou territórios no Caribe, América Central, América do Sul e América do Norte (transmissão local na Flórida), com mais de um milhão de casos suspeitos relatados e mais de 25.000 confirmados em laboratório (OPAS, 2015). Em 2019, foram relatados 171 casos de CHIKV associados à viajantes dos Estados Unidos e dois casos autóctones em Porto Rico (CDC, 2019).

No Brasil, desde os primeiros casos autóctones de chikungunya notificados em 2014 no Amapá e na Bahia, todos os anos há registros dessa arbovirose (BRASIL, 2014). Em 2022 ocorreram 174.517 casos prováveis da doença (taxa de incidência de 81,8 casos por 100 mil habitantes) e em 2024, até o mês de agosto, esse número aumentou para 254.170 casos prováveis, com 168 óbitos confirmados (BRASIL, 2022; 2024). No Maranhão, quarto maior estado do Nordeste em população, só em 2022, foram registradas 2.295 notificações da doença, com 1.619 casos confirmados (BRASIL/MS, 2022). Em 2023, foram registrados 2.972 casos prováveis e 973 no primeiro semestre de 2024 (BRASIL, 2023; 2024).

Embora a chikungunya raramente seja fatal, podem ocorrer outros problemas relacionados à infecção, como: neurológicos, dermatológicos e complicações, principalmente em crianças, idosos e naqueles com condições crônicas de saúde ou sistema imunológico debilitado (SILVA *et al.*, 2018). A artropatia desenvolvida tem um efeito considerável na qualidade de vida dos indivíduos com doença crônica e resulta em perdas econômicas, especialmente nos países subdesenvolvidos (BARTHOLOMEEUSEN *et al.*, 2023). Considerando o tratamento puramente sintomático, a identificação precoce da circulação viral, pode atuar como mecanismo decisivo em uma situação de surtos e epidemias.

2.2.3 Zika

O ZIKV foi primeiramente isolado em 1947, no sangue de macacos da floresta Zika na Uganda, localizada na África (CDC, 2016). Pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Orthoflavivirus*, este vírus compreende patógenos virais responsáveis por causar doenças e óbitos em seres humanos e animais (GOULD *et al.*, 2004; ICTV, 2023).

No Brasil, o primeiro surto de febre Zika ocorreu em 3 de maio de 2015, quando causou intensa manifestação na região Nordeste (BRASIL, 2015). No entanto, é provável que o ZIKV tenha circulado no país por mais de um ano antes de ser detectado. Além disso, acredita-se que

o surto brasileiro provavelmente tenha se originado a partir de uma única introdução do vírus nas Américas, em meados de 2013, durante a Copa das Confederações, e desde então, todos os anos ocorrem notificações (FARIA *et al.*, 2016).

Apesar da ocorrência de casos autóctones no Brasil, no ano de 2015, nenhum óbito por zika foi confirmado neste ano (BRASIL, 2015). Contudo, no período de 2016 a 2019, foram confirmados 21 óbitos da doença no país, sobretudo em crianças (BRASIL, 2020). As notificações aumentaram em 2022, quando houve o registro de 9.204 casos prováveis de zika (incidência de 4,3 casos por 100 mil habitantes), o que representa um crescimento de 42,0% no número de casos quando comparado com o ano de 2021 (BRASIL, 2022). Em 2023 e em 2024 foram notificados 11.534 e 7.766 casos prováveis de Zika no Brasil, respectivamente. Neste último ano, 317 notificações foram feitas no Maranhão somente no primeiro semestre (BRASIL/MS, 2023; 2024).

Aproximadamente 80% das infecções causadas pelo ZIKV são assintomáticas. Quando presentes, os sintomas mais comuns são manchas na pele (ou *rash*) maculopapulares pruriginosas ou não, febre baixa, artralgias, dores nas articulações, conjuntivite não purulenta, mialgias, dores musculares, cefaleia e dor retroorbital (PAHO, 2017). Existem ainda sintomas adicionais e raramente observados, como: náuseas, diarreia, ulceração da mucosa, dor abdominal, prurido e trombocitopenia (PLOURDE e BLOCH, 2016).

Com exceção de fetos e recém-nascidos, manifestações severas e letalidade em decorrência do ZIKV são geralmente baixas. Os sintomas da febre zika passam geralmente de 2 a 7 dias (OPAS, 2024). As principais complicações associadas à infecção pelo ZIKV estão relacionadas aos danos neurológicos causados no feto, isso porque este vírus é capaz de atravessar a barreira materno-placentária e infectar o indivíduo em formação, causando principalmente a microcefalia, a mais grave manifestação clínica da doença (MARINHO *et al.*, 2017; CARRERA *et al.*, 2021). É válido mencionar que, a síndrome congênita associada a infecção pelo vírus pode comprometer o crescimento e o desenvolvimento neurocognitivo, motor, sensorial e odontológico, e levar a incapacidades ou a morte (FREITAS *et al.*, 2020).

Outras ocorrências como calcificações cerebrais e restrição do crescimento fetal foram frequentemente detectadas (BRASIL *et al.*, 2016). Cientificamente há uma concordância de que, o vírus zika também provoca a síndrome de Guillain-Barré, além de outras complicações neurológicas ainda em investigação (OPAS, 2023).

2.3 BIOECOLOGIA DE *Aedes aegypti*: PRINCIPAL VETOR DE ARBOVÍRUS NO BRASIL

O mosquito *Ae. aegypti* é responsável pela transmissão do maior número de arbovírus nas Américas e está presente em quase todos os países do hemisfério, sendo considerado o principal vetor de dengue, chikungunya e zika no Brasil (OPAS, 2023).

Originário da África e descrito no Egito, *Ae. aegypti* pertence à ordem Diptera, família Culicidae, e subgênero *Stegomyia* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; VASCONCELOS, 2015). O adulto possui cerca de 1 centímetro de comprimento, apresenta cor que varia do marrom-escuro ao preto e escamas brancas e prateadas pelo corpo, no tórax estas manchas estão dispostas em linhas longitudinais formando um desenho semelhante a uma “lira” (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994; FORATTINI, 2002).

Possivelmente a introdução de *Ae. aegypti* no Brasil ocorreu entre os séculos XVI e XIX, durante o tráfico negreiro que ocorreu no período colonial (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; ZARA *et al.*, 2016). Esta espécie tropical, ao encontrar condições climáticas e geográficas favoráveis, teve sua proliferação facilitada e acelerada em território brasileiro (LIMA-CAMARA, 2016).

Ae. aegypti possui desenvolvimento holometábolo, caracterizado pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto, com ciclo de vida curto variando entre oito a 12 dias (MURRAY; QUAM; WILDER, 2013). Em condições ambientais que propiciam sua sobrevivência, os adultos vivem em média 30 a 35 dias (Figura 4) (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Figura 4- Mosquito *Aedes aegypti* adulto.



Fonte: Elaborada pela autora.

As fêmeas desta espécie são hematófagas e se alimentam preferencialmente de sangue humano, necessário à maturação dos ovos (ANJOLETTE; MACORIS, 2016). No momento da picada, caso esteja infectado, o mosquito transmitirá o arbovírus para o hospedeiro. Entre 48h a 72h após o repasto sanguíneo, as fêmeas colocam seus ovos nas paredes internas de recipientes com água acumulada, próximos à lâmina d'água (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os ovos de *Ae. aegypti* medem cerca de um milímetro de comprimento e são morfológicamente alongados e fusiformes (FORATTINI, 2002). Estes ovos, são resistentes à dessecação e capazes de permanecer viáveis por até 450 dias mesmo sem contato com a água. Esta resistência dos ovos se apresenta com um dos principais obstáculos para o controle de *Ae. aegypti*, por facilitar a dispersão passiva da espécie (SOARES PINHEIRO *et al.*, 2016).

As larvas vivem na água, alimentam-se de partículas orgânicas nela presentes, em um ciclo que dura em torno de cinco a sete dias (FORATTINI, 2002). Na fase de pupa não ocorre a ingestão de alimentos, porém esta, apresenta mobilidade e após dois ou três dias ocorre a emergência do alado (CASTRO JUNIOR *et al.*, 2013). Dependendo das condições de temperatura, o ciclo de vida pode ocorrer mais rápido ou mais lentamente, pois abaixo de 20°C este período se torna mais extenso (BRASIL/FUNASA, 2001; BRASIL/DIVE, 2007).

O curto ciclo de vida do *Ae. aegypti* lhe confere alta fecundidade, facilidade de adaptação a diferentes ambientes e tendência a depositar ovos em locais inespecíficos, além de possuir fase aquática e terrestre, estão entre os métodos mais importantes que a espécie utiliza para sobreviver e se dispersar (OPAS, 2023). Desse modo, a prevenção e o controle das arboviroses dengue, chikungunya e zika estão intimamente relacionadas com as medidas intersetoriais direcionadas para o controle do vetor.

2.4 CICLO DE TRANSMISSÃO DOS ARBOVÍRUS DENV, CHIKV E ZIKV

Embora os arbovírus sejam transmitidos por picadas de artrópodes, outros modos de transmissão têm se destacado nos últimos dez anos (DESGRAUPES *et al.*, 2021). A transmissão do DENV inicia-se quando a fêmea de *Ae. aegypti* se contamina ao picar um indivíduo infectado que se encontra na fase virêmica da doença, tornando-se, após um período de incubação extrínseca que dura de oito a 12 dias, capaz de transmitir o vírus por toda sua vida no momento do repasto sanguíneo (GONÇALVES *et al.*, 2014; SOUSA, 2015).

Assim como acontece com o DENV, a principal de via de transmissão do CHIKV ocorre pela picada de fêmeas dos mosquitos *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus* infectados, contudo, também foi constatada perspectiva de transmissão vertical durante a gestação (GERARDIN *et al.*, 2008).

Após a picada, inicia-se a fase pré-aguda, primeira fase da infecção provocada pelo CHIKV através da transferência do vírus para o tecido humano. Então, uma resposta inflamatória imediata é desencadeada por macrófagos teciduais e mastócitos que atraem neutrófilos para o local da infecção (SRIVASTAVA *et al.*, 2020).

Em relação ao ZIKV, além do ciclo clássico que envolve vetores como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, também existem outras formas de transmissão, como a propagação direta entre seres humanos que foi documentada por vias perinatal, sexual e através da transfusão de sangue; este último, embora raramente, também ocorre no caso de dengue e chikungunya. O ZIKV pode passar de uma mãe infectada para o feto durante a gestação, evidenciado não apenas pela detecção de RNA viral no líquido amniótico (CALVET *et al.*, 2016) e no soro de gestantes, mas também por sondagem de RNA viral, proteínas ou partículas no cérebro, placenta ou soro de recém-nascidos com microcefalia (SONG *et al.*, 2017).

Há relatos da transmissão de um homem para sua parceira, que em período gestacional, transmitiu para o seu bebê, o qual apresentou viremia por 67 dias após o nascimento (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Os sintomas da febre Zika, após a transmissão sexual iniciam-se, em média em 13 dias (MOREIRA *et al.*, 2017). Contudo, embora a transmissão de outros *Orthoflavivirus* pela amamentação já tenha sido descrita anteriormente (BARTHEL *et al.*, 2013), a passagem do ZIKV através da amamentação ainda não é amplamente aceita. As recomendações da OMS para amamentação até os primeiros meses de vida permanecem válidas mesmo no contexto atual da transmissão do ZIKV.

2.5 INDICADORES DE INFESTAÇÃO DE *Aedes aegypti*

A circulação dos arbovírus DENV, CHIKV e ZIKV tem suscitado desafios importantes para o Brasil em função do aparecimento de formas graves atípicas e das incertezas diante da insuficiente compreensão sobre as repercussões clínicas em situações de hiperendemicidade, incluindo infecções sequenciais e coinfeção pelos três arbovírus (DONALISIO; FREITAS, 2015).

A sobreposição de sinais e sintomas clínicos apresentados pelas arboviroses associada às limitações do diagnóstico diferencial, têm sido um agravante neste crítico quadro epidemiológico, no qual, a busca por estratégias mais efetivas de vigilância e controle, centradas sobretudo, no vetor *Ae. aegypti*, devem ser elaboradas, com o intuito de conter este problema de grande relevância para a saúde pública (BRASIL, 2016).

De maneira geral, a principal resposta técnica dos programas municipais de controle do vetor, tem como base a realização de pesquisas larvárias domiciliares para fins de

monitoramento e como subsídio ao controle da infestação de mosquitos *Aedes*. Para a obtenção de indicadores entomológicos de forma rápida e oportuna, utiliza-se o Levantamento de Índice Rápido para *Ae. aegypti* (LIRAA) (BRASIL, 2017).

O LIRAA foi desenvolvido pelo MS em 2002, e consiste em um inquérito amostral de imóveis, no qual o Índice de Infestação Predial (IIP) obtido, é usado como referência para definir áreas prioritárias para receberem intervenções. Sua relevância tem destaque nas Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue, sendo considerado para identificar áreas mais infestadas, uma vez que, os estados e municípios elaboram suas estratégias de controle de transmissão da dengue e de outras arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti*, os resultados do LIRAA (BRASIL, 2019).

Além da amostragem de imóveis para identificação e eliminação de focos, a metodologia do LIRAA, se baseia também na caracterização de criadouros predominantes e sinalização do risco de transmissão das arboviroses (BRASIL, 2019). Durante as visitas aos imóveis sorteados são realizadas coletas de larvas nos criadouros identificados, cuja contagem permite a obtenção do IIP, do Índice de Breteau (IB) e Índice de Tipo de Recipiente (ITR). É a partir do IIP que os estratos, unidade territorial de análise do LIRAA, são classificados segundo situação de risco de transmissão: satisfatório (baixo risco) quando o índice é menor ou igual a 0,9%, alerta (médio risco) com valores entre 1,0% e 3,9%, e alto risco com valor acima de 3,9% (BRASIL, 2013).

Esses dados visam otimizar e direcionar estrategicamente as ações de controle do vetor, proporcionando uma delimitação eficaz das áreas de risco entomológico. Além disso, o LIRAA possibilita a avaliação de metodologias de controle, contribuindo significativamente para as atividades de comunicação e mobilização. A ampla divulgação dos resultados dos índices, tanto para parceiros internos quanto externos, incluindo a população, promove a conscientização e engajamento (BRASIL, 2024).

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES

O diagnóstico laboratorial das arboviroses desempenha papel fundamental na vigilância epidemiológica, sobretudo, durante surtos e epidemias, uma vez que atua no apoio ao diagnóstico clínico, servindo assim como auxílio aos médicos na identificação do agente etiológico que potencialmente está causando a doença no paciente.

Em relação à dengue, o diagnóstico laboratorial pode ser realizado por métodos sorológicos (pesquisa de imunoglobulina M - IgM e pesquisa de NS1), virológicos (isolamento viral e RT-PCR) e por exames anatomopatológicos (BRASIL, 2020).

O diagnóstico laboratorial da dengue é realizado para confirmação da doença e monitoramento dos sorotipos circulantes, e se constitui indispensável para a diferenciação entre a dengue e outras arboviroses, devido às semelhanças clínicas que estas doenças apresentam. Desse modo, métodos laboratoriais podem fornecer a confirmação sorológica, identificação viral e oferecer suporte para investigações epidemiológicas (FREIRE *et al.*, 2023).

Os testes sorológicos identificam na amostra de soro analisada a presença de anticorpos contra o DENV, ou seja, confirmam a presença de anticorpo imunoglobulina G (IgG) em amostras pareadas e exames inespecíficos como hematócrito e plaquetometria para pacientes com manifestações hemorrágicas. Os métodos sorológicos como inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, imunofluorescência e ensaio imunoenzimático (EIA) podem ser usados para a pesquisa de anticorpos. A IgM específica para o vírus pode ser detectada por EIA em média a partir do 5º dia da doença e persiste por várias semanas até 3 meses. A IgG específica é detectada na fase convalescente e persiste por anos. Contudo, a sensibilidade dos testes sorológicos é baixa, sendo possível que ocorra reação cruzada de DENV com ZIKV, e de outros arbovírus como o vírus Mayaro e o vírus o'nyong-nyong. Sorologicamente, o CHIKV é mais próximo do vírus o'nyong-nyong (SANTOS; ROMANO; WIGG, 2015).

O isolamento viral apesar de ser considerado padrão ouro para diagnóstico de arboviroses, há um tempo considerável para a obtenção dos resultados e, ainda pode haver a necessidade de realização de novas passagens para conseguir realizar o isolamento adequadamente, que depende da coleta, acondicionamento e transporte adequados da amostra (BONA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2023).

Quanto aos testes moleculares, estes, por sua vez, estão entre os métodos de diagnósticos mais sensíveis e precisos, para identificação do patógeno e monitoramento do sorotipo circulante, sendo muito úteis durante a fase virêmica (até o 6 dia). Neste caso, a detecção do RNA viral é feita por Reação em Cadeia da Polimerase associada à reação de Transcrição Reversa (RT-PCR). (PAULA e FONSECA, 2004).

A RT-PCR modo convencional é uma técnica qualitativa que determina presença ou ausência do vírus e que vem sendo utilizado há mais de 30 anos para detecção viral (LANCIOTTI *et al.*, 1992; JOSHI *et al.*, 2002), e a Transcrição Reversa – Reação em Cadeia mediada pela Polimerase quantitativo (RT-qPCR), também conhecida como RT-qPCR em tempo real, é atualmente a mais eficiente no diagnóstico de muitas doenças, uma vez que é altamente específica, sensível, com baixo risco de contaminação e menor tempo de reação (VALENTE DE FREITAS *et al.*, 2023).

O método utiliza um corante fluorescente ou sonda marcada para a detecção do cDNA amplificado e os produtos dessa reação são monitorados em tempo real, além disso, essa técnica

pode quantificar precisamente o número de fragmentos de cDNA presentes na amostra analisada, sendo, portanto, uma técnica qualitativa e quantitativa (BONA *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2023).

Há também a realização de testes rápidos da dengue, os quais são imunocromatográficos e detectam a proteína NS1. É um teste qualitativo, em que a presença do antígeno NS1 sugere doença aguda e ativa. Contudo, deve ser realizado como exame de triagem; e seu resultado precisa ser confirmado por técnicas mais sensíveis (BRASIL, 2016).

A justaposição dos exames com resultados positivos para as três doenças, dengue, chikungunya e zika no território brasileiro, pode auxiliar os órgãos de saúde, como a atenção primária, a rede especializada e vigilância epidemiológica a realizarem melhor aparelhamento dos serviços prestados à população, bem como entender a magnitude da circulação viral, para assim desenvolverem estratégias eficientes que previnam surtos e epidemias das arboviroses.

2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE ÀS ARBOVIROSES

As arboviroses expõem a população de todo o Brasil em uma situação de risco. As subnotificações apresentam números elevados decorrentes das dificuldades no diagnóstico laboratorial, insuficiência dos órgãos de saúde para atender o crescente número de pessoas doentes, e devido àqueles que procuram atendimento apenas diante do agravamento do quadro de saúde (BRASIL, 2018). O cenário se torna mais preocupante, ao se considerar que, a dengue e chikungunya podem ocorrer concomitante no mesmo indivíduo o que dificulta a sua identificação clínica (BRASIL, 2019). A possibilidade de diagnósticos errôneos e o seu impacto no desfecho da doença, não podem ser negligenciados e precisam ser mais investigados.

Não existe tratamento específico para as arboviroses, apenas é recomendada a administração de fármacos para amenizar o estado febril, as dores articulares e processos inflamatórios, de acordo os sintomas do paciente. O tratamento é sintomático, e tem a finalidade de facilitar a recuperação dos enfermos, mas não de curá-los da infecção (PAHO, 2017).

Uma vacina contra os quatro sorotipos da dengue, a QDENGAR[®] (TAK-003), foi desenvolvida pelo laboratório japonês Takeda, em dezembro de 2022, e em março de 2023 este imunizante foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil. Com eficácia geral de 80,2%, nos ensaios clínicos, reduziu as hospitalizações em 90% (BRASIL, 2023). Contudo, é válido ressaltar que, mesmo frente ao avanço que a QDENGAR[®] representa no combate à dengue, o controle dos vírus transmitidos pelo mosquito *Ae. aegypti* ainda inspira a associação de uma série de parâmetros, que vão desde medidas preventivas

relacionadas ao saneamento do meio ambiente, às ações de educação e combate ao vetor, utilizando-se meios químicos, físicos e biológicos (BRASIL, 2015).

Nesse contexto, a investigação epidemiológica e a apreensão por parte da saúde pública nacional para prever novas emergências devem ser consideradas. Os esforços para a utilização de exames diagnósticos ágeis, sensíveis e com pequena reação cruzada com outras arboviroses, ações em pesquisa e o combate aos vetores, são medidas que podem ter impacto na expansão de vírus emergentes, como a infecção por DENV, CHIKV e ZIKV, (BRASIL, 2015; DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017). Entender a estrutura, patogenicidade e distribuição das arboviroses é fundamental para alcançar o controle dessas doenças que mesmo sendo preveníveis, continuam representando um grande desafio para os órgãos de saúde do Brasil. A prevenção é imprescindível, sendo necessário intensivo e constante investimento em campanhas de combate aos vetores, e em métodos de detecção rápidos e eficientes, a fim de favorecer o manejo clínico, reduzir o número de óbitos, pessoas sequeladas e a onerosidade causada aos cofres públicos diante da necessidade de tratamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O Maranhão possui superfície de 331.983,29 km², é considerado o oitavo maior Estado brasileiro e o segundo do Nordeste em extensão territorial (IBGE, 2018). Ao Norte limita-se com o Oceano Atlântico (639,5 km), ao Sul e Sudeste encontra-se com o Estado do Tocantins (1.060 km), a Oeste limita-se com o Estado do Pará (798 km) e a Leste com o Estado do Piauí, em extensão de 1.365 km (Figura 5). O Estado possui cinco Mesorregiões Geográficas (Norte, Oeste, Centro e Sul Maranhense), subdivididas em 21 Microrregiões Geográficas, onde se encontram inseridos seus 217 municípios (IBGE, 2022). Em 2022, o Maranhão tinha uma população estimada em 6.776.699 habitantes, a quarta maior da região Nordeste, com o menor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Brasil, igual a 0,676, sendo o estado mais pobre da federação (IBGE, 2022).

A pesquisa foi realizada em parceria com a rede de atenção primária, secundária e terciária de saúde de três municípios pertencentes a mesorregião Leste maranhense: Caxias, Codó e Peritoró, e em São Mateus do Maranhão que compõe a região central do Estado. De acordo com os dados entomológicos obtidos no LIRAA de cada município, realizados durante o primeiro bimestre de 2019, encontravam-se em situação de alerta para a ocorrência de epidemias de dengue, chikungunya e zika, apresentando índice do LIRAA igual a 2,5% em Caxias, 1,0 % em Codó, 1,5% em Peritoró e 1,7% em São Mateus do Maranhão.

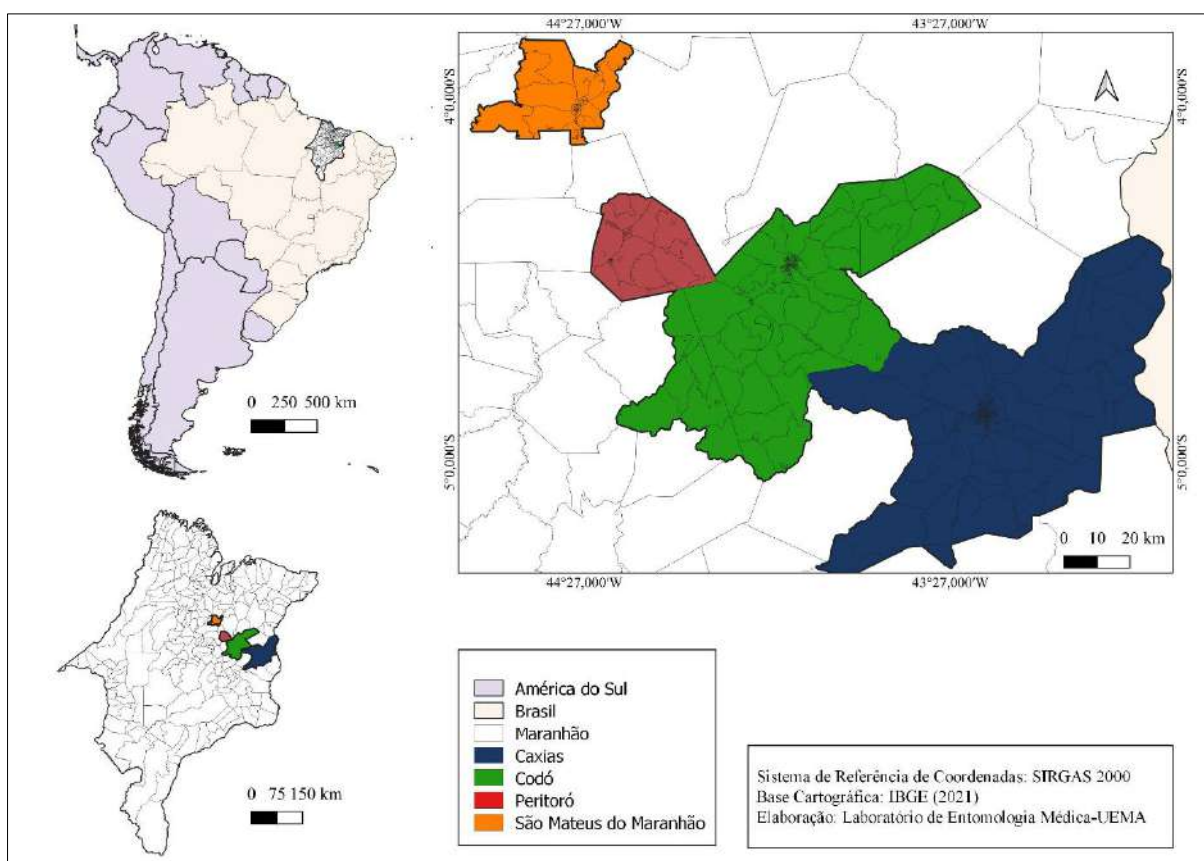
O município de Caxias, situado entre as coordenadas 04° 51' 32" de latitude Sul e 43° 21' 22" de longitude a Oeste, possui área de 5.196,77 km², é a quinta maior população do estado com 166.159 habitantes. É cortada pelo Rio Itapecuru e seus afluentes (Figura 5) (IBGE, 2022).

O município de Codó, situado entre as coordenadas 04° 27' 18" de latitude Sul e 43° 53' 09" de longitude a Oeste, possui uma área de 4.364,499 km² e sua população foi estimada em 122 859 habitantes, sendo então o sexto município mais populoso do Estado (Figura 5) (IBGE, 2022).

O município de Peritoró está localizado entre as coordenadas 04° 22' 58" de latitude Sul e 44° 19' 58" de longitude a Oeste e sua população estimada é de 21.201 habitantes (Figura 5) (IBGE, 2022).

São Mateus do Maranhão é um município brasileiro, localizado na mesorregião do Centro Maranhense, na microrregião do Médio Mearim, possui população, de 41 350 habitantes (Figura 5) (IBGE, 2022).

Figura 5- Mapa do Maranhão evidenciando para os municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus do Maranhão.



Fonte: Pimentel, 2023.

3.2 PROCEDIMENTOS ÉTICOS E LEGAIS

Esta pesquisa está inserida no projeto: Monitoramento da circulação de arbovírus (*Orthoflavivírus* e *Alphavirus*) em mosquitos *Aedes* e em humanos de áreas com registro de COVID-19 da Mesorregião Leste Maranhense, que foi submetido e aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da UEMA - CAAE: 38376620.0.0000.5554.

Os pacientes foram orientados sobre o estudo, tendo a liberdade de escolha em participar ou não. Para os que confirmaram participação, foi solicitado o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE (Apêndice A), elaborado em duas vias, uma para o entrevistado e outra para a entrevistadora, e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido- ATLE (Apêndice B) para crianças e adolescentes.

3.3 AMOSTRAGEM

Fizeram parte da pesquisa 171 pacientes atendidos na Rede Pública de Saúde dos municípios de: Caxias (n=149), Codó (n=4), Peritoró (n=1) e São Mateus (n=17), que concordaram em participar da pesquisa e preencheram os critérios de inclusão e de classificação

para infecção por arbovírus estabelecidos pelo Ministério da Saúde, os quais, relacionam-se a visitação à área de transmissão e a sintomatologia característica das arboviroses.

A coleta do material biológico foi feita no período compreendido de janeiro a julho de 2019 e de janeiro a julho de 2022. A caracterização clínico-epidemiológica foi realizada somente com os pacientes que apresentaram resultado positivo para as arboviroses nas amostras analisadas.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO PARA A COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Participaram deste estudo todos os pacientes sintomáticos de arboviroses, que demonstraram concordância com a pesquisa. Foram excluídos todos aqueles que não se encaixaram nos pré-requisitos anteriormente citados no tópico 3.3.

3.5 COLETA DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

A caracterização dos fatores clínico-epidemiológicos foi feita a partir da observação de fichas de notificação dos pacientes que apresentaram resultado positivo para arboviroses, com a finalidade de caracterizar a população do estudo através de informações como: sexo, idade, cor/raça, zona de residência, sintomatologia apresentada e distribuição nos municípios. A distribuição dos casos positivos por município foi feita somente em Caxias, uma vez que este foi o município com maior número de amostras analisadas e positivas em relação aos demais.

3.6 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Foi realizada coleta de sangue venoso por punção percutânea nos pacientes que não apresentaram contraindicações para este tipo de procedimento, sendo 10 a 20 ml no adulto, e de 3 a 5 ml, em crianças. A coleta foi feita preferencialmente no período de viremia, pelos próprios profissionais de saúde capacitados, que trabalham nos hospitais e rotineiramente realizam esse procedimento, seguindo protocolos de segurança e higiene para garantir a qualidade das amostras e a segurança dos pacientes.

Foi coletada apenas uma amostra de sangue total ou soro de cada paciente, e acondicionados em tubo de hemólise, onde foram anotados, o nome do paciente, a data da coleta, o município e o número da amostra. Nos casos de obtenção do soro, aguardou-se a completa coagulação à temperatura ambiente seguida de centrifugação a 3.000 rpm, por um

período de 10 minutos em tubo de coleta com tampa, e depois, transferido para tubo de transporte novo.

Os tubos com o sangue/soro coletados foram acondicionados em sacos plásticos lacrados (fita adesiva) e transportados durante 10 min em caixas isotérmicas com gelo que conservavam a temperatura (4° a 8° C) para o Laboratório de Entomologia Médica- LABEM, da Universidade Estadual do Maranhão- UEMA, Campus Caxias, onde foram mantidos em freezer a -80° C até o momento de transporte para o laboratório de realização dos testes moleculares. Posteriormente, este material foi acondicionado em galão contendo nitrogênio líquido para preservação da integridade da amostra e transportado ao Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas – IEC, no Estado do Pará, para realização das técnicas.

3.7 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL E RT-qPCR

As amostras de sangue total foram submetidas à extração do RNA viral usando o reagente Trizol LS (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) em associação com o kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA), seguindo orientações do fabricante. Para as amostras de soro foi usado o QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

De acordo com o protocolo, para amostras de sangue, foram colocados 250 µL da amostra e 750 µL de Trizol LS Reagente em um tubo de 2 mL. Em seguida, 1 mL da amostra foi transferido para tubos Phasemaker™ devidamente identificados. Depois de 5 min de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio à amostra e homogeneizados no vórtex por 15 s, seguindo o tempo de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm por 5 min. Em seguida, aproximadamente 600 µL do sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para tubos de 1,5 mL devidamente identificados, adicionado etanol a 70% na mesma proporção da fase aquosa, colocados para homogeneizar no vórtex por 15 s e depois centrifugados brevemente por 10 s.

Depois disto, 700 µL deste produto foi transferido para colunas de filtragem devidamente identificadas, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 s à temperatura ambiente, e a coluna inserida em um novo tubo coletor, sendo transferido o restante da amostra para a coluna e submetidos à centrifugação, nas mesmas condições anteriormente citadas por 15 s. Posteriormente, foi adicionado 700 µL de tampão de lavagem I Wash Buffer I (WBI), e centrifugados por 15 s. A coluna foi inserida em novo tubo coletor e submetida à segunda

lavagem, a partir da adição de 500 μ L de Wash Buffer II (WBII), este processo foi repetido mais uma vez, e depois centrifugados por 1 min à temperatura ambiente. A coluna foi então inserida em um novo tubo coletor de 1,5 mL, (identificados e datados), adicionado 50 μ L de água livre de nucleases ao centro da coluna, centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos e em seguida, armazenada em freezer a -70°C . (Figura 6).

Figura 6- Extração do RNA viral em amostras humanas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará.



Fonte: Aragão, 2022.

Foi utilizado como controle negativo 1 mL do *Trizol LS Reagent*, submetido às mesmas etapas das amostras processadas, a fim de que, quando utilizados os iniciadores e sondas para os alvos pretendidos, a extração fosse confirmada quando não houvesse amplificação do controle negativo, durante o processo de RT-qPCR.

Para as amostras de soro, foi utilizado 560 μ L de Tampão AVL, contendo carreador de RNA em um microtubo 1,5 mL. Depois, acrescentou-se 140 μ L da amostra ao tubo contendo Tampão AVL, em seguida foi agitado por 15 s. Após isto, a amostra foi incubada por 10 min a temperatura ambiente ($15-25^{\circ}\text{C}$), seguido de breve centrifugação. Posteriormente, foi adicionado 560 μ L de Etanol Absoluto e agitado por 15 s, e depois levado para centrifugar brevemente. Em seguida, 630 μ L da solução foi transferida para a coluna. O tubo foi centrifugado a 6.000 rpm por 1 min e a coluna transferida para um novo tubo coletor, repetindo o passo anterior.

Posteriormente, foi adicionado 500 µL de Tampão AW1 à coluna e centrifugado a 6.000 rpm por 1 min, transferindo a coluna para um novo tubo coletor. Depois disto, 500 µL de Tampão AW2 foi adicionado à coluna e levado para centrifugar a velocidade máxima por 3 min. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL devidamente identificado, onde foi adicionado 60 µL de Tampão AVE, incubado por 1 min a temperatura ambiente e centrifugado a 6.000 rpm por 1 min. Por fim, a coluna foi descartada e o RNA armazenado a -70°C.

RT e PCR foram realizadas em uma única etapa usando o SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O teste de DENV envolveu um ensaio multiplex, para detectar os quatro sorotipos do vírus, enquanto os testes ZIKV e CHIKV foram ensaios singleplex. Foram utilizados os reagentes descritos no quadro 2 nos testes de DENV, os reagentes apresentados no quadro 3 no teste de ZIKV e no quadro 4, no teste de CHIKV.

Quadro 2– Componentes da mistura de reação do ensaio *multiplex* de RT-qPCR para detecção de DENV.

Mistura de reação para ensaio <i>multiplex</i> para detecção de DENV			
Reagentes	Concentração inicial	Concentração final/reação	Volume para 1 reação
Master Mix sem ROX	2x	1x	12,5 µL
Água livre de nucleases	-	-	2,2 µL
Primer D1 F e R	50 µM cada	1 µM cada	1,0 µL
Primer D2 F e R	50 µM cada	0,5 µM cada	0,5 µL
Primer D3 F e R	50 µM cada	1 µM cada	1,0 µL
Primer D4 F e R	50 µM cada	0,5 µM cada	0,5 µL
Sonda D1-4	10 µM	180 nM	0,45 µL
RT Mix	40x	1x	0,5 µL
Amostra de RNA	-	-	5,0 µL
Total			25 µL

Quadro 3– Componentes da mistura de reação do ensaio *singleplex* de RT-qPCR para detecção de ZIKV.

Mistura de reação para ensaio <i>singleplex</i> para detecção de ZIKV			
Reagentes	Concentração inicial	Concentração final/reação	Volume para 1 reação
Master Mix c/ROX	2x	1x	12,5 µL
Água livre de nucleases	-	-	5,5 µL
Primer F/P	25 µM cada	500 nM cada	1,0 µL
Sonda	10 µM	200 nM	0,5 µL
RT Mix	40x	1x	0,5 µL
Amostra de RNA	-	-	5,0 µL
Total			25 µL

Quadro 4– Componentes da mistura de reação do ensaio *singleplex* de RT-qPCR para detecção de CHIKV.

Mistura de reação para ensaio <i>singleplex</i> para detecção de CHIKV			
Reagentes	Concentração inicial	Concentração final/reação	Volume para 1 reação
Master Mix c/ ROX	2x	1x	12,5 µL
Água livre de nucleases	-	-	5,5 µL
Primer F/P	50 µM cada	1 µM cada	1,0 µL
Sonda	10 µM	200 nM	0,5 µL
RT Mix	40x	1x	0,5 µL
Amostra de RNA	-	-	5,0 µL
Total			25 µL

Após preparação, 20 µL da mistura foi distribuído em placas de 96 poços e, depois, adicionou-se 5 µL do RNA extraído, em cópia única para DENV e em duplicata para CHIKV e ZIKV, seguido da vedação da placa com fita óptica (Figura 7). O ensaio foi validado usando controles positivos (DENV-1–4) e controles negativos (água sem nuclease). A reação foi realizada no sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os ensaios de RT-qPCR foram realizados sob as seguintes condições de ciclagem: uma etapa inicial de RT a 50 °C por 30 minutos, uma etapa de desnaturação a 95 °C por 2 min, 45 ciclos de 15 s a 95 °C e uma etapa de extensão final a 60 °C por 1 min. As amostras foram consideradas positivas quando o valor do Cycle Threshold (C_T) obtido foi menor que 37 para DENV e menor que 38 para CHIKV e ZIKV.

Figura 7- Realização da técnica de RT- qPCR em amostras humanas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará.

Fonte: Aragão, 2022.

Os iniciadores e sondas usados para detecção de DENV, CHIKV e ZIKV estão descritos nos quadros 5, 6 e 7, de acordo com os estudos de Santiago *et al.* (2013), para o teste de dengue, Lanciotti *et al.* (2007), para o teste de chikungunya e Faye *et al.* (2013), para o teste de zika, respectivamente.

Quadro 5 - Iniciadores e sondas utilizadas no ensaio RT-qPCR para detecção de DENV.

Sorotipo viral	Sequência Nucleotídica (5'-3')
DEN-1 F	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA
DEN-1 R	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC
DEN-2 F	CAGGCTATGGCACYGTCACGAT
DEN-2 R	CCATYTGACAGCARGACCATCTC
DEN-3 F	GGACTRGACACACGCACCCA
DEN-3 R	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT
DEN-4 F	TTGTCCTAATGATGCTRGTCG
DEN-4 R	TCCACCYGAGACTCCTTCCA
Sonda DEN-1	FAM-CATGTGGYTGGGAGCRGCG-BHQ1
Sonda DEN-2	VIC – CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA-BHQ1
Sonda DEN-3	Texas Red–ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG-BHQ2
Sonda DEN-4	Cy5–TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG-BHQ2

Fonte: Santiago *et al.*, 2013.

Quadro 6-- Iniciadores e sondas utilizadas no ensaio RT-qPCR para detecção de CHIKV.

Nome	Sequência Nucleotídica (5'-3')
VCHIK NSP4 6856F	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA
VCHIK NSP4 6981R	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC
Sonda VCHIK NSP4 6919p	FAM-AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG-BHQ1

Fonte: Lanciotti *et al.*, 2007

Quadro 7 - Iniciadores e sondas utilizadas no ensaio RT-qPCR para detecção de ZIKV.

Nome	Sequência Nucleotídica (5'-3')
VZIK NS5 F	AARTACACATACCARAACAAAGTG GT
VZIK NS5 R	TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG
Sonda VZIK NS5	FAM - CTYAGACCAGCTGAAR-BBQ

Fonte: Faye *et al.*, 2013.

3.8 CULTIVO CELULAR CLONE C6/36

Visando o isolamento viral, 37 amostras positivas no teste de RT-qPCR, foram inoculadas em células de *Aedes albopictus* clone C6/36 (IGARASHI, 1978) para tentativa de

isolamento e a fim proporcionar o aumento da carga viral das amostras para posterior sequenciamento nucleotídico. Primeiramente foi feita a manutenção do cultivo celular clone C6/36, proveniente de artrópodes hematófagos da espécie *Ae. albopictus* (IGARASHI, 1978) em laboratório, bem como, o preparo de tubos onde foi realizada a passagem celular semanal. Para a passagem celular do cultivo C6/36 (com células diluídas a 1:30) foi utilizado o meio Leibowit'z L-15 com L-glutamina suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), triptose fosfato (2,95%), antibióticos (penicilina 10.000 U/L e estreptomicina 10.000 µg/L) e aminoácidos não-essenciais (10 mL/L), sendo esse cultivo mantido à temperatura ambiente de aproximadamente 28°C (BARBOSA *et al.*, 1993; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998).

3.8.1 Isolamento viral em C6/ 36

Antes da inoculação, o meio de crescimento (5% de Soro Bovino Fetal [SBF]) dos tubos contendo células foi desprezado. Os cultivos de células C6/36 foram concomitantemente inoculados com a amostra. Em cada tubo de cultura de tamanho 16x125 cm² foi inoculado 25 µL da amostra, cada inoculação possuiu controles positivos (células inoculadas com vírus suscetíveis ao cultivo celular) e um controle negativo (células não inoculadas). Após a inoculação, os tubos foram incubados por uma hora em temperatura ambiente (C6/36), sendo lentamente homogeneizados a cada 15 min. Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de meio L-15 de manutenção (mesma composição do de crescimento, mas com 2% de SBF) em cada tubo de C6/36 e 1,5 mL de meio 199 de manutenção (mesma composição do de crescimento, mas com 2% de SBF). Os tubos, então, foram observados diariamente durante sete dias em microscópio ótico invertido para verificar a ocorrência de possível Efeito Citopático (ECP) e, outras anormalidades na monocamada celular (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998).

3.8.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)

No sétimo dia pós-inoculação, todas as células inoculadas foram submetidas ao teste de Imunofluorescência Indireta (IFI). O teste de IFI seguiu o protocolo descrito por Gubler e colaboradores (1984) com adaptações, e foi realizado com o intuito de confirmar a infecção celular e identificar o agente viral.

As células inoculadas foram colidas em lâminas para IFI. Essas células foram fixadas durante dez minutos em acetona PA em freezer -20°C. Posteriormente, foram colocadas em cada orifício de cada lâmina 10 µL de anticorpos policlonais (diluídos 1:20 em solução salina fosfatada – PBS pH 7.4) de oito dos principais grupos de arbovírus de ocorrência mundial,

sendo estes, representados: (*Togaviridae*, *Alphavirus*): grupo A; (*Flaviviridae*, *Flavivirus*): grupo B; (*Peribunyaviridae*, *Orthobunyavirus*): grupos C, e Simbú, Guamá, Capim, Bunyawera: Grupo Phlebovirus (*Phenuiviridae*, *Phlebovirus*).

Após este processo, as lâminas foram incubadas durante 30 min em estufa a 37°C, e depois lavadas em PBS pH 7,4 por 10 min. Em seguida, as lâminas foram enxaguadas rapidamente em água destilada. Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, foram adicionados 10 µL de conjugado anti-mouse na diluição de uso (1:900) em cada orifício da lâmina, e repetida a etapa de incubação e lavagem em PBS pH 7,4. Por fim, as lâminas foram montadas (lamínula-glicerina tamponada-10mL/L de PBS com pH de 7,4 mais 90 ml glicerina) e observadas ao microscópio de fluorescência. A positividade é caracterizada pela presença de fluorescência nas células infectadas.

3.9 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

3.9.1 Extração do RNA, Síntese do cDNA, preparo da biblioteca e sequenciamento

Os isolados foram sequenciados para confirmação da infecção e identificação do agente viral. A extração de RNA foi realizada com 140 µL do sobrenadante do cultivo celular usando o QIAamp™ Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Higen, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA foi quantificado usando Qubit RNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) no equipamento Qubit 4.0, segundo as recomendações do fabricante.

A preparação do cDNA a partir do RNA, iniciou com a síntese da primeira e segunda fita de cDNA, usando os kits SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e Second Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher), respectivamente. Em seguida, o cDNA foi purificado com o PureLink® PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA), e posteriormente, quantificado usando o Assay DNA HS Kit (ThermoFisher) no equipamento Qubit 4.0.

A biblioteca genômica foi preparada de acordo com as instruções do kit Nextera XT DNA (Illumina, San Diego, Califórnia, EUA), e sequenciadas através da plataforma NextSeq 550 (Illumina, San Diego, Califórnia, EUA) utilizando o NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 Cycles), através da metodologia *paired-end*, segundo recomendações do fabricante.

3.9.2 Montagem do genoma e análise filogenética

A montagem do genoma foi realizada usando a metodologia De Novo Assembler utilizando os programas SPAdes v3.13.1 (BANKEVICH *et al.*, 2012) e MEGAHIT v1.2.9 (LI,

et al., 2015), empregando valores de k-mer 21, 33, 55 e 77; e de 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91 e 99, respectivamente. Os *contigs* gerados foram analisados pelo programa DIAMOND v2.1.8 (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2021), pela análise do *BLASTX* usando a base de dados de proteínas não redundantes (nr) virais, levando-se em consideração os valores de e-value 1e-4 e de identidade aminoacídica.

Os arquivos referentes aos *contigs* gerados para cada amostra foram visualizados no programa MEGAN v6.21.128 (HUSON et al., 2017), utilizando um filtro de e-value no valor de 1e-10. Os *contigs* que apresentaram similaridade com sequências virais de interesse foram visualizadas no programa Geneious v9.1.8 (<https://www.geneious.com/>).

A inferência filogenética foi realizada a partir das sequências nucleotídicas de diferentes cepas do vírus disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando as regiões codificadoras de proteínas. O conjunto de dados gerados juntamente com as amostras deste estudo foram submetidos ao Alinhamento de Múltiplas Sequências (MSA), utilizando o programa Mafft v.7 (KATO e STANDLEY, 2013). O resultado do alinhamento foi inspecionado manualmente para a realização de correções manuais no alinhamento, quando necessária, com o emprego do programa Geneious v9.1.8 (<https://www.geneious.com/>).

Posteriormente, a construção de árvores filogenéticas foi realizada através da metodologia de Máxima Verossimilhança (ML) (MYUNG, 2003). Ambas as metodologias foram empregadas usando o programa IQ-TREE v.1.6.12 (NGUYEN, 2015). Conjuntamente a estas análises, foi utilizado o teste bootstrap, definindo 1000 réplicas para fornecer maior confiabilidade aos valores dos clados (FELSENSTEIN, 1985).

A visualização da filogenia foi realizada usando o programa FigTree v.1.4.4 (<https://github.com/rambaut/figtree/releases/tag/v1.4.4>).

3.10 COLETA DOS DADOS DO LIRA, CLIMÁTICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Os índices larvários que indicam a situação da infestação de formas imaturas de larvas e pupas de *Ae. aegypti* nos imóveis, foram obtidos a partir dos levantamentos realizados pelas Unidades de Vigilância em Zoonoses - UVZ dos municípios (BRASIL/SVS, 2019), em 2022. Em relação ao LIRAA geral do Estado, a partir dos quatro levantamentos realizados nos municípios, foi contabilizado o LIRAA anual.

Os casos de dengue confirmados nos municípios do Maranhão em 2022, foram obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) por meio do Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), alimentado

principalmente, pela notificação e investigação de casos de doenças e agravos de notificação compulsória (Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de Setembro de 2017), disponível em <https://datasus.saude.gov.br/acesso-a-informacao/doencas-e-agravos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>.

O coeficiente de incidência de dengue foi calculado através da razão entre o número de casos novos em 2022 e a população residente no Maranhão no mesmo período, multiplicado por 100 mil. A população foi obtida através do censo demográfico de 2022, disponível no banco de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (IBGE, 2022). Os dados climáticos foram obtidos no banco de dados *Climate data*, disponível em: <https://pt.climate-data.org/>.

Para análise espacial, as feições geométricas do Estado do Maranhão em formato shapefile foram obtidas no portal de mapas do IBGE, disponível através do endereço: <http://portaldemapas.ibge.gov.br>.

3.11 ANÁLISE DOS DADOS

3.11.1 Análise dos dados epidemiológicos e climáticos

Para as amostras analisadas e positivas, foram realizadas análises descritivas dos dados epidemiológicos, a partir da determinação de frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas e organização dos resultados em tabelas e gráficos.

Quanto às análises de Caxias, foi utilizada a correlação de Spearman (r_s) para examinar a correlação entre casos de dengue e as variáveis climáticas (temperaturas máxima e mínima, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar). A correlação foi considerada positiva quando o valor de r_s foi maior que 0,00 e negativa quando este valor foi menor que 0,00. Também foi utilizada a classificação de magnitude da correlação proposta por Dancey e Reidy (2006) na qual valores de r_s entre 0,10 e 0,39, a correlação foi considerada fraca; entre 0,40 e 0,69, moderada; e, entre 0,70 e 1,00, forte.

As informações sobre os casos positivos por bairro de Caxias foram organizados em planilhas no programa Microsoft Excel© (2010), e utilizados para a produção do mapa, e por meio da plotagem desses dados no *software* livre Quantum Gis, versão 2.18, utilizando o sistema de coordenadas Fuso UTM 23S, com Datum SIRGAS 2000 para análise, foi gerado um arquivo vetorial (shp) para espacialização desta base. Para observação do número de casos foram utilizadas marcações das áreas identificadas por cores correspondentes ao número de casos.

Em relação ao Maranhão, foi utilizada a estimativa de densidade de Kernel para verificar a distribuição espacial da incidência bruta de dengue no Estado. Esse método permite gerar mapas de calor destacando áreas com maior incidência de dengue, possibilitando identificar áreas críticas, a partir dos casos confirmados de dengue em 2022 por município. Foi produzido um arquivo *raster* para cada caso com vários quadros de dados, a fim de possibilitar a comparação da incidência de dengue nos diferentes municípios. A elaboração e construção do layout dos mapas com seus elementos cartográficos foi realizada no software QGIS, versão 3.22.

Para análise da autocorrelação local e identificação dos conglomerados espaciais entre os municípios do Maranhão, foi realizado o Índice de Moran global e o Local Indicators of Spatial Association (LISA), a partir da taxa de incidência de dengue suavizada pelo método Bayesiano Empírico. Foi criada uma matriz de primeira ordem para verificar a dependência entre as áreas. O índice varia de -1 a +1, subdividindo-se em quatro quadrantes: alto-alto, áreas de maior prioridade; baixo-baixo, áreas de menor prioridade; baixo-alto e alto-baixo, áreas de transição. O LISA foi obtido através do software GeoDa, versão 1.14.

Para testar o efeito das variáveis ambientais sobre a incidência de dengue foi utilizada uma análise de regressão linear múltipla (uma seleção para cada variável resposta). As variáveis preditoras foram seis variáveis climáticas (temperatura média, temperatura mínima, temperatura máxima, umidade do ar, dias de sol e precipitação) e a resposta foi a incidência de dengue.

As análises de correlação entre o número de casos de dengue e as variáveis climáticas foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism 7 (San Diego, Estados Unidos da América) e OpenEpi 3.01. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

3.11.2 Análises do LIRAA

Os dados foram gerenciados usando Microsoft Excel 2013, versão 2406. Com base nas definições de risco de epidemias do Ministério da Saúde, que classifica os municípios brasileiros, as análises foram realizadas, segundo valores do IIP: $< 1\%$ = situação satisfatória; $\geq 1\%$ e $< 4\%$ = situação de alerta; $\geq 4\%$ = situação de alto risco de epidemia (BRASIL, 2009).

Para testar o efeito de LIRAA sobre a incidência de dengue, utilizando os dados de todo o Maranhão, foi realizada uma regressão linear simples. Para validação do modelo (análises post-hoc) foram realizados: Teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos resíduos;

Teste de desvio de outlier dos resíduos; Teste de Durbin-Watson para verificar a independência dos resíduos; e Teste de Breush-Pagan para verificar a homocedasticidade dos resíduos.

Para testar o efeito das variáveis ambientais sobre o LIRAA, foi utilizada uma análise de regressão linear múltipla (uma seleção para cada variável resposta). As variáveis preditoras foram seis variáveis climáticas e a resposta foi o LIRAA. Foram utilizados dados das variáveis ambientais: temperatura média, temperatura mínima, temperatura máxima, umidade do ar, dias de sol e precipitação. Foi testada a autocorrelação (covariância) das variáveis preditoras e aquelas com correlação superior a 80% foram removidas.

Foi realizada a seleção dos modelos a partir do Critério de Informação de Akaike de primeira ordem (AIC) com uso do algoritmo stepwise-backward. Esta seleção foi feita a fim de verificar se eles atendiam aos pressupostos de resíduos independentes e se estavam distribuídos de forma idêntica.

O melhor modelo selecionado foi submetido aos mesmos testes post-hoc de uma regressão linear simples: teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos resíduos; teste de desvio de outlier dos resíduos; teste de Durbin-Watson para verificar a independência dos resíduos; e teste de Breush-Pagan para verificar a homocedasticidade dos resíduos. Para melhor ajuste do modelo, a variável de incidência foi transformada por log para sua normalização. O software utilizado nas análises foi o R (versão 4.3.2). A análise do LIRAA foi realizada em linguagem R v.4.3.0. Para todas as análises o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE AMOSTRAS COM SUSPEITAS DE INFECÇÃO POR DENV, ZIKV E CHIKV

Foram analisadas por RT-qPCR, 171 amostras, sendo 156 amostras de sangue total e 15 de soro, de pacientes com suspeitas de arboviroses residentes no município de Caxias, São Mateus, Codó e Peritoró. Do total de amostras analisadas, 72 (42,1%) apresentaram positividade, sendo 68 (39,7%) de Caxias (4 de 2019 e 64 de 2022). Das quatro amostras provenientes do município de Codó, em duas foi constatada positividade para DENV-1. Uma amostra de Peritoró e outra de São Mateus foi detectada a presença de *Orthoflavivirus*, ambas de 2022 (Tabela 1). Quatro amostras de soro apresentam positividade para DENV-1.

Tabela 1- Número de amostras clínicas analisadas e positivas para a presença de arbovírus, por ano e por município.

Municípios	Ano	Número de amostras por município (%)	Número de amostras positivas (%)
Caxias	2019	32 (18,7%)	68 (39,7 %)
	2022	117 (68,5%)	
Codó	2022	04 (2,3%)	2 (1,2 %)
Peritoró	2022	01(0,6%)	1 (0,6 %)
São Mateus	2022	17 (9,9%)	1 (0,6 %)
TOTAL		171(100%)	72 (42,1%)

Fonte: Elaborada pela autora.

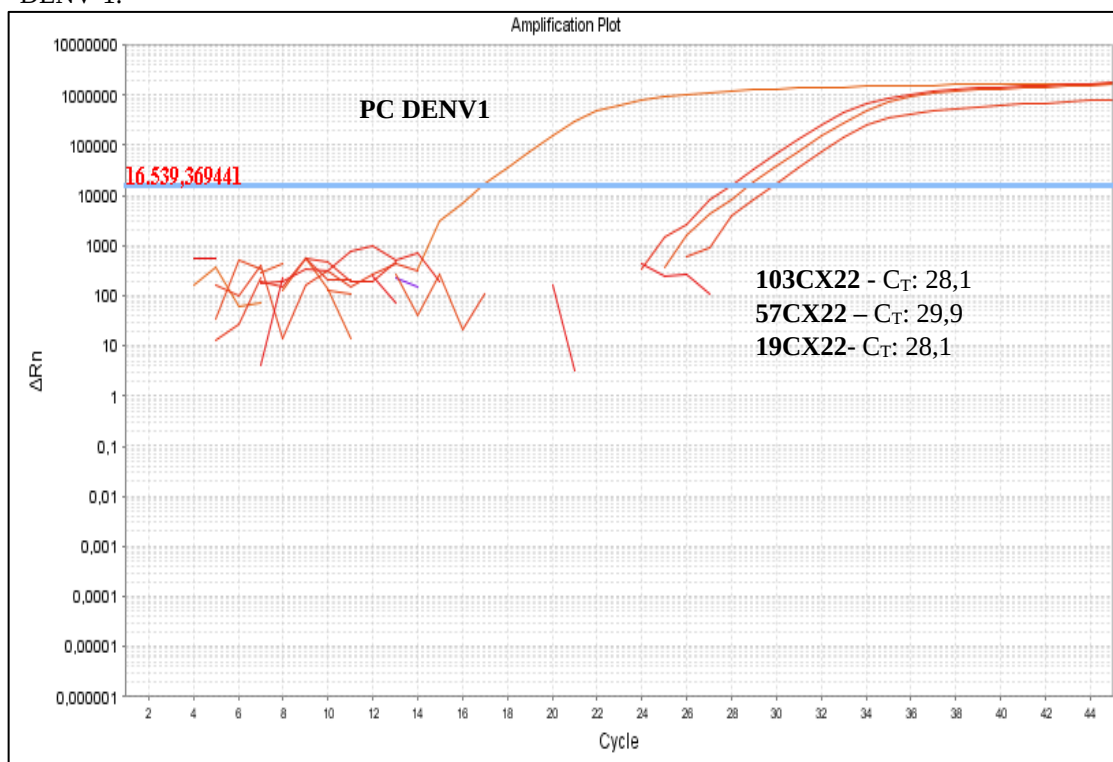
O maior número de amostras positivas foi observado no município de Caxias (N = 68; 94,4%), sendo que em 79,1% (N=57) foi detectado o DENV-1 (Figura 8), em 8,4% (N= 6) o CHIKV (Figura 9), em 5,5% (N= 4) o DENV-2 (Figura 10), e em 1,4% (N= 1) o DENV-3 (Figura 11). Além disso, uma coinfeção por DENV-1 e CHIKV foi observada em Caxias. Nos demais municípios apenas o DENV-1 foi detectado (Tabela 2). Apenas amostras de Caxias, do ano de 2022, apresentaram positividade para CHIKV. Não foi constatada infecção por ZIKV nas amostras analisadas neste estudo.

Tabela 2- Número de amostras clínicas positivas por município de origem e por arbovírus detectado.

Municípios	DENV-1 (%)	DENV-2 (%)	DENV-3 (%)	CHIKV (%)	Amostras positivas
Caxias	57 (79,1 %)	4 (5,5 %)	1 (1,4%)	6 (8,4%)	68 (94,4%)
Codó	2 (2,8 %)	0	0	0	2 (2,8%)
Peritoró	1 (1,4 %)	0	0	0	1 (1,4%)
São Mateus	1 (1,4 %)	0	0	0	1 (1,4%)
TOTAL	61 (84,7%)	4(5,5%)	1(1,4%)	6 (8,4%)	72 (100%)

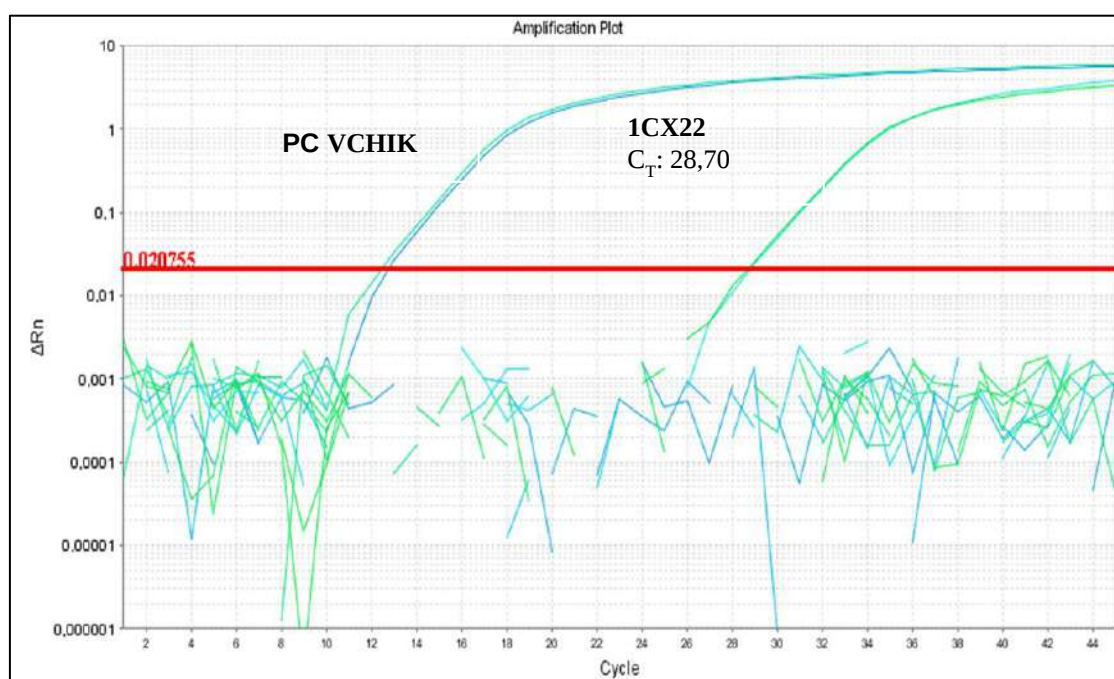
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8- Curvas de amplificação de RT-qPCR indicando as amostras positivas para DENV-1, do município de Caxias, Maranhão, mostrando os seus respectivos valores de CT. O log da mudança na fluorescência é plotado em função do número do ciclo (ΔR_n vs. Ciclo). Controle Positivo para o DENV-1.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9- Curvas de amplificação de RT-qPCR indicando amostra positiva do município de Caxias, Maranhão, mostrando o seu respectivo valor de CT. O log da mudança na fluorescência é plotado em função do número do ciclo (ΔR_n vs. Ciclo). PC CHIKV: Controle Positivo para o vírus Chikungunya.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10- Curvas de amplificação de RT-qPCR indicando as amostras do município de Caxias, Maranhão, positivas para o vírus Dengue 2, mostrando os seus respectivos valores de CT. O log da mudança na fluorescência é plotado em função do número do ciclo (ΔRn vs. Ciclo).

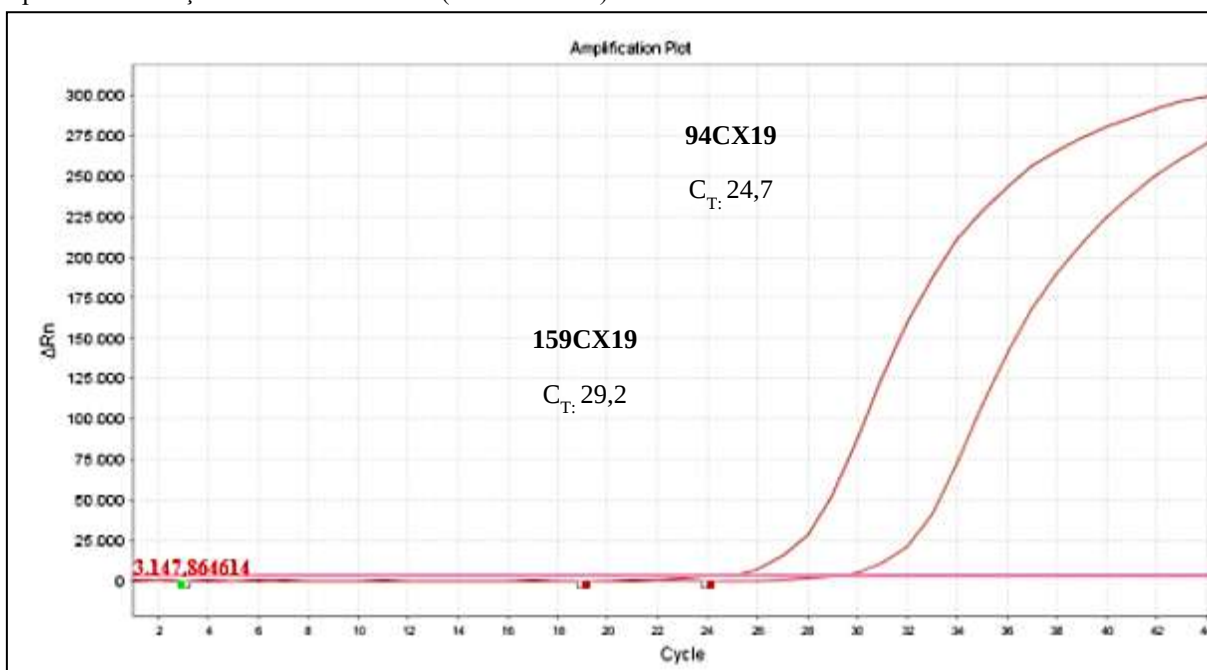
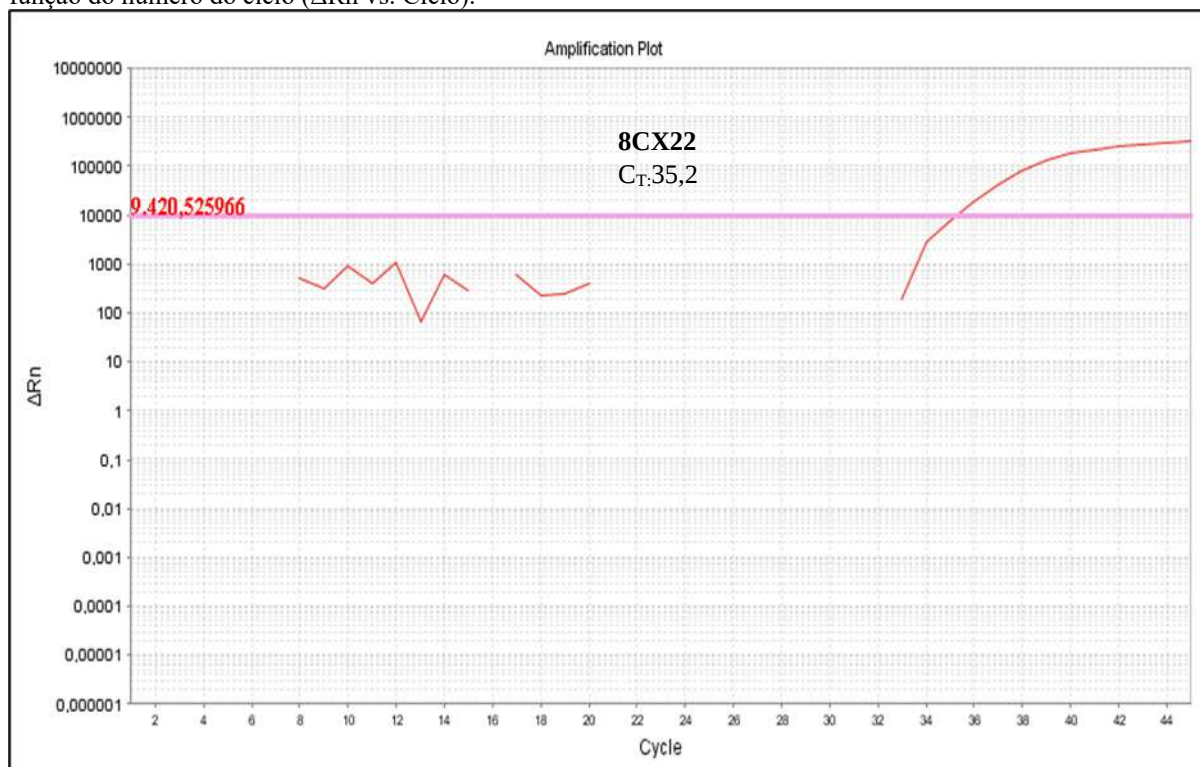


Figura 11- Curva de amplificação de RT-qPCR indicando a amostra do município de Caxias, Maranhão, positiva para o vírus Dengue 3, mostrando o seu respectivo valor de CT. O log da mudança na fluorescência é plotado em função do número do ciclo (ΔRn vs. Ciclo).



Fonte: Elaborada pela autora.

Nas amostras positivas no teste *multiplex* RT-qPCR para DENV, também foi feita a especificação do sorotipo viral de dengue. Os valores de C_t obtidos nos testes de RT-qPCR para DENV, CHIKV e ZIKV, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de C_t obtidos nas amostras oriundas dos municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus, positivas pelo teste RT-qPCR

VIRUS E VALORES DE C_t			VIRUS E VALORES DE C_t		
Nº	AMOSTRAS		Nº	AMOSTRAS	
1	1CX22	VCHIK (28,7)	37	64CX19	VDEN 2 (31,8)
2	8CX22	VDEN-3 (35,2)	38	67CX22	VDEN 1 (29,5)
3	9CX22	VCHIK (14,0)	39	69CX22	VCHIK (31,4)
4	13CX22	VDEN-1 (22,3)	40	73CX22	VDEN-1 (21,2)
5	15CX22	VDEN 1 (28,2)	41	79CX22	VDEN-1 (19,1)
6	16CX22	VDEN-1 (29,6)	42	81CX22	VDEN 1 (31,9)
7	18CX22	VDEN-1 (30,9)	43	85CX22	VDEN-1 (25,3)
8	19CX22	VDEN 1 (28,1)	44	88CX22	VDEN-1 (18,3)
9	20CX22	VDEN 1 (28,9)	45	94CX19	VDEN-2 (24,6)
10	21CX22	VDEN 1 (29,7)	46	96CX22	VCHIK (34,4)
11	22CX22	VDEN 1 (35,3)	47	103CX22	VDEN 2 (28,1)
12	24CX22	VDEN-1 (22,8)	48	109CX22	VDEN 1 (25,9)
13	26CX22	VDEN-1 (15,3)	49	112CX22	VDEN 1 (30,5)
14	27CX22	VDEN-1 (16,6)	50	118CX22	VDEN 1 (28,4)
16	28CX22	VDEN-1 (18,6)	51	120CX22	VDEN-1 (23,7)
16	31CX22	VDEN 1 (26,9)	52	121CX22	VDEN 1 (25,1)
17	32CX22	VDEN-1 (23,8)	53	122CX22	VDEN 1 (23,1)
18	33CX22	VDEN 1 (27,6)	54	126CX22	VDEN-1 (27,4)
19	36CX22	VDEN 1 (25,7)	55	129CX22	VDEN 1 (23,1)
20	37CX22	VDEN 1 (22,1)	56	132CO22	VDEN-1 (16,3)
21	39CX22	VDEN 1 (28,3)	57	134SM22	VDEN-1 (24,6)
22	40CX22	VDEN-1 (23,4)	58	137CX22	VDEN-1 (27,7)
23	42CX22	VDEN 1 (34,1) e VCHIK (28,0)	59	138CX22	VDEN-1 (23,8)
24	43CX22	VDEN 1 (28,5)	60	140CX22	VDEN-1 (28,9)
25	48CX22	VDEN-1 (23,9)	61	142CX22	VDEN 1 (28,6)
26	49CX22	VDEN 1 (28,3)	62	143CX19	VDEN-2 (30,3)
27	50CX22	VDEN 1 (18,7)	63	144CX22	VDEN 1 (16,1)
28	51CX22	VDEN 1 (22,1)	64	155CX22	VDEN-1 (21,0)
29	52CX22	VDEN-1 (15,5)	65	156CX22	VDEN-1 (25,4)
30	53CX22	VDEN-1 (26,8)	66	158CX22	VDEN-1 (20,2)
31	54CX22	VDEN-1 (33,3)	67	159CX19	VDEN-2 (29,2)
32	55CX22	VDEN 1 (20,8)	68	161CX22	VDEN 1 (30,9)
33	56CX22	VDEN 1 (28,6)	69	165CX22	VDEN 1 (27,3)
34	57CX22	VDEN-1 (29,9)	70	168CX22	VDEN 1 (28,0)
35	60CX22	VDEN 1 (33,5)	71	170CX22	VDEN-1 (31,3,)
36	63CX22	VCHIK (27,6)	72	01PE22	VDEN 1 (24,0)

Legenda: C_t = valor do *Cycle Threshold*; DENV = *Orthoflavivirus denguei*, CHIKV = *Chikungunya virus*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 ISOLAMENTO VIRAL E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

Foi realizado o isolamento viral em 37 amostras positivas no teste de RT-qPCR, que apresentaram baixo valor de CT; na amostra corresponde a coinfeção de DENV-1 e CHIKV, e também amostras de vírus de interesse como DENV-2 e DENV-3, sendo 34 de sangue e 03 de soro, conforme mostra a Tabela 4. As amostras 01PE22, 134SM22, 132CO22, são oriundas de Peritoró, São Mateus do Maranhão e Codó, respectivamente. A amostra 132CO22 apresentou resultado positivo para DENV-1, enquanto nas amostras 01PE22 e 134SM22 não foi possível realizar o isolamento. Em 23 amostras de Caxias- MA, foi constatada positividade para DENV-1 no isolamento viral e na amostra 9CX22 de Caxias, um resultado positivo para Chikungunya foi observado.

Tabela 4. Amostras humanas submetidas ao isolamento viral em células C6/36.

ORDEM	INOCULAÇÕES EM C6/36	Valor de CT	AMOSTRA	RESULTADO	SOROTIPO	TÍTULO
1	8CX22	35,2	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	9CX22	14,0	SANGUE	POSITIVO	CHIKUNGUNYA	3+
3	13CX22	22,3	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	3+
4	51CX22	22,1	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	2+
5	24CX22	22,8	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	2+
6	36CX22	25,7	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
7	26CX22	15,3	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	4+
8	27CX22	16,6	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	3+
9	28CX22	18,6	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	2+
10	32CX22	23,8	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	1+
11	37CX22	22,1	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	1+
12	40CX22	23,4	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	2+
13	42CX22	34,1 e 28,0	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
14	48CX22	23,9	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	4+
15	52CX22	15,5	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	4+
16	55CX22	20,8	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	3+
17	63CX22	27,6	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
18	64CX19	31,8	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
19	73CX22	21,2	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	1+
20	79CX22	19,1	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	3+
21	85CX22	25,3	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
22	88CX22	18,3	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	4+
23	94CX19	24,6	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
24	103CX22	28,1	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	109CX22	25,9	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	3+
26	120CX22	23,7	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	4+
27	121CX22	25,1	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	122CX22	23,1	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	4+
29	129CX22	23,1	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	4+
30	132CO22	16,3	SORO	POSITIVO	DENGUE 1	4+

31	134SM22	24,6	SORO	REFAZER	FAZER #	REFAZER
32	138CX22	23,8	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	3+
33	143CX19	30,3	SANGUE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
34	144CX22	16,1	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	3+
35	155CX22	21,0	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	1+
36	158CX22	20,2	SANGUE	POSITIVO	DENGUE 1	3+
37	01PE22	24,0	SORO	REFAZER	REFAZER	REFAZER

Das 25 amostras positivas no isolamento, nove amostras de sobrenadante de cultivo celular identificadas com os seguintes códigos: 132CO22, 120CX22, 122CX22, 129CX22, 26CX22, 48CX22, 52CXP22, 88CX22 e 9CX22, foram encaminhadas para extração do RNA total, síntese do cDNA fita dupla, preparação da biblioteca genômica e sequenciamento por meio da plataforma de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), e posterior análises de bioinformática. A seleção das amostras para o sequenciamento foi feita mediante os seguintes critérios: apresentação de maior titulação no isolamento e o fato de serem oriundas de municípios diferentes.

Foi recuperada a região codificadora da proteína (ORF) completa de quatro amostras referentes ao DENV-1 (Tabela 5). Para o CHIKV, foi recuperada as ORF completas das proteínas estruturais e não estruturais (Tabela 5). Não foi possível recuperar as regiões não codificadoras 5' e 3' para os cinco genomas recuperados. Em quatro amostras não foram encontradas leituras referentes a nenhum arbovírus de interesse.

Tabela 5 - Métricas de dados gerados por amostra.

Amostra	Total de leituras geradas	Cobertura média (profundidade)	Agravo
132CO22	4.858.740	52	DENV1
120CX22	5.311.646	Na	Na
122CX22	4.032.726	Na	Na
129CX22	3.836.340	Na	Na
26CX22	3.432.392	52	DENV1
48CX22	4.374.440	Na	Na
52CX22	5.806.170	2014	DENV1
88CX22	5.263.298	312	DENV1
9CX22	4.673.894	259	CHIKV

na: não se aplica.

Os *dataset* alinhados apresentaram sinal filogenético positivo (98.6% de árvores totalmente resolvidas para o DENV1 e 97.6% de árvores totalmente resolvidas para o de CHIKV) e serviu de base para a construção das inferências filogenéticas, utilizando o modelo de substituição nucleotídica GTR+F+G4 para a de DENV1 e o GTR+F+I para a de CHIKV. As sequências dos isolados de DENV1 agruparam ao clado do genótipo V (Figura 12), enquanto que a sequência de CHIKV agrupou ao clado do genótipo ECSA (Figura 13).

Figura 12- Árvore Filogenética de diferentes cepas de vírus pertencentes ao DENV1. Estão incluídos os isolados obtidos a partir deste estudo. Foi utilizado o Método Máxima Verossimilhança (ML) com base nas sequências nucleotídicas completas da poliproteína, sendo utilizada a matriz GTR+F+G4, como o melhor modelo de substituição nucleotídica. Genótipos conhecidos são rotulados em diferentes cores. Amostras identificadas neste estudo estão destacadas em vermelho. Os números em cada nó principal da árvore correspondem aos valores de *bootstrap* em porcentagem (1000 réplicas). A barra de escala corresponde à divergência nucleotídica por site entre sequências.

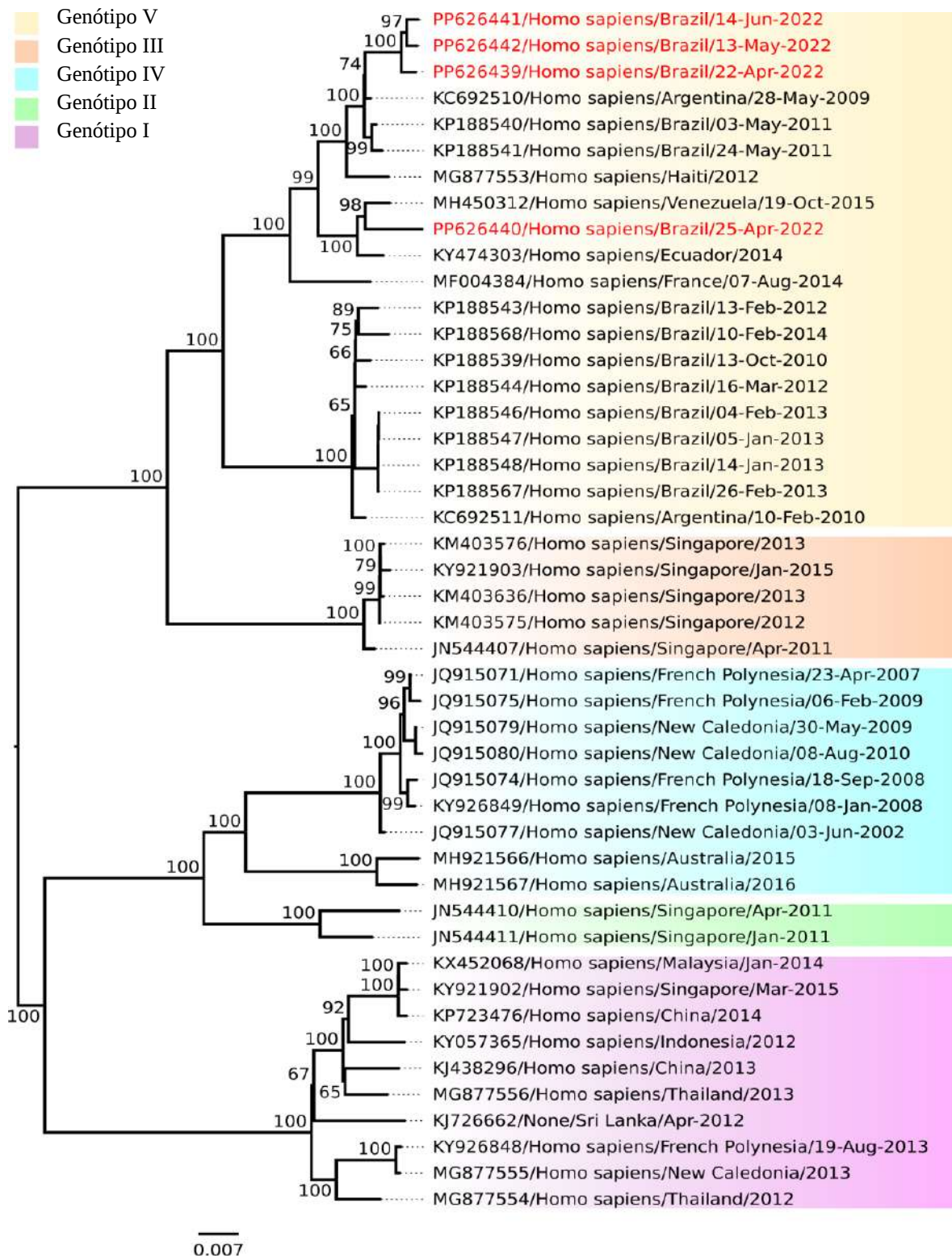
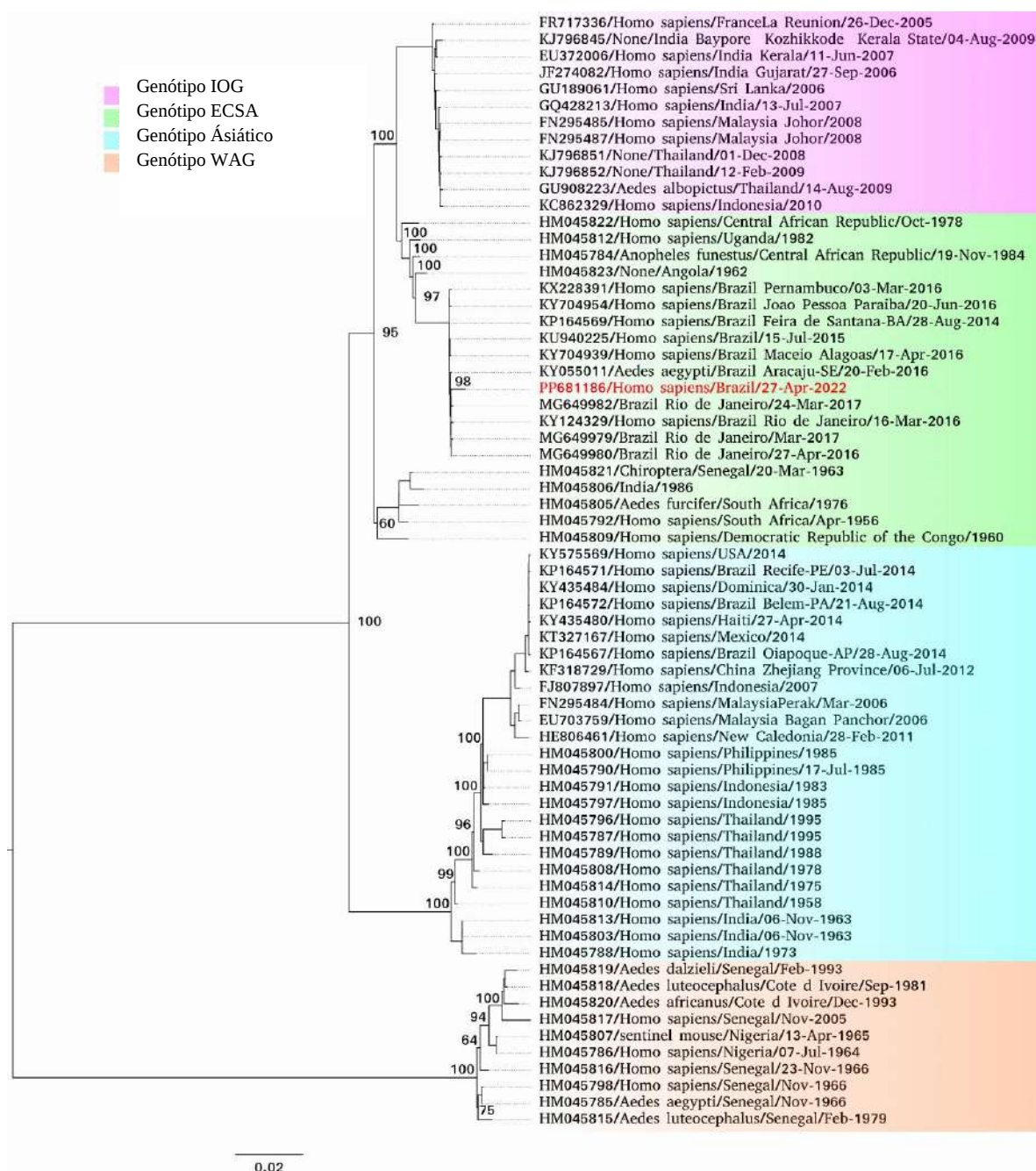


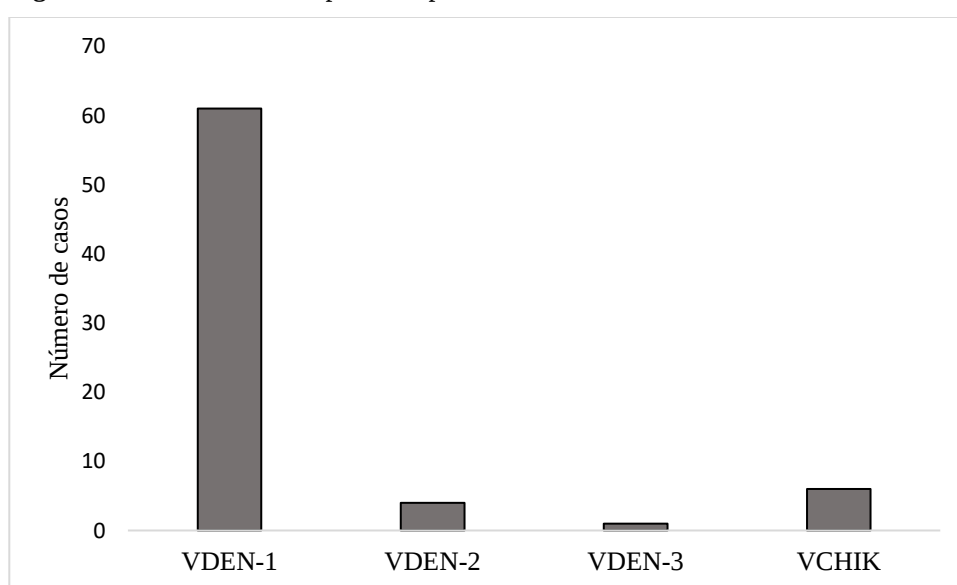
Figura 13: Árvore Filogenética de diferentes cepas de vírus pertencentes ao CHIKV. Estão incluídos os isolados obtidos a partir deste estudo. Foi utilizado o Método Máxima Verossimilhança (ML) com base nas sequências nucleotídicas completas das regiões não estrutural, intergênica e estrutural, sendo utilizada a matriz GTR+F+I, como o melhor modelo de substituição nucleotídica. Genótipos conhecidos são rotulados em diferentes cores. Amostras identificadas neste estudo estão destacadas em vermelho. Os números em cada nó principal da árvore correspondem aos valores de bootstrap em porcentagem (1000 réplicas). A barra de escala corresponde a divergência por site entre sequências.



4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES COM INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS

A apreciação dos dados epidemiológicos e clínicos, evidenciou que em 42,1% (N=72) das 171 amostras analisadas foi detectada a presença de arbovírus, sendo que em 39,2 % (N=67) foi identificado os sorotipos de DENV, e em 3,5 % (N=6) foi constatada a presença do CHIKV. O DENV-1 permaneceu o sorotipo mais frequente (86,1%; N= 62), seguido pelo DENV-2 e DENV-3, encontrados em quatro (N=4; 5,5%) e em uma amostra (N= 1; 1,4%), respectivamente (Figura 14).

Figura 14- Número de casos positivos para o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e CHIKV.



Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto ao gênero dos pacientes que apresentaram resultado positivo, o maior número de casos positivos foi observado em homens (42 casos; 58,3%). Os indivíduos que se autodeclararam pardos apresentaram maior positividade (N=68; 94,4%) (Tabela 6). Os homens pardos representaram 55,5 % (N=40) dos pacientes positivos, enquanto as mulheres pardas corresponderam a 38,8% (N=28).

A faixa etária mais afetada foi a de 5 a 9 anos com 31 registros (43 %). seguida pela idade de 10 a 14 com (30,5%; N=22). As faixas etárias de 15-19, 20-39 e 40-59, apresentaram 6,9%, 6,9% e 5,5, respectivamente. A maior porcentagem dos casos ocorreu na zona urbana (71 casos; 98,6%) (Tabela 6).

Tabela 6 -Frequências absolutas e relativas, dos casos confirmados de dengue em Caxias. Codó, Peritoró e São Mateus do Maranhão, em 2019 e 2022.

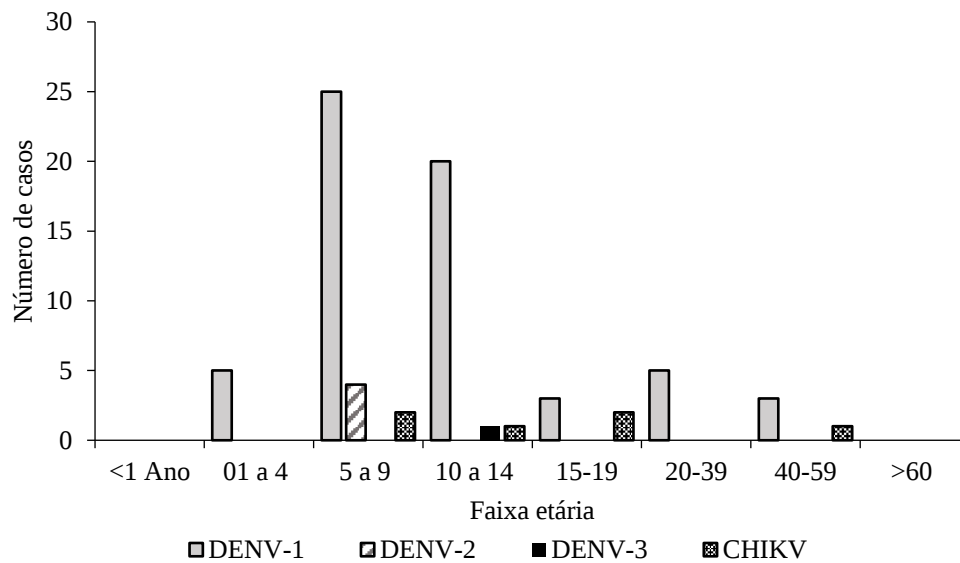
VARIÁVEIS	N	%
GÊNERO		
Masculino	42	58,3 %
Feminino	30	41,7 %
COR		
Branco	3	4,2 %
Parda	68	94,4 %
Preta	1	1,4 %
Amarelo	0	0
Sem declaração	0	0
FAIXA ETÁRIA (Em anos)		
<1 Ano	0	0
01 a 4	5	7
5 a 9	31	43 %
10 a 14	22	30,5 %
15-19	5	7
20-39	5	7
40-59	4	5,5 %
60-64	0	0
65-69	0	0
70-79	0	0
80 e +	0	0
ZONA DE RESIDÊNCIA		
Urbana	71	98,6 %
Rural	1	1,4 %

n = número de casos de dengue; % = porcentagem;

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação ao sorotipo identificado por faixa etária, observou-se que, o DENV -1 foi encontrado com maior frequência nos pacientes com idade entre 5 a 9 anos (N= 25) e entre 10 a 14 (N=20). Quatro (4) detecções de DENV-2 e dois (2) de CHIKV, também foram observadas nesse intervalo de idade. O DENV-3 foi encontrado em um indivíduo com idade entre 10 -14 anos. Não houve detecção de DENV, CHIKV e ZIKV nas amostras sanguíneas dos indivíduos acima de 60 anos (Figura 15).

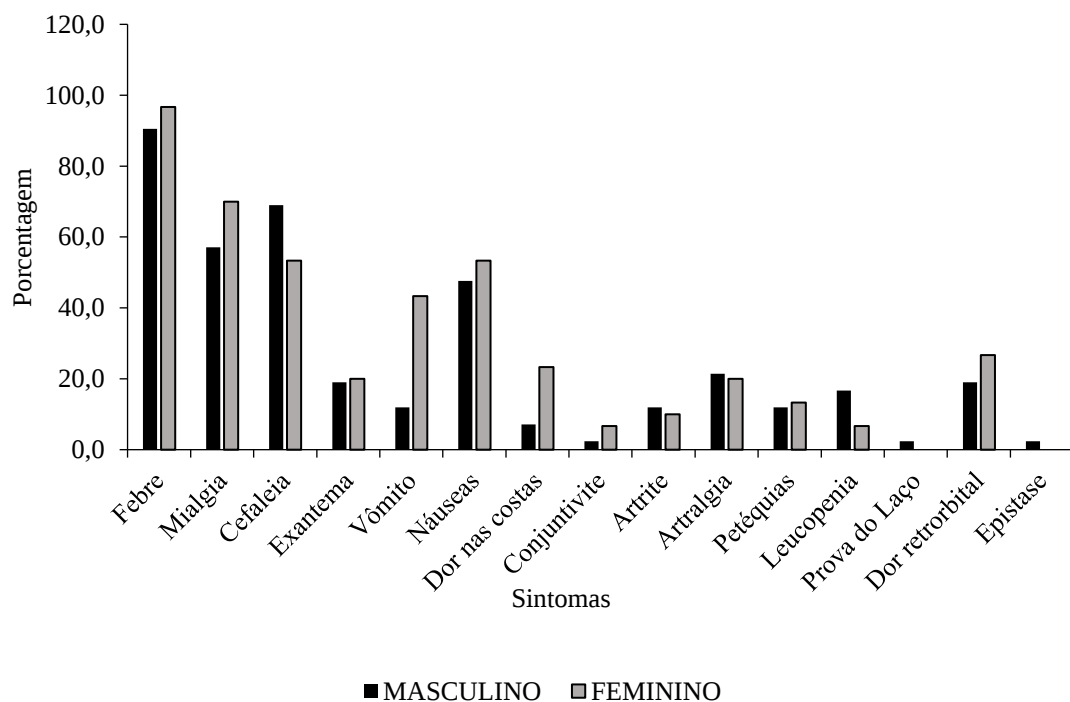
Figura 15 - Número de casos positivos para o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e CHIKV por faixa etária.



Fonte: Elaborada pela autora.

No que se refere aos sintomas apresentados por sexo; a febre foi o sintoma mais frequente em homens (90,5%) e em mulheres (96,7%), enquanto a cefaleia foi mais comum no sexo masculino (69%) do que no feminino (53,3%). Por outro lado, a náusea ocorreu mais nas mulheres (53,3 %) do que nos homens (47,6%), assim como o vômito também se manifestou com maior frequência nas mulheres (43,3%) (Figura 16).

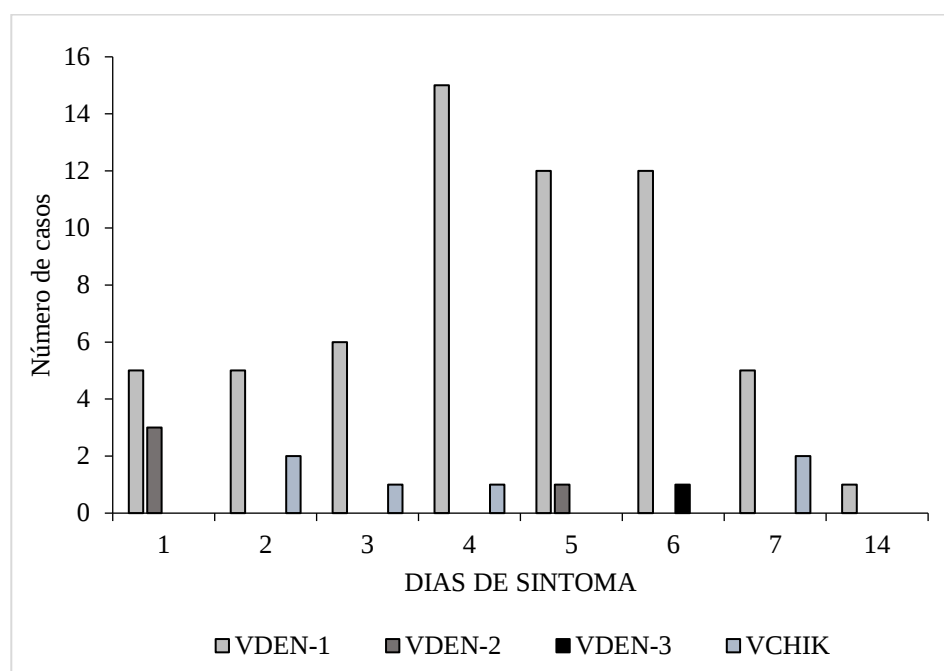
Figura 16- Número de casos positivos por sintoma e por gênero.



Fonte: Elaborada pela autora.

Sobre o número de dias do aparecimento dos sintomas para a data da coleta das amostras sanguíneas, a maior frequência foi observada com 4 (22,2%; 16), 5 (18,1%;13) e 6 (18,1%;13) dias de coleta. No entanto, vale destacar que amostras coletadas com 7 dias (5 positivas DENV-1 e 1 CHIKV) e 14 dias (1 Positiva DENV-1) de sintomas apresentaram positividade (Figura 17).

Figura 17- Número de casos por dia de sintomas para coleta por sorotipo causador.



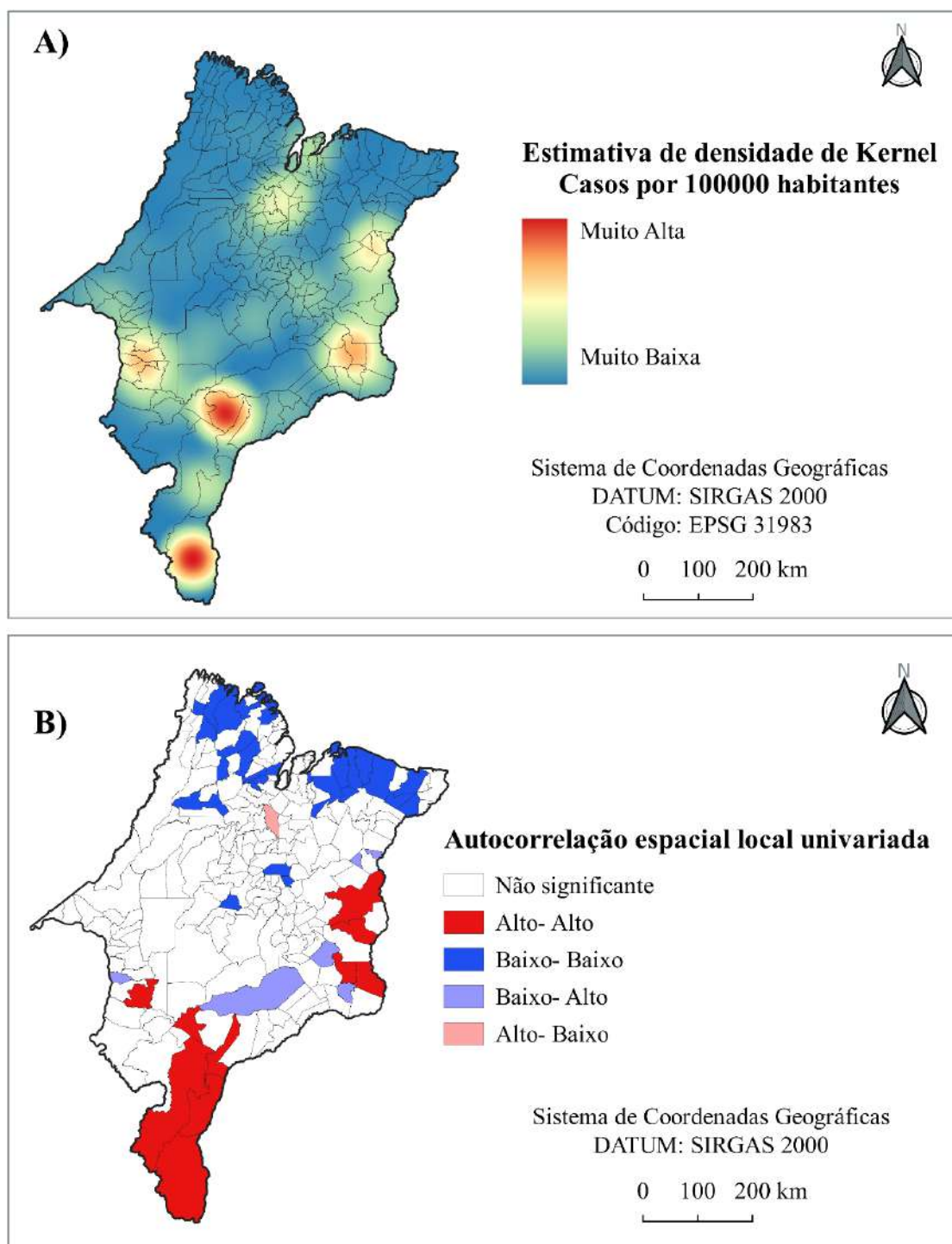
Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.1 Distribuição espacial da incidência de dengue no estado do Maranhão e em Caxias

A distribuição espacial da dengue no Maranhão foi analisada por meio da ferramenta de Kernel, que identificou áreas críticas na região Sul do Estado, nos municípios de Alto do Parnaíba, São Raimundo das Mangabeiras, Tasso Fragoso; um ponto na região Leste com elevada densidade, representado pelo município Lagoa do Mato, e dois com incidência intermediária identificados nos municípios de Caxias e Matões (Figura 18A).

Conforme a autocorrelação espacial local univariada, dez municípios foram considerados de alto risco de dengue no Maranhão: Alto Parnaíba, Balsas, Caxias, Fortaleza dos Nogueiras, Lagoa do Mato, Matões, Sambaíba, São Francisco do Maranhão, São João do Paraíso, Tasso Fragoso. Além destes, seis municípios estão em transição para conglomerados de alto risco: Afonso Cunha, Buriti Bravo, Campestre do Maranhão, Duque Bacelar, Mirador, Sucupira do Riachão (Figura 18B).

Figura 18 - Distribuição espacial da incidência de dengue no estado do Maranhão, 2022. **A)** Mapa da estimativa de densidade de Kernel da incidência bruta. **B)** Mapa dos indicadores locais de associação espacial para a incidência suavizada pelo método Bayesiano Empírico.



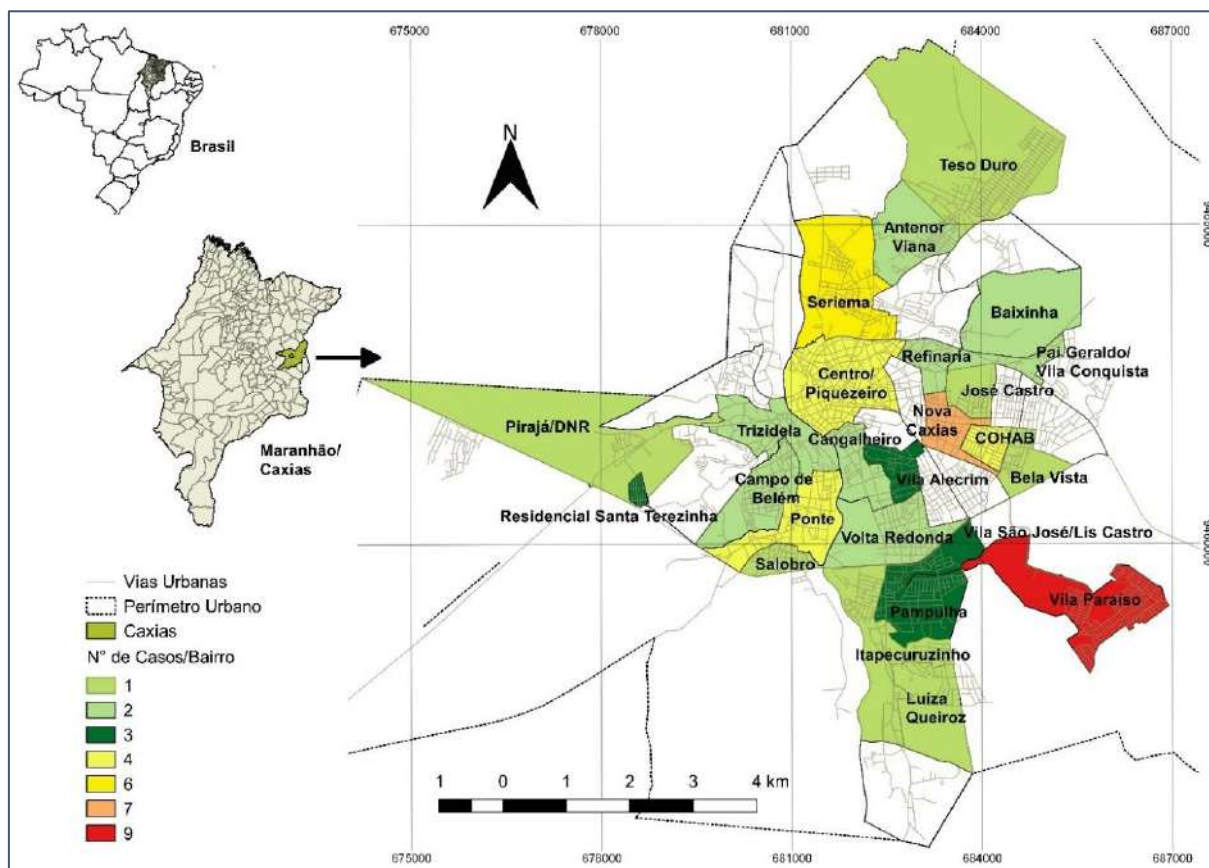
Fonte: IBGE, 2022.

Elaboração: Laboratório de Entomologia Médica – UEMA.

Quanto à distribuição dos casos de arboviroses no município de Caxias, foi feita a distribuição dos casos identificados como positivos nas amostras sanguíneas analisadas. Os casos positivos estão distribuídos em 28 bairros, sendo que o maior número foi observado na Vila Paraíso (9 casos), seguido pela Nova Caxias (7 casos), Seriema (6 casos), Cohab e Ponte,

estes dois últimos, cada um com quatro casos. Os outros bairros que integram os 28 que apresentaram positividade, exibiram menor número de casos positivos para arbovírus, um, dois e três casos (Figura 19). O DENV-3 foi detectado no bairro Vila São José, e a coinfeção de DENV-1 e CJKV na Nova Caxias.

Figura 19- Número de casos positivos detectados por bairro do município de Caxias em 2019 e em 2022.



Fonte: Limites municipais (IBGE, 2021).

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE O LIRAa E OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DENGUE

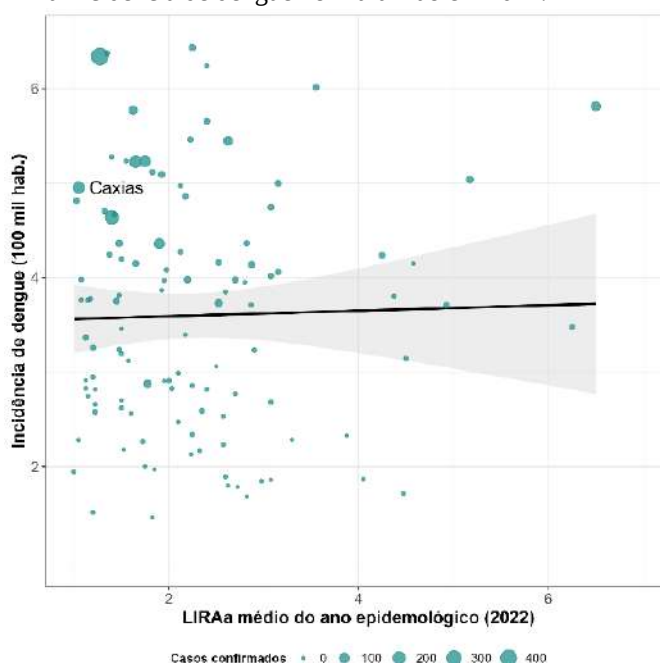
4.4.1 Análise do LIRAa sobre a incidência de dengue no Maranhão em 2022

O município de Tasso fragoso apresentou o maior índice do LIRAa de todo o Maranhão em 2022 (11,2) e elevada incidência de dengue (938,86 por 100 mil habitantes). O segundo maior índice do LIRAa do Estado foi observado em Porto Franco (10,2) que apresentou uma incidência igual a 334,94. São Raimundo das Mangabeiras que no primeiro LIRAa exibiu índice igual a 7,3, apresentou elevada incidência para a ocorrência de dengue (1.038,8). Os municípios que apresentaram os maiores índices do LIRAa no segundo, terceiro e quarto levantamento,

foram: Tutóia, Carutapera e Miranda do Norte, respectivamente, contudo, apresentaram baixas incidências de arboviroses no período.

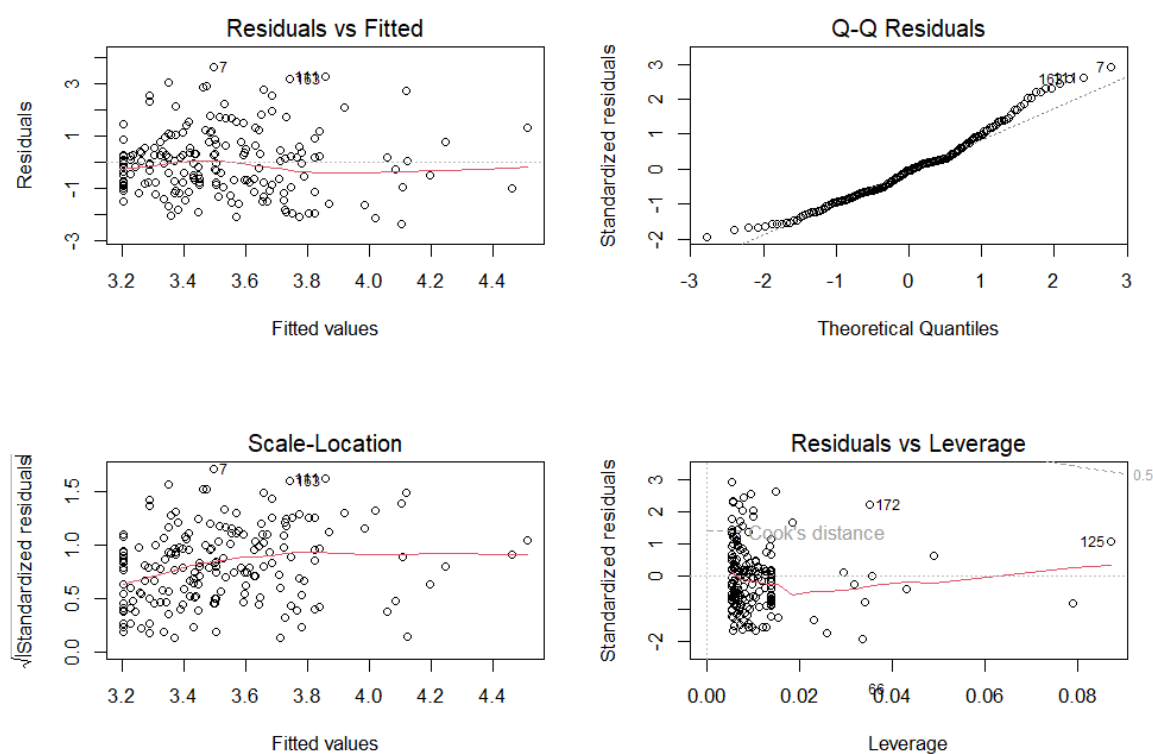
As análises apontaram que há efeito positivo do LIRAA sobre a incidência de dengue, evidenciando que há uma correlação positiva entre estas duas variáveis. ($F = 10,41-186$; $R^2 = 0,0352$; $p = 0,0062$; $y = 0,2019x + 3,2017$) (Figura 20). Todos os municípios que apresentaram em algum momento índices de infestação de *Ae. aegypti* em situação de alerta ou alto risco, também exibiram incidências de dengue ou de chikungunya elevadas.

Figura 20- Análise de regressão simples do LIRAA sobre a Incidência de dengue no Maranhão em 2022.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 21, os gráficos apresentam a dependência da incidência de dengue em relação à influência do LIRAA. A análise do resíduo dos modelos foi exibida de forma padronizada e independente. De modo geral, com base nas análises supracitadas o modelo foi considerado com um bom ajuste.

Figura 21- Análises de validação dos resíduos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Quando observados os dados do LIRAA, de 2020 a 2022, apenas dos municípios em que foram coletadas amostras sanguíneas; o município de Peritoró apresentou nos meses de setembro e novembro de 2021 índice considerado de alto risco de infestação do vetor, São Mateus em situação de alerta, enquanto Caxias e Codó, apresentaram situação satisfatória neste período. Em 2022 o município de Peritoró continuou com índices elevados conforme o levantamento realizado nos meses de janeiro e abril. Porém, uma redução foi observada em junho de 2022, e desde então, todos os municípios integrantes da presente pesquisa, apresentaram situação satisfatória em relação à infestação por *Ae. aegypti* (Tabela 7).

Tabela 7- Dados do LIRAA dos municípios de Caxias, Codó, Peritoró e São Mateus do período de 2020 a 2022.

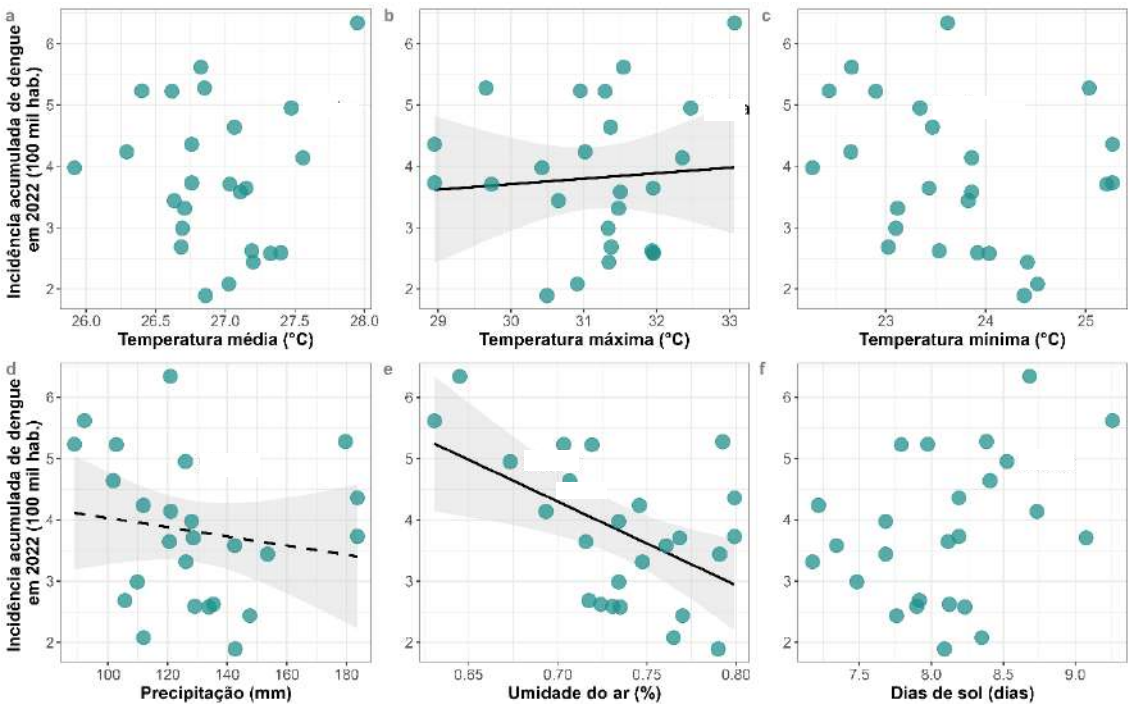
Municípios/ data e ano	jan/20 13-17	jan/21 25-29	mai/21 31/05 a 04/06	set/21 20-24	nov/21 08-11- CO 15-19	jan/22 24-28	abr/22 18-22	jul/22 04-08	out/22 17-21 (CAX 24-28)
CAXIAS	2,5	-	1,2	-	-	0,2	1,7	0,3	0,8
CODÓ	0,8	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	0,5	0,2	0,1
PERITORÓ	1,6	-	-	7,7	3,5	3,9	3,1	0,4	0,4
SÃO MATEUS	3,1	-	1,6	1,9	1,0	2,1	0,5	1,2	0,7

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2 Análise de dengue, LIRAA e variáveis climáticas

As análises mostraram que há efeito das variáveis ambientais sobre a incidência de dengue ($F = 9,8743-21$; $R^2 = 0,5259$; $y = -0,8334x + 0,0180x -35,4534x + 53,5194$). (Figura 22). Apresentaram significância a influência da temperatura máxima ($p = 0.0033$) e a umidade relativa do ar ($p = 0.0000$). Contudo, não houve efeito das variáveis ambientais sobre o LIRAA. ($F = 2,3912-23$; $R^2 = 0,0548$; $p = 0,1257$) (Tabela 8).

Figura 22- Casos notificados de dengue, variáveis climáticas e LIRAA dos municípios do Maranhão em 2022.



Fonte: Elaborada pela autora.

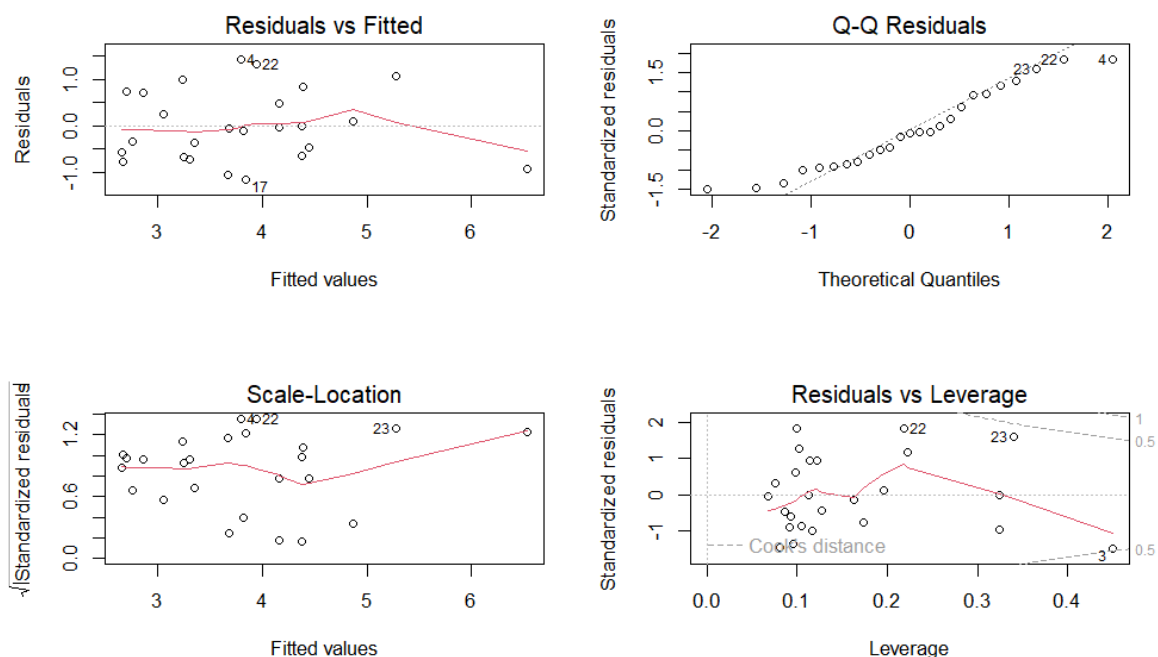
Tabela 8- Relação da incidência com as preditoras ambientais.

Modelo	Estimado	Erro padrão	t-valor	p-valor	Significância
Intercepto	53.5194	11.3113	4.7320	0.0001	***
Temperatura máxima	-0.8334	0.2511	-3.3190	0.0033	**
Precipitação	0.0181	0.0094	1.9230	0.0682	.
Umidade do Ar	-35.4534	6.6720	-5.3140	0.0000	***

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 23, os gráficos exibem as análises de validação dos modelos: validação do teste de fator de inflação da variância, distribuição normal, independência e variância constante dos resíduos. Os gráficos mostram que as análises de validação apresentaram modelo com ótimo ajuste.

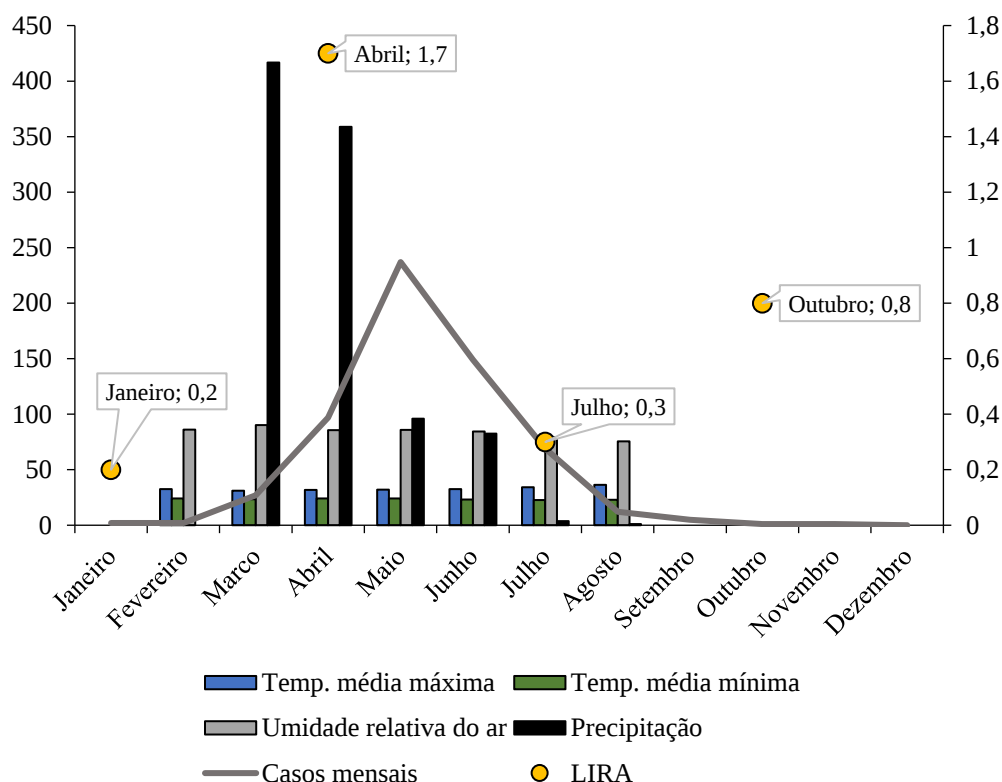
Figura 23- Valores das análises para validação do modelo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Quando considerados os dados climáticos somente do município de Caxias, a maior precipitação em 2020 ocorreu nos meses de março e abril (540,4 mm e 274 mm), com a notificação mensal mais elevada deste ano em abril (N=16). Em 2021 os meses de março e abril também exibiram as maiores notificações de casos de dengue (três casos em cada mês) e precipitação igual a 254,9 mm e 75,3 mm, respectivamente. É válido mencionar que, no período de 2020 a 2022 foram notificados 649 casos de dengue em Caxias, conforme os dados do Sistema de Agravos e Notificações (SINAN), com 602 registros foram feitos em 2022,

Em 2022, o maior número de casos mensalmente informado ocorreu em maio (N= 237). Este mês sucede os meses que exibiram as maiores precipitações deste ano, março (416,6 mm) e abril (358,8 mm). O LIRAA realizado em abril deste ano (1,7), evidenciou uma situação de alerta para a infestação de *Ae. aegypti* e ocorrência de dengue (Figura 24).

Figura 24 - Casos notificados de dengue, variáveis climáticas e LIRAA de Caxias em 2022.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando analisado o número de casos de dengue no município de Caxias com as variáveis climáticas no período de 2020 a 2022, foi observada uma correlação moderada e negativa entre número de casos de dengue com a temperatura média máxima ($r_s = -0,5819$; $p = 0,0002$) e fraca e negativa ($r = -0,3290$; $p = 0,10$) com a temperatura média mínima. Em relação ao número de casos e a umidade relativa do ar ($r_s = 0,49$; $p = 0,002$), uma correlação moderada e positiva foi observada ($r_s = 0,34$; $p = 0,10$) (Tabela 9).

Tabela 9- Correlação entre o número de casos de casos prováveis de dengue e variáveis climáticas do município de Caxias, Maranhão, no período de 2020 a 2022.

Pares de Variáveis	r_s	P
Número de casos de dengue X Temperatura média máxima	-0,5819	0,0002
Número de casos de dengue X temperatura média mínima	-0,3290	0,05
Número de casos de dengue X Umidade Relativa do Ar	0,4942	0,002
Número de casos de dengue X Precipitação Pluviométrica	0,3451	0,10

r_s = Correlação de Spearman; p = valor de p

Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

Os arbovírus são responsáveis por grandes epidemias de doenças tropicais negligenciadas todos os anos no Brasil, gerando impactos notáveis, principalmente nas populações mais vulneráveis. Neste estudo, foi detectada a circulação de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e CHIKV em áreas do interior do Maranhão, estado que concentra a maior proporção de pessoas em situação de extrema pobreza no Brasil (BARRETO *et al.*, 2024). A co-circulação destes arbovírus na região, resulta em sérios desafios para o setor de saúde, uma vez que culmina no adoecimento de um numeroso grupo de pessoas, e na sobrecarga de atendimentos médicos em postos de saúde e hospitais.

O município de Caxias é o quinto mais populoso do estado (IBGE, 2022). A evidência de circulação de três sorotipos virais da dengue na região gera grandes preocupações, tendo em vista que, a co-circulação aumenta as chances de quadros mais críticos da doença, principalmente naquelas pessoas que já foram anteriormente infectadas pelo DENV. Além disso, as análises também evidenciam um caso de infecção simultânea por DENV-1 e CHIKV neste município. Apesar de casos como este não serem muito registrados, há indícios de que podem favorecer a gravidade das doenças, em decorrência da exacerbação dos sintomas por elas causados (DOS SANTOS MARINHO *et al.*, 2020).

Adicionalmente, o DENV-1 foi identificado nos municípios de Codó, Peritoró e São Mateus do Maranhão, o que demonstra a disseminação deste sorotipo no estado e corrobora com os dados nacionais para o período. A análise dos dados de vigilância laboratorial em todo o país mostrou que a epidemia de dengue brasileira em 2022, foi dominada por DENV-1 na maioria dos estados, e alerta para o potencial epidêmico deste sorotipo país (BRASIL, 2022).

O sequenciamento genômico realizado em três amostras de Caxias (acesso Genbank PP626442, PP626441 e PP626440) e em uma amostra de Codó (acesso Genbank PP626439) indicou o genótipo V do DENV-1. Este dado é reforçado pelos achados de Bruycher-Nogueira *et al.* (2018), que atestaram a continuidade da forte presença desse genótipo no país. Além disso, a circulação de um novo clado do DENV-1 foi recentemente revelada pelos estudos de Fritsch *et al.* (2023), em pesquisa também realizada no Nordeste do Brasil. Devido à baixa carga viral presente nas amostras de DENV-2 e DENV-3, não foi possível realizar o sequenciamento genômico para estes sorotipos no presente estudo.

O DENV-2 que ficou cerca de 10 anos sem causar epidemias no Brasil, retornou ao país em 2019, sendo identificado no estado de São Paulo. Nesta investigação, este sorotipo foi detectado neste mesmo ano em Caxias, porém, no Maranhão, sua circulação foi registrada somente nos municípios de Barra do Corda (5 casos) e Grajaú (1 caso), sendo encontrado

novamente em 2022, nos municípios de São Luís, São José de Ribamar, Timon e Caxias (BRASIL/ SSE-MA, 2022; BRASIL/ SINAN-DATASUS, 2024). É válido destacar que em Caxias, em coletas realizadas no período de setembro e novembro de 2016; janeiro, março, maio e julho de 2017 por Aragão *et al.* (2019), o DENV-2 pertencente ao genótipo Asiático/Americano foi detectado em espécimes de *Ae. aegypti*.

Há fortes indícios que DENV-2 esteja associado a maior gravidade dos casos. No presente estudo este sorotipo desencadeou principalmente, febre, vômito e artralgia, enquanto nas infecções causadas por DENV-1, a febre foi mais frequente, seguida por cefaleia, mialgia e náuseas. Uma extensa revisão sistemática que incluiu mais de 100 artigos, mostrou relação da infecção por DENV-2 com um risco 1,81 vezes maior de dengue grave em crianças (>18 anos) comparado ao DENV-1, 2,24 vezes maior comparado ao DENV-3 e 1,72 vezes comparado ao DENV-4 (SANGKAEW *et al.*, 2021). A detecção de DENV-2 principalmente em crianças observada neste estudo, sinaliza que, apesar dos esforços dos setores de saúde para a identificação e contenção das arboviroses, há a necessidade de apoio laboratorial devido à grande demanda e intensificação da vigilância entomológica.

Sobre a detecção de DENV-3, o achado deste sorotipo consiste em alerta para toda a população. Após anos sem circular no Brasil, este ressurgiu no país em 2023, quando foram detectados três casos autóctones de infecções por DENV-3 (Genótipo III) em Roraima, e um caso importado do Suriname foi identificado no Paraná (NAVECA *et al.*, 2023). O retorno de DENV-3 gerou grande preocupação devido ao risco de uma nova epidemia da doença tendo em vista o elevado número de pessoas susceptíveis à infecção causada por ele no momento. A detecção deste sorotipo em Caxias, pode indicar a sua disseminação para outras áreas.

A evidência da circulação de três sorotipos virais da dengue na região gera grande inquietação, visto que a cocirculação viral aumenta as chances de formas graves da doença ocorrerem, principalmente em pessoas que previamente já foram infectadas pelo DENV (ARAÚJO *et al.*, 2012).

Acerca da identificação do genótipo ECSA do CHIKV (acesso Genbank PP681186) neste estudo, verifica-se a manutenção da circulação viral no estado, que desde 2014 se mantém causando surtos em todo o país. Este genótipo foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2014, na Bahia, Nordeste do Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2001), e desde então se espalhou para outros estados como Alagoas (2016) (TANABE *et al.*, 2018), Piauí (2016–2017) (CARDOSO *et al.*, 2019) e Maranhão (2017) (ARAGÃO *et al.*, 2019), este último sendo registrado no município de Codó. Também foi identificado na região Sudeste, no Rio de Janeiro (2016–2018) (XAVIER *et al.*, 2019), e na região Norte, estado do Pará (2017) (CRUZ *et al.*, 2020). Estes dados mostram que esta linhagem é a principal em circulação no país.

No que se refere a caracterização epidemiológica dos pacientes com resultado positivo, a maior positividade de infecções em homens, também foi observada no estudo realizado por Viana *et al.* (2018) que apresentou uma discreta predominância do sexo masculino. Contudo, resultados divergentes foram encontrados por Bavía *et al.* (2020) em estudo realizado no Sul do Brasil. A faixa etária mais afetada neste estudo foi a de 5 a 9 anos, seguida pela idade de 10 a 14, correspondentes às pessoas que recebem cuidados dos pais ou responsáveis e que buscam atendimento médico em caso de prostração. Apesar desse resultado, representações etárias mais equivalentes a adultos com idades entre 20 e 59 têm sido apontadas por Chiaravalloti-Neto *et al.* (2019) no Estado de São Paulo e por Nunes *et al.* (2019), como as idades mais acometidas da doença e manifestações fatais. Já a maior ocorrência da doença em pardos pode estar relacionada a elevada autodeclaração da população a essa etnia no estado do Maranhão (SILVA *et al.*, 2022).

A maior porcentagem dos casos identificada na zona urbana corrobora principalmente com a ecologia do vetor, visto que *Ae. aegypti* tem preferência por ambientes urbanos onde dispõe do convívio humano com oferta de fontes sanguíneas, e tem sua dispersão favorecida, sendo raramente encontrado em ambientes silvestres (ZARA *et al.*, 2016).

Quanto aos sintomas apresentados por ambos os sexos, observou-se que, a febre foi o sintoma mais frequente, seguido por cefaleia e náuseas. Por outro lado, Aragão, Bezerra e Pinheiro (2018) observaram associação significativa entre os casos de dengue e o exantema

Conforme informações do Ministério da Saúde, amostras coletadas a partir do sétimo dia até o décimo apresentam baixíssima chance de serem detectadas por RT-PCR (BRASIL, 2016). Entretanto, no presente estudo, a observação sobre o número de dias, desde o aparecimento dos sintomas até a data da coleta evidenciou que a carga viral apresentada pelos indivíduos durante o período de viremia foi suficiente para que DENV-1 e CHIKV fossem identificados nas amostras com sete dias de sintomas, e no caso particular de DENV-1, foi achado com até 14 dias após o início das manifestações clínicas da dengue. Contudo, é válido ressaltar que, a caracterização clínica e epidemiológica dos pacientes foi feita a partir dos dados obtidos nas fichas de identificação, e portanto, pode apresentar viés em sua interpretação, caso não seja preenchida corretamente.

Outro agravante, relaciona-se a ampla distribuição dos casos de arboviroses no município de Caxias. Tratando-se isoladamente da dengue, as amostras positivas se apresentaram em todas as regiões do município, com o maior número de detecções na Vila Paraíso, seguido pela Nova Caxias, Seriema, COHAB e Ponte. Vale destacar que o DENV-3 foi identificado no bairro Vila São José, um bairro de saneamento básico precário e que apresenta elevada vulnerabilidade social e ambiental. É sabido que as condições

socioambientais dos bairros, especialmente as decorrentes da ação antrópica, como práticas de jogar lixo em terrenos baldios, a exemplo de garrafas e outros materiais que acumulam água da chuva, os quais são determinantes para o aumento de casos de dengue (DOS SANTOS FONSECA *et al.*, 2019).

A Vila Paraíso é um grande residencial que possui menos de dez anos de construção, está localizado em área circundada por vegetação densa, com grande concentração de mosquitos e depósitos para o armazenamento de água nas residências, devido às irregularidades no fornecimento desse recurso. Além disso, no primeiro e segundo LIRAAs realizados no primeiro semestre de 2022, apresentou-se em situação de alerta (1,4%) para a infestação do vetor *Ae. aegypti* (BRASIL/SSC, 2022). Sabendo-se que a dengue é uma arbovirose urbana, decorrente da concentração populacional, e que as cidades comprovadamente possuem ambientes favoráveis à disseminação do vetor (DOS SANTOS FONSECA *et al.*, 2019). Áreas com intenso fluxo migratório e urbanização desordenada com loteamentos irregulares, desmatamento, e ocupação de áreas verdes podem potencializar a adaptação de insetos em áreas urbanas e a disseminação de patógenos (DANTAS *et al.*, 2020).

A realização deste trabalho contribui para reforçar a importância da realização fidedigna do LIRAA nos municípios brasileiros, e ao mesmo tempo reafirma que esta técnica, se devidamente realizada pelos agentes, é confiável para subsidiar políticas públicas locais direcionadas às ações de combate ao vetor e prevenção às arboviroses. A associação observada entre o elevado índice do LIRAA e o aumento do número de casos de dengue no Maranhão, fortalece ainda mais o papel deste instrumento no monitoramento de *Ae aegypti*, para orientar a adoção de medidas preventivas de surtos de arboviroses, especialmente da dengue.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo realizado por Rivas *et al.* (2018) no Sul do Brasil, os autores concluíram que as informações obtidas através do LIRAA permitem que as ações de combate ao vetor sejam orientadas de forma mais eficaz. Ribeiro *et al.* (2021) ao realizar análise comparativa entre os valores dos Índices de Infestação Predial - IIPs e as Taxas de Incidência de 2011, 2012, 2013, 2015 e 2016, também obtiveram correlação significativa.

Apesar de alguns autores colocarem sob suspeita a perspectiva de o LIRAA ser uma referência para o norteamto das ações de controle (CHIARAVALLLOTI NETO *et al.*, 1999), recomendarem ajustes na técnica e utilização de políticas complementares para incrementar a sua capacidade preditiva (ENSLIN; LIMA NETO; CASTRO, 2020). As análises realizadas neste trabalho, mostram que as informações adquiridas através do LIRAA podem ser utilizadas para indicar as regiões com maior possibilidade de focos no território.

Os dados revelaram eficiência no efeito preditor do LIRAA em relação à incidência de dengue no Maranhão e a modelagem espacial indicou as áreas de maior risco de dengue e prioritárias para a intensificação da vigilância entomoepidemiológica no Estado. Ressalta-se, portanto, a importância da avaliação do LIRAA enquanto ferramenta para monitorar o mosquito *Ae. aegypti*, uma vez que os resultados obtidos podem refletir na redução dos casos de arboviroses nas respectivas áreas.

A distribuição espacial da dengue, evidenciou os pontos mais incidentes na região Sul do Maranhão. Este resultado corrobora com os dados da Secretaria de Saúde do Maranhão (SES), segundo a qual, estes mesmos municípios apresentaram elevadas incidências de dengue em 2022. A autocorrelação espacial univariada indicou dez municípios como áreas de maior risco de dengue no Estado, e seis que estão em transição para estes conglomerados. Estas informações são importantes para alertar que, a incidência desta arbovirose em um município pode favorecer a ocorrência em áreas próximas. Em outros termos, os dados revelam os municípios que se apresentam como áreas prioritárias para intensificação da vigilância entomoepidemiológica no Estado, e evidenciam aqueles que estão em transição para áreas de alto risco, e que, portanto, necessitam fortalecer as ações voltadas para a prevenção.

A modelagem das variáveis climáticas em todo estado, mostrou que a umidade relativa do ar e a temperatura máxima influenciam positivamente a ocorrência dos casos de dengue. A este respeito, ressalta-se que, a temperatura é comprovadamente uma variável climática que regula a ocorrência da dengue, com o limiar térmico favorável à ocorrência da doença entre 19°C a 31°C e 20°C a 30°C (VIANA *et al.*, 2018). Outros autores também relataram que no início do ano, quando a umidade relativa do ar é mais elevada devido ao período chuvoso, o aumento do número de casos de dengue é favorecido (COSTA *et al.*, 2021).

A análise das variáveis climáticas com os casos de dengue notificados somente em Caxias-MA em 2022, mostrou correlação positiva entre a umidade relativa do ar e o número de casos de dengue notificados, sugerindo uma inter-relação entre estas variáveis. Esses achados são reforçados por outros estudos também realizados neste município, onde o período chuvoso, que apresenta maior umidade relativa do ar, é mais propício à infestações de *Ae. aegypti*, que tem o desenvolvimento de seu ciclo facilitado (BEZERRA *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2021).

Em relação à análise da temperatura em Caxias, a correlação negativa observada entre a máxima e mínima com o número de casos de dengue, indica que umas das variáveis sofreu aumento e outra redução. Este resultado evidencia mais uma vez o papel da temperatura como reguladora da ocorrência dessa arbovirose, cujo limiar térmico favorável para a ocorrência da doença está entre 19°C a 31°C e 20°C a 30°C (VIANA *et al.*, 2018).

Os dados desta pesquisa caracterizam a situação epidemiológica das arboviroses no Maranhão nos últimos anos, e despertam para a necessidade de ações de prevenção e controle em resposta a essas doenças. No entanto, o estado enfrenta uma série de dificuldades para prevenção das arboviroses urbanas, que vão desde a elevada dispersão do vetor *Ae. aegypti*, beneficiada principalmente pela grande disponibilidade de criadouros do tipo armazenamento que são muito utilizados pela população local para realização de atividades domésticas (ANDRADE *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2021); e as limitações na realização do diagnóstico laboratorial, concentrado principalmente na capital, São Luís, que mesmo diante dos esforços dos órgãos de saúde competentes, pode gerar demora na obtenção dos resultados e, consequentemente, atraso nas estratégias de manejo e controle.

Vale ressaltar que, o estado do Maranhão está situado em uma área de grande importância epidemiológica no contexto das arboviroses. A Oeste, o estado faz divisa com o Pará, onde circula ampla variedade de arbovírus de ciclo silvestre, tais como os vírus do Nilo Ocidental, Rocio e Ilhéus (NUNES-NETO, *et al.*, 2023; RAMOS *et al.*, 2022). A Leste, o Maranhão faz divisa com o Piauí, que além das arboviroses de ciclo urbano, vem registrando casos humanos de febre do Nilo Ocidental (VIEIRA *et al.*, 2015).

A proximidade territorial do estado do Maranhão com áreas endêmicas para arboviroses de ciclos silvestres gera grande preocupação devido a possibilidade de inclusão de outros arbovírus além dos arbovírus urbanos que já vêm sendo registrados no estado, o que poderia causar um grande colapso nos sistemas de saúde locais. A disseminação destes arbovírus pode ocorrer devido ao constante desmatamento evidenciado na região do bioma Amazônico, que favorece à dispersão de vetores, bem como pela existência da rodovia BR-316 que corta o estado do Maranhão, ligando o Pará (Norte) ao estado de Alagoas (Nordeste) (LOWE, *et al.*, 2020; BRASIL/DNIT, 2024). Recentemente, o Maranhão já vem registrando, também, casos de outra importante arbovirose, a febre do Oropouche (BRASIL/MS, 2024).

Esses fatores combinados destacam a importância da detecção precoce e do monitoramento contínuo de arbovírus clinicamente importantes no Brasil e em outros países, para prevenir a ocorrência de epidemias e minimizar a exacerbação dos impactos para a saúde pública (NAVECA *et al.*, 2023).

A presente pesquisa fornece informações sobre os arbovírus que estão circulando nos municípios em estudo, com ênfase para o município de Caxias, assim como também apresenta associações de dados entomológicos, epidemiológicos e climáticos que servirão de subsídio para a tomada de decisões pertinentes ao controle do vetor e das arboviroses ocorrentes nestas e em outras áreas. Além disso, este estudo apresentou dados e técnicas importantes que podem auxiliar as autoridades de saúde na elaboração de estratégias pontuais, assim como também

reforça a necessidade da adoção de ações preventivas mais eficazes, que efetivamente reduzam o impacto causado pelo elevado número de casos e a gravidade das epidemias de dengue e de outras arboviroses.

6 CONCLUSÕES

- A investigação da presença de *Orthoflavivirus denguei*, *Orthoflavivirus zikaense* e *Alphavirus chikungunya* em amostras suspeitas de infecção por arbovírus, permitiu a identificação de três sorotipos de dengue DENV-1, DENV-2 e DENV-3, CHIKV, e uma coinfeção entre DENV-1 e CHIKV confirmando a circulação desses vírus no interior do Maranhão;
- O maior número de amostras coletadas e positivas foi obtido em Caxias, onde houve a detecção de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e CHIKV, e de uma coinfeção DENV-1 e CHIKV;
- O DENV-3 foi detectado em uma amostra oriunda do bairro Vila São José, um bairro periférico de Caxias-MA;
- O genótipo V do DENV-1 foi constatado em quatro amostras analisadas e o genótipo ECSA do CHIKV em uma amostra.
- A caracterização dos pacientes positivos mostrou que os homens, pardos, na faixa etária de 5 a 9 anos, e os moradores da zona urbana foram os mais acometidos por arboviroses.
- A febre foi o sintoma mais frequente em ambos os sexos, seguida por cefaleia em homens, mialgia e náusea em mulheres.
- O maior número de casos positivos em Caxias, foi observado na Vila Paraíso, seguido pela Nova Caxias e Seriema.
- As análises estatísticas do LIRAA de todos os municípios do Maranhão em 2022 evidenciaram efeito positivo sobre a incidência de dengue;
- A modelagem de variáveis climáticas mostrou que a umidade relativa e a temperatura máxima influenciam positivamente na ocorrência de casos de dengue.
- A pesquisa demonstra a importância da realização de estudos de monitoramento virológico, entomológico e epidemiológico que forneçam um panorama da situação das arboviroses nas áreas em que são endêmicas e favoreçam a elaboração de medidas preventivas eficazes que efetivamente colaborem com o controle e a redução dos surtos e epidemias dessas doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. S.; COTA, A. L. S.; RODRIGUES, D. F. Saneamento, Arboviroses e Determinantes Ambientais: impactos na saúde urbana. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 3857-3868, 2020.
- ANJOLETTE, Aline Falcão Filgueiras; DA GRAÇA MACORIS, Maria de Lourdes. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 13, n. 156, p. 19-29, 2016.
- ARAGÃO, H. S. S.; BEZERRA, J. M. T.; PINHEIRO, V. C. S. Avaliação de casos de dengue em crianças no município de Caxias, Maranhão, por meio do método de caso suspeito. **Revista Eletrônica Acervo Saúde/Electronic Journal Collection Health ISSN**, v. 2178, p. 2091, 2018.
- ARAGÃO, Carine Fortes et al. Natural infection of *Aedes aegypti* by chikungunya and dengue type 2 virus in a transition area of north-northeast Brazil. **Viruses**, v. 11, n. 12, p. 1126, 2019.
- ARAÚJO, Josélio Maria Galvão de et al. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. 2012.
- BANKEVICH, Anton et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, [S. l.], v. 19, n. 5, 2012.
- BARRETO, F. A.; FRANÇA, J. M. S.; MIRO, V. Hugo., SANTOS, A. **Pós pandemia, extrema pobreza cai à metade no Brasil, e NE é 50% da redução**. Blog do IBRE. 24 jun 2024. Disponível em: <https://blogdoibre.fgv.br/posts/pos-pandemia-extrema-pobreza-cai-metade-no-brasil-e-ne-e-50-da-reducao#:~:text=Economia%20Regional-,P%C3%B3s%20pandemia%2C%20extrema%20pobreza%20cai%20%C3%A0%20metade%20no%20Brasil%2C%20e,NE%20%C3%A9%20.> Acesso em: 10 de agosto de 2024.
- BARTHEL, Anne et al. Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus?. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 3, p. 415-417, 2013.
- BARTHOLOMEEUSEN, K., et al. Chikungunya fever. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 17, 2023.
- BAVIA, Lorena et al. Epidemiological study on dengue in southern Brazil under the perspective of climate and poverty. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2127, 2020.
- BEZERRA, J. M. T., et al. Breeding sites of *Aedes aegypti* (Linnaeus)(Diptera, Culicidae): a study about the containers diversity in dry and rainy seasons in a dengue-endemic city/criadouros de *Aedes aegypti* (Linnaeus)(Diptera, Culicidae): estudo sobre recipientes em estações seca e chuvosa em cidade endêmica para dengue. 2018.
- BONA, A. C. D.; TWERDOCHLIB, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Detecção do vírus da dengue em populações naturais de mosquitos. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 51, n. 2, p. 107-116, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entológica do *Aedes aegypti* no Brasil – LIRA: Metodologia dos índices de Breteau e predial. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle da Dengue. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. Brasília- DF, 2016.

BRASIL Ministério da Saúde. Manual de Vigilância Sentinela de Doenças Neuroinvasivas por Arbovírus; Ministério da Saúde: Brasília, Brasil, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília – DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 46, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v.51, n. 48, 2020.

BRASIL, 2022. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/#:~:text=Dados%20sujeitos%20a%20altera%C3%A7%C3%A3o,-Figura%203%20Distribui%C3%A7%C3%A3o&text=At%C3%A9%20a%20SE%2052%20de%202022%20ocorreram%20174.517%20casos%20prov%C3%A1veis,para%20o%20mesmo%20per%C3%ADodo%20analisado>.

BRASIL 2023. PAINEL DE MONITORAMENTO DAS ARBOVIROSES. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>

BRASIL/MS, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias-para-os-estados/maranhao/2023/maio/maranhao-registrou-mais-de-3-1-mil-casos-provaveis-de-dengue-este-ano>

BRASIL. CENTRO DE OPERAÇÃO DE EMERGÊNCIAS (COE). Informe Semanal. Edição Nº 07 | SE 01 a 12/2024. Atualizado em: 27/03/2024 <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/arboviroses/informe-semanal/informe-semanal-no-07-coe>

BRASIL. DEPARTAMENTO NACIONAL DE INFRAESTRUTURA DE TRANSPORTES - DNIT. “Pavimentação da BR-316 no Estado de Alagoas prevê sete novas pontes”. *Departamento Nacional de Infraestrutura de Transportes - DNIT*, <https://www.gov.br/dnit/pt-br/assuntos/noticias/pavimentacao-da-br-316-no-estado-de-alagoas-preve-sete-novas-pontes> . Acesso em 15 de agosto de 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Ministério da Saúde confirma dois óbitos por oropouche no país”. *Ministério da Saúde*, <https://www.gov.br/saude/pt-br/canais-de-atendimento/sala-de-imprensa/notas-a-imprensa/2024/ministerio-da-saude-confirma-dois-obitos-por-oropouche-no-pais>. Acesso em 3 de setembro de 2024.

BRUYCKER-NOGUEIRA, Fernanda et al. DENV-1 Genotype V in Brazil: Spatiotemporal dispersion pattern reveals continuous co-circulation of distinct lineages until 2016. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 17160, 2018.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature methods**, v. 12, n. 1, p. 59-60, 2015.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. **The Lancet Infectious Diseases**, p. 653–660, 2016.

CALVO, E. P. *et al.* Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and Zika viruses in febrile patients. *Acta Tropica*, Amsterdam, v. 163, p. 32-37, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.021>. Acesso em: 2 nov. 2024.

CARDOSO, Felipe Daniel et al. Circulation of Chikungunya virus East-Central-South Africa genotype during an outbreak in 2016-17 in Piauí State, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, p. e57, 2019.

CARRERA, J., et al. Flavivirus replication kinetics in early-term placental cell lines with different differentiation pathways. **Virology Journal**, v. 18, p. 1-9, 2021.

CASTRO, L. P. R.; NUNES, C. R. INCIDÊNCIA DA DENGUE NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DO CALÇADO-ES. **Múltiplos Acessos-Revista Científica Interdisciplinar**, v. 1, n. 1, 2017.

CDC. vírus chikungunya. 2019

CDC. vírus Zika. 2016

CHEN, Rubing; VASILAKIS, Nikos. Dengue – quo tu et quo vadis?. **Vírus**, v. 3, n. 9, pág. 1562-1608, 2011.

CHIARAVALLOTTI-NETO, Francisco et al. Seroprevalence for dengue virus in a hyperendemic area and associated socioeconomic and demographic factors using a cross-sectional design and a geostatistical approach, state of São Paulo, Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 19, p. 1-14, 2019.

CLETON, N., et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.

CLIMATE-DATA.ORG. Clima: Maranhão. Disponível em: < <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/maranhao-206/>> Acesso em: 10 de maio de 2023.

CONSOLI, Rotauro AGB; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

COSTA, M. S.; ARAÚJO, R. A. F. Climate Variability: Precipitation as a Study Parameter for Dengue Cases in the Coast, Wilderness, Mountain Range and South Cearense Between 2007 and 2019. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 36, p. 591-601, 2021.

CRUZ, A. C. R.; VASCONCELOS, P. F. C. Arbovírus no Brasil. **Biológico, São Paulo**, v. 70, n. 2, p. 45-46, 2008.

DANCEY, Christine; REIDY, John. **Estatística Sem Matemática para Psicologia-7**. Penso Editora, 2018.

DANTAS, S., et al. Dengue: perfil epidemiológico dos casos notificados no município de Cacoal-RO, na região Amazônica, Brasil, de 2015-2017. **Revista Eletrônica Acervo Enfermagem**, v. 6, p. e5298-e5298, 2020.

DESGRAUPES, S., et al. Mother-to-child transmission of arboviruses during breastfeeding: from epidemiology to cellular mechanisms. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1312, 2021.

DE SOUSA, Mariana Maryelle Ferreira et al. Detection and differentiation of dengue virus serotypes by one-step multiplex reverse transcription PCR assays. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 227-246, 2020.

DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saúde pública**, v. 51, p. 30, 2017.

DE SOUSA, S. C. et al. Factors associated with the occurrence of dengue epidemics in Brazil: a systematic review. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 45, p. 1, 6 ago. 2021

DOS SANTOS ANDRADE, Aylane Tamara; BEZERRA, Juliana Maria Trindade; PINHEIRO, Valéria Cristina Soares. Characterization of the Proliferation Sites of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Artificial Breeding Sites of Caxias, Maranhão, Brazil. In: **Life Cycle and Development of Diptera**. IntechOpen, 2019.

DOS SANTOS FONSECA, L. M., et al. Detection of Oropouche virus in saliva and urine samples of febrile patients in Salvador, Bahia, Brazil. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, p. JJID. 2019.296, 2019.

DOS SANTOS MARINHO, S. R., et al. Detection of coinfection with Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 in serum samples of patients in State of Tocantins, Brazil. **Journal of infection and public health**, v. 13, n. 5, p. 724-729, 2020.

EL COSTA, H., et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 35296, 2016.

ENSLEN, Andrew W.; LIMA NETO, Antonio S.; CASTRO, Marcia C. Infestation measured by *Aedes aegypti* larval surveys as an indication of future dengue epidemics: an evaluation for Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 7, p. 506-512, 2020.

ESPINAL, M. A. et al. Emerging and reemerging *Aedes*-transmitted arbovirus infections in the region of the Americas: implications for health policy. **American journal of public health**, v. 109, n. 3, p. 387-392, 2019.

FANTINATO, F. F. S. T. et al. Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 683-690, 2016.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**. v. 351, n. 6280, p. 1-9. 25 mar. 2016.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. Culicidologia Médica: Identificação. **Biologia, Epidemiologia**, v. 2, p. 549, 2002.

FREIRE, Bruno Soares et al. Incidência do novo Coronavírus e das arboviroses Dengue, Zika e Chikungunya no estado de Pernambuco. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 4, p. 19065-19088, 2023.

FREITAS, D. A. et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 12, p. e0242367, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367>. Acesso em: 10 out. 2024.

FRITSCH, Hegger et al. Phylogenetic Reconstructions Reveal the Circulation of a Novel Dengue Virus-1V Clade and the Persistence of a Dengue Virus-2 III Genotype in Northeast Brazil. **Viruses**, v. 15, n. 5, p. 1073, 2023.

GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Américas. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 2, p. 269-273, 2016.

GÉRARDIN, Patrick et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. **PLoS medicine**, v. 5, n. 3, p. e60, 2008.

GIRARD, M. et al. Arboviruses: A global public health threat. **Vaccine**, v. 38, n. 24, p. 3989-3994, 2020.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B. Lee C.K. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: Transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clin Exp Vaccine Res**, v. 3, p. 58-77, 2014.

GONÇALVES, Caroline M. et al. Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2014.

GONÇALVES NETO, V. S.; REBÊLO, J. M. M. Epidemiological characteristics of dengue in the Municipality of São Luís, Maranhão, Brazil, 1997-2002. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1424-1431, 2004.

GOULD, K. S. Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2004, n. 5, p. 314, 2004.

GOULD, E., et al. Emerging arboviruses: why today?. **One health**, v. 4, p. 1-13, 2017.

GUERRA NUNES, P. C., et al. 30 years of fatal dengue cases in Brazil. **BMC Public health**, v. 19, 2019. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>

GUBLER, Duane J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13-24, 2001.

HENCHAL, Erik A.; PUTNAK, J. Robert. The dengue viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, genetics and evolution**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2003.

HUANG, Y. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 22, 2019.

HUSON, M. A.M., et al. Predictive value of the qSOFA score in patients with suspected infection in a resource limited setting in Gabon. **Travel medicine and infectious disease**, v. 15, p. 76-77, 2017.

ICTV. Relatório completo do ICTV. 2023.. Online (10º): www.ictv.global/report/flaviviridae

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. v. 40, n. 3, p. 531–544, 1978. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/690610/>;

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estados: Maranhão**, Brasil, 2022. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/> >. Acesso em: 10 nov. 2022.

JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 2, p. 158-161, 2002.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. M. multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KHETARPAL, N., et al. Dengue fever: causes, complications, and vaccine strategies. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.

KUNO G, CHANG G. J. Sequenciamento completo e caracterização genômica dos vírus Bagaza, Kedougou e Zika. **Arco Virologia**. v.152, p. 687–96., 2007.

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

LANCIOTTI, Robert S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 764, 2007.

LEPARC-GOFFART, I., et al. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.

LETA, S., et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25-35, 2018.

LIMA-CAMARA T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica* 2016; 50:36.

LINDENBACH, Brett D. Reinventing positive-strand RNA virus reverse genetics. In: **Advances in Virus Research**. Academic Press, 2022. p. 1-29.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In KNIPE, D. M. et al. **Fields Virology**, p. 1101– 1152, 2007.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 10-10, 2014.

LOWE, Rachel, et al. “Arbovírus emergentes na floresta tropical amazônica urbanizada”. *BMJ*, novembro de 2020, p. m4385. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1136/bmj.m4385>.

MARANHÃO. SECRETARIA DE SAÚDE DO MARANHÃO/BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 52/2022). Disponível em: <https://www.saude.ma.gov.br/boletins-epidemiologicos-arboviroses/> Acesso em: 05 de agosto de 2023.

MARINHO, Penélope Saldanha et al. A review of selected Arboviruses during pregnancy. **Maternal Health, Neonatology and Perinatology**, v. 3, p. 1-9, 2017.

MARANHÃO. Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão, Situação Epidemiológica da Dengue. Sala de Situação da Dengue e outras Arboviroses, 01/03/2024.

MEHTA, N., et al. A Direct from Blood/Plasma Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction for Dengue Virus Detection in Point-of-Care Settings. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1534, 2019.

MOREIRA, José et al. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 5, p. 296-305, 2017.

MURRAY, Natasha Evelyn Anne; QUAM, Mikkel B.; WILDER-SMITH, Annelies. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical epidemiology**, p. 299-309, 2013.

MYUNG, In Jae. Tutorial on maximum likelihood estimation. **Journal of mathematical Psychology**, v. 47, n. 1, p. 90-100, 2003.

NAVECA F., Santiago G. A., Maito R., et al. Reemergência do vírus da dengue sorotipo 3, Brasil, 2023. *Doenças infecciosas emergentes*. 2023;29(7):1482-1484. doi:10.3201/eid2907.230595.

NEPOMUCENO, D. B.; BACHUR, T. P. R. Atualidades em parasitologia humana. Amplla Editora, 2021.

NGUYEN, Lam-Tung et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 268-274, 2015.

NUNES-NETO, Joaquim Pinto et al. First Isolation and Genome Sequence Analysis of West Nile Virus in Mosquitoes in Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 4, p. 237, 2023.

NUNES, J. P. P., et al. One-Step reverse transcriptase PCR for detection of arboviruses in serum samples of patients assisted in Basic health Units in the State of Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 9, p. 16620-16644, 2019.

NUNES, Marcio Roberto Teixeira et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC medicine**, v. 13, p. 1-11, 2015.

OPAS. Chikungunya. 2015. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/node/4832>

OPAS. Folha informativa – Dengue e dengue grave. 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/dengue#:~:text=Tamb%C3%A9m%20foram%20notificados%2037.692%20casos,%2C%20em%20alguns%20casos%2C%20simultaneamente..> Acesso em: 21 de março 2021.

OPAS. Número de casos notificados de dengue e febre hemorrágica da dengue (FHD), região das Américas (por país e sub-região) 1980–2018. 2018. 2023. Disponível em: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html> . Acessado em 2 de fevereiro de 2023

OPAS. ZIKA 2024 Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/zika#:~:text=Pessoas%20com%20a%20doen%C3%A7a%20causada,espec%C3%ADfico%20para%20tratar%20o%20Zika>. Acesso em: 30 de julho de 2023.

OLIVEIRA, Consuelo Silva de; VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Microcephaly and Zika virus. **Jornal de pediatria**, v. 92, n. 2, p. 103-105, 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. Washington, D.C.: PAHO; 2017.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ global health**, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, 2018.

PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 394-402, 2004.

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. Chikungunya: epidemiology [version 1; referees: 2 approved]. **F1000 Research**, v. 5, p. 82, 2016. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/5-82>. Acesso em: 10 jun 2023.

PORTILHO, M. M., LIMA, N. V. S. C., & CAIRES, P. S. M. Alterações hematológicas na dengue grave uma revisão sistemática. **Rev. bras. anal. clin.**, 62-67, 2022. Disponível em: https://www.rbac.org.br/wpcontent/uploads/2022/09/RBAC-vol-54-1-2022_artigo09.pdf. Acesso em 28 out 2024

POWERS, Ann M.; LOGUE, Christopher H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363-2377, 2007.

RAMOS, Bruna Alves et al. Arboviruses in Free-Ranging Birds and Hematophagous Arthropods (Diptera, Nematocera) from Forest Remnants and Urbanized Areas of an Environmental Protection Area in the Amazon Biome. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2101, 2022.

REY, F. A.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Current opinion in virology**, v. 24, p. 132-139, 2017.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, p. 479-493, 1990.

RIBEIRO, Guilherme Sousa et al. Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue? **The Lancet Global health**, v. 6, n. 2, p. e140-e141, 2018.

RIBEIRO CRUZ, Ana Cecília et al. Chikungunya virus Detection in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* during an Outbreak in the Amazon Region. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 853, 2020.

RIVAS, A. V. et al. Building infestation index for *Aedes aegypti* and occurrence of dengue fever in the municipality of Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, from 2001 to 2016. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 1, p. 71-76, 2018.

ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 55-57, 2001.

ROMERO-ALVAREZ, D.; ESCOBAR, L. E. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 3, p. 135-146, 2018.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. In: **Seminars in pediatric neurology**. WB Saunders, 2012. p. 130-151.

SAHADEO, N. S. D. et al. Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences. **Virus evolution**, v. 3, n. 1, p. vex010, 2017.

SANGKAEW, Sorawat et al. Risk predictors of progression to severe disease during the febrile phase of dengue: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 21, n. 7, p. 1014-1026, 2021.

SANTIAGO, Gilberto A. et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, p. e2311, 2013.

SANTOS, L. K. F. et al. Perfil epidemiológico da dengue em um estado do nordeste brasileiro, 2011 a 2015. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 10, p. e423-e423, 2019.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia humana**. Grupo Guanabara Koogan, 2015.

SANTOS, Norma Suely de Oliveira et al. Introdução à virologia humana. In: **Introdução à virologia humana**. 2002. p. 254-254.

SILVA, Maria Beatriz Araújo et al. Utilização do levantamento rápido de índice para *Aedes aegypti* (LIRAA) como ferramenta de vigilância à introdução do vírus Chikungunya em Recife. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 936-954, 2020.

SILVA, A. S. et al. **Tópicos em Virologia** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2023, pp. 47-86. BIO collection. ISBN: 978-65-5708-151-8. <https://doi.org/10.7476/9786557082119.0004>.

SCHATZMAYR, H.G., NOHUEIRA R.M., TRAVASSOS DA ROSA, A.P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 81, n. 2, p. 245-246, 1986.

SILVA, Mickaell Gross Santos et al. Distribuição Espacial da Dengue e seus Fatores de Riscos Sociodemográficos e Entomológicos, no Município de Parauapebas, Pará, Brasil. **AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH**, v. 10, n. 4, p. 29-41, 2022.

SILVA, M. B. A. et al. Utilização do levantamento rápido de índice para *Aedes aegypti* (LIRAA) como ferramenta de vigilância à introdução do vírus chikungunya em Recife. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 936–954, 2020.

SILVA, N. M. da et al. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiol. serv. saúde**, Brasília, v. 27, n. 3, set. 2018.

SLONCZEWSKI, J. L, FOSTER, J. W. Microbiologia: Uma ciência em evolução, 2ª ed. Nova York: WW Norton and Company; 2010.

SOARES-PINHEIRO, Valéria Cristina et al. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, p. 396-401, 2016.

SONG, Byung-Hak et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of neuroimmunology**, v. 308, p. 50-64, 2017.

SOO, K. et al. Meta-analysis of dengue severity during infection by different dengue virus serotypes in primary and secondary infections. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0154760, 2016.

SOUSA, S. S. S. et al. Perfil reprodutivo de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de uma área urbana endêmica para arboviroses da região Nordeste do Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e6310917631-e6310917631, 2021.

SOUSA, M. M. F. et al. Detection and differentiation of dengue virus serotypes by one-step multiplex reverse transcription PCR assays. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 227-246, 2020.

SOUZA, Sérgio Joel de et al. Comparação de técnicas de monitoramento vetorial de *Aedes aegypti* e sua correlação com fatores climáticos e ambientais. 2018.

SRIVASTAVA, P. et al. Disease resolution in Chikungunya—what decides the outcome?. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 695, 2020.

SUCHOWIECKI, K. et al. Persistent joint pain following arthropod virus infections. **Current rheumatology reports**, v. 23, p. 1-12, 2021.

SUN, G. et al. Comprehensive annotation of mature peptides and genotypes for Zika virus. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170462, 2017.

SUWANMANEE, S. et al. Monitoring arbovirus in Thailand: Surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections. **Acta tropica**, v. 188, p. 244-250, 2018.

TAJUDEEN, Yusuf Amuda et al. Tackling the global health threat of arboviruses: An appraisal of the three holistic approaches to health. **Health Promotion Perspectives**, v. 11, n. 4, p. 371, 2021.

TANABE, Eloiza Lopes de Lira et al. Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 60, p. e19, 2018.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Os arbovírus no Brasil: Generalidades, Métodos e Técnicas de Estudo. Documento Técnico nº 2. Belém: Instituto Evandro Chagas, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, p.46, 1998.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Arboviroses. In: **Doenças Infecciosas e parasitárias: enfoque Amazônico**. 1997. p. 207-25.

THERKELSEN, M. D. et al. Flaviviruses have imperfect icosahedral symmetry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 45, p. 11608-11612, 2018.

THOMPSON, R.; MARTIN DEL CAMPO, J.; CONSTENLA, D. A review of the economic evidence of Aedes-borne arboviruses and Aedes-borne arboviral disease prevention and control strategies. **Expert review of vaccines**, v. 19, n. 2, p. 143-162, 2020.

VALENTE DE FREITAS, Maria Clara et al. Padronização da técnica RT-qPCR para detecção de arbovírus em amostras de tecidos parafinados. **Evidência**, v. 23, n. 2, 2023.

VASILAKIS, N. et al. Exploiting the legacy of the arbovirus hunters. **Viruses**, v. 11, n. 5, p. 471, 2019.

VIANA, L. R. C. et al. Arboviroses reemergentes: perfil clínico-epidemiológico de idosos hospitalizados. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 52, 2018.

VIEIRA, Marcelo ACS et al. Case report: West Nile Virus encephalitis: The first human case recorded in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 2, p. 377, 2015.

WANZELLER, A.L.M. et al. Isolation of Flaviviruses and Alphaviruses with Encephalitogenic Potential Diagnosed by Evandro Chagas Institute (Pará, Brazil) in the Period of 1954–2022: Six Decades of Discoveries. **Viruses**, v. 15, n. 4, p. 935, 2023.

WEAVER, S. C. et al. Zika, chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. **Annual review of medicine**, v. 69, p. 395-408, 2018.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral research**, v. 120, p. 32-39, 2015.

WHO. World Health. Dengue. 2014. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> Acesso em: 15 ago. 2020.

WHO. World Health. Cases of arboviruses. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/initiatives/global-arbovirus-initiative> Acesso em: 20 mai. 2020.

WHO. World Health. Cases of arboviruses. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> Acesso em: 20 julho de 2024.

WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 3, p. e101-e106, 2017.

XAVIER, Joilson et al. Circulation of chikungunya virus East/Central/South African lineage in Rio de Janeiro, Brazil. **PloS one**, v. 14, n. 6, p. e0217871, 2019.

ZAGNE, S. M. O. et al. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 677-679, 1994.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZHANG, Wei et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 10, n. 11, p. 907-912, 2003.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, **Valéria Cristina Soares Pinheiro**, professora doutora e pesquisadora da Universidade Estadual do Maranhão, estou convidando o/a senhor (a) a participar de um estudo intitulado: **Monitoramento da circulação de arbovírus (*Flavivirus* e *Alphavirus*) em mosquitos *Aedes* e em humanos de áreas com registro de COVID-19 da Mesorregião Leste Maranhense**. Este estudo tem o objetivo de investigar através de técnicas moleculares, a presença de material genético de *Flavivirus* e *Alphavirus* em pacientes com suspeita de infecção por arbovírus, atendidos pela rede pública de saúde de alguns municípios pertencentes à região Leste do Estado do Maranhão, bem como a caracterização do clínico-epidemiológico desses pacientes.

ESCLARECIMENTOS SOBRE A PESQUISA

- a) Caso você participe da pesquisa, será necessário o/a senhor (a) assinar esse termo de consentimento confirmando à sua concordância para o fornecimento de suas informações clínicas e sociodemográficas e a coleta de sangue para realização de testes moleculares e confirmação laboratorial.
- b) Esclareço que a coleta de sangue será feita pelos profissionais de saúde das respectivas instituições de saúde, através de punção venosa que é um método rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e realizado por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis. No entanto, apesar de ser um método frequentemente utilizado pelas equipes de saúde, alguns riscos podem resultar em complicações vasculares associadas à terapia intravenosa como: hematoma, trombose, flebite, tromboflebite, infiltração, extravasamento, septicemia, sobrecarga circulatória, edema pulmonar, embolia pulmonar, embolia gasosa, embolia por cateter, choque por hipervolemia.
- c) O material biológico (sangue/soro), os dados e as informações coletadas serão usados exclusivamente para os fins previstos nesta pesquisa.
- d) O presente estudo terá os seguintes benefícios: conhecimento sobre os aspectos clínico-epidemiológicos dos pacientes com infecção por arbovírus, bem como, o conhecimento dos arbovírus que atualmente circulam no Estado, mostrando a real situação das arboviroses, e favorecendo a adoção de medidas preventivas pontuais e eficazes. Dessa forma, essa pesquisa trará resultados importantes para o diagnóstico precoce dos casos, conhecimento da epidemiologia do vetor, assim como, fornecerá informações necessárias à aplicação de medidas preventivas pontuais.
- e) Informo também que a sua participação nesse estudo é voluntária e se o senhor (a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.
- f) O custo necessário para a realização desse estudo, não são de sua responsabilidade, esclareço que o senhor (a) não receberá qualquer valor em dinheiro por sua participação.
- g) O respeito à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com **consentimento livre e esclarecido dos participantes**, indivíduos ou grupos que, por si e/ ou por seus representantes legais, manifestem a sua anuência à participação na pesquisa (Res. 466/12, do CNS). Para melhor esclarecer, sujeito de pesquisa, de acordo com a resolução 466/12, do CNS, é o (a) participante pesquisado (a), individual ou coletivamente, de caráter voluntário, **vedada qualquer forma de remuneração**.

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Eu, _____ RG ou CPF:

_____, venho, através deste documento, dar meu consentimento para participar como voluntário na pesquisa sobre arboviroses, realizada na rede pública de saúde no município que está sendo desenvolvida pela equipe de pesquisa sob a orientação da professora Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro. Atesto que fui devidamente informado (a) que a finalidade deste trabalho é contribuir para a identificação dos arbovírus causadores de arboviroses no Maranhão, possibilitando a tomada de medidas de prevenção e controle da doença. A minha participação consistirá no fornecimento de minhas informações clínicas e sociodemográficas por meio de questionários/prontuários, e da coleta de sangue para realização de testes moleculares e confirmação laboratorial. Fui informado que a coleta de sangue será feita através de punção venosa que é um método rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e realizado por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis. Autorizo a apresentação dos resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicações em revistas científicas. Reconheço que a minha participação no estudo é voluntária e, portanto, não serei obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo pesquisador (a). Caso resolva desistir, não sofrerei nenhum prejuízo, nem haverá modificação na assistência que venho recebendo nesta instituição, que será rigorosamente seguida pela orientação do manual mais recente de manejo clínico dos pacientes com infecção por arbovírus preconizado pelo Ministério da Saúde. Estou ciente de que poderei procurar os pesquisadores para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa no Laboratório de Entomologia Médica (LABEM) localizado no Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão, que funciona no seguinte endereço: Rua do Morro do Alecrim; Bairro: Morro do Alecrim; CEP: 65604380 localizado em Caxias, Maranhão. Estou ciente que receberei uma cópia deste documento.

Assinatura do participante ou responsável: _____**Identidade/CPF do participante:** _____**Local** _____ **(MA) Data:** ____/____/____

Valéria Cristina Soares Pinheiro
Pesquisador Responsável

APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa. O nome dela é:
Monitoramento da circulação viral de arbovírus (Dengue, Zika e Chikungunya) em mosquitos do gênero Aedes e em humanos de áreas com registro de Covid-19 da Mesorregião Leste Maranhense

O nosso objetivo é “REALIZAR O MONITORAMENTO DA CIRCULAÇÃO VIRAL DE ARBOVÍRUS (DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA) EM MOSQUITOS DO GÊNERO AEADES E EM HUMANOS DE ÁREAS COM REGISTRO DE COVID-19 DA MESORREGIÃO LESTE MARANHENSE”.

Para participar deste estudo, a pessoa que cuida de você, com quem você mora, vai assinar um Termo de Consentimento, que é um papel que autoriza que você participe. Por isso, essa pessoa vai escrever o nome dela nesse papel.

Além disso, a pessoa que cuida de você, poderá retirar a autorização dela a qualquer momento, aí você para de fazer as atividades e isso não causará nenhum problema pra ela e nem pra você.

E também se você não quiser participar dessas atividades, não tem problema. Nós não vamos ficar tristes com você.



Nós estamos alegres de conversar com você!!



O risco da pesquisa poderá ser você sentir um pouco de dor na retirada do sangue, mas se você não quiser mais participar do estudo, nós iremos parar com a pesquisa e não continuaremos com a pesquisa, se você não desejar mais continuar.

Ninguém vai saber que você está participando dessa pesquisa, isso é segredo nosso os resultados da pesquisa vão ser publicados em revistas, mas sem identificar o seu nome. Este documento está impresso em duas vias, sendo que uma cópia ficará com as pesquisadoras e a outra será entregue a você ou o (a) seu (sua) cuidador (a).

Para finalizar, vamos ler o que diz abaixo:

Eu, _____, que
tenho o documento de Identidade _____ (se já tiver documento), fui

informado(a) dos objetivos desse estudo e entendi tudo. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que aceito participar da pesquisa.



Local/data _____ de _____.

Assinatura da criança participante

IMPRESSÃO DACTILOSCÓPICA

O(A) seu(sua) cuidador também irá assinar este Termo para confirmar que todas as informações foram passadas e confirmando que ele concorda.

Assinatura do(a) Cuidador(a) ou pessoa responsável

Quero confirmar também que eu, Valéria Cristina Soares Pinheiro, pesquisadora responsável, consegui de forma voluntária que estas pessoas participassem da pesquisa e expliquei tudo o que ia ser feito.

Valéria Cristina Soares Pinheiro
Pesquisador Responsável

ANEXOS



Características clínicas e epidemiológicas das arboviroses epidêmicas no Brasil: Dengue, Chikungunya e Zika

Clinical and epidemiological characteristics of epidemic arboviruses in Brazil: Dengue, Chikungunya and Zika

Características clínicas y epidemiológicas de los arbovirus epidémicos en Brasil: Dengue, Chikungunya y Zika

Sêmilly Suélen da Silva Sousa¹, Ana Cecília Ribeiro Cruz², Romário de Sousa Oliveira³, Valéria Cristina Soares Pinheiro³.

RESUMO

Objetivo: Realizar análise e descrição das principais informações disponíveis sobre as características clínicas e epidemiológicas das arboviroses epidêmicas no Brasil: Dengue, Chikungunya e Zika. **Revisão bibliográfica:** A Dengue, Chikungunya e Zika, são as arboviroses de maior importância no cenário epidemiológico brasileiro, devido à morbidade que causam anualmente. A sintomatologia semelhante que apresentam dificulta o diagnóstico clínico preciso e favorece o aumento de complicações e sequelas graves. Desse modo, o diagnóstico laboratorial para confirmação e adoção do manejo clínico adequado é necessário. Os métodos moleculares (RT-PCR) são considerados os mais eficientes pela rapidez e especificidade no diagnóstico. Mesmo frente ao avanço de uma vacina no combate à dengue, o controle dos arbovírus transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti* ainda inspira a associação de uma série de parâmetros na saúde pública, com foco na redução das populações do vetor. **Considerações finais:** O entendimento sobre a estrutura e a patogenicidade das arboviroses é fundamental para alcançar êxito frente às medidas de controle, a fim de reduzir a ocorrência de surtos, o número de óbitos, a ocorrência de sequelas e a onerosidade que essas doenças causam aos cofres públicos.

Palavras-chave: Infecções por Arbovirus, Dengue, Infecção por Zika vírus, Febre Chikungunya, Epidemiologia.

ABSTRACT

Objective: Perform analysis and description of the main information available on the clinical and epidemiological characteristics of epidemic arboviruses in Brazil: Dengue, Chikungunya and Zika. **Bibliographic review:** Dengue, Chikungunya and Zika are the most important arboviruses in the Brazilian epidemiological scenario, due to the morbidity they cause annually. The similar symptomatology they present makes it difficult to make an accurate clinical diagnosis and favors an increase in complications and serious sequelae. Thus, laboratory diagnosis for confirmation and adoption of appropriate clinical management is necessary. Molecular methods (RT-PCR) are considered the most efficient due to their speed and specificity in the diagnosis. Even with the advancement of a vaccine to combat dengue, the control of arboviruses transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito still inspires the association of a series of parameters in public health, with a focus on reducing vector populations. **Final considerations:** Understanding the structure and pathogenicity of arboviruses is essential to achieve success with control measures, in order to reduce the

¹Universidade Federal do Maranhão, Brasil (UFMA) Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, São Luís - MA.

² Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua - PA.

³ Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, Campus Caxias - MA, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde-PPGBAS.

occurrence of outbreaks, the number of deaths, the occurrence of sequelae and the burden that these diseases cause to public safes.

Keywords: Arbovirus infections, Dengue, Zika virus infection, Chikungunya fever, Epidemiology.

RESUMEN

Objetivo: Realizar análisis y descripción de las principales informaciones disponibles sobre las características clínicas y epidemiológicas de los arbovirus epidémicos en Brasil: Dengue, Chikungunya y Zika. **Revisión bibliográfica:** Dengue, Chikungunya y Zika son los arbovirus más importantes en el escenario epidemiológico brasileño, debido a la morbilidad que provocan anualmente. La sintomatología similar que presentan dificulta un diagnóstico clínico certero y favorece un aumento de complicaciones y secuelas graves. Por lo tanto, es necesario el diagnóstico de laboratorio para su confirmación y adopción de un manejo clínico adecuado. Los métodos moleculares (RT-PCR) se consideran los más eficientes por su rapidez y especificidad en el diagnóstico. Aún con el avance de una vacuna para combatir el dengue, el control de los arbovirus transmitidos por el mosquito *Aedes aegypti* aún inspira la asociación de una serie de parámetros en salud pública, con foco en la reducción de las poblaciones de vectores. **Consideraciones finales:** El conocimiento de la estructura y patogenicidad de los arbovirus es fundamental para lograr el éxito de las medidas de control, con el fin de reducir la ocurrencia de brotes, el número de muertes, la ocurrencia de secuelas y la carga que estas enfermedades ocasionan a la caja fuerte pública.

Palabras clave: Infecciones por arbovirus, Dengue, Infección por virus Zika, Fiebre chikungunya, Epidemiología.

INTRODUÇÃO

As arboviroses são importantes problemas de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais, devido à vários fatores que favorecem a transmissão e a replicação dos vírus que as causam (VIANA LRC, et al., 2018). O crescimento populacional, as mudanças climáticas, a destruição acelerada dos biomas, a urbanização não planejada, e a expansão geográfica do vetor, são alguns dos fatores que contribuem para a disseminação e permanência dos arbovírus no ambiente causando infecções de espectro preocupante (GIRARD M, et al., 2020; ALMEIDA LS, et al., 2020; TAJUDEEN YA, et al., 2021).

No cenário epidemiológico brasileiro, as arboviroses de maior impacto são a dengue, a zika, e a chikungunya; as duas primeiras causadas por vírus pertencentes à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, enquanto o vírus da chikungunya pertence à família Togaviridae, gênero *Alphavirus*. (DONALÍSIO MR, et al., 2017). Estes arbovírus são transmitidos ao homem, principalmente, através da picada das fêmeas dos mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) infectados (BRASIL, 2019).

No Brasil, as arboviroses estabelecem um quadro de saúde complexo decorrente da circulação simultânea dos quatro sorotipos da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), associada a partir de 2014, à circulação do vírus responsável pela chikungunya e, em 2015, do vírus causador da febre zika, quando a transmissão paralela desses arbovírus teve início no país (BRASIL, 2016). As manifestações clínicas das arboviroses podem variar desde doença febril leve e indiferenciada, a síndromes febris neurológicas, articulares e hemorrágicas. Com frequência, os quadros graves são conhecidos somente após circulação viral em extensas epidemias, muitas vezes mostrando impacto imprevisível na morbidade e mortalidade, enquanto há ocorrência, evidenciando uma mudança no perfil dessas doenças (DONALÍSIO MR, et al., 2017).

Apesar de serem doenças conhecidas, as arboviroses, ainda são motivo de preocupação para os órgãos públicos de saúde, tanto em áreas urbanas, quanto periurbanas, principalmente, devido à infestação e à reinfestação de *Aedes aegypti*, seu principal vetor. Uma maior proliferação das populações desse mosquito favorece a transmissão, o aumento do número de casos, e à ocorrência de implicações e sequelas clínicas cada vez mais graves. Aliado a estas dificuldades e inerentes às infecções virais, verifica-se a insuficiência dos métodos diagnósticos aplicados e à falta de terapia específica, postergando o tratamento das arboviroses ao controle sintomático das manifestações clínicas. Nesse sentido, é essencial a atualização do conhecimento acerca da epidemiologia e clínica da dengue, chikungunya e zika, a fim de contribuir com a melhoria das estratégias direcionadas à diminuição dos surtos e da ocorrência de casos graves. O objetivo do estudo foi descrever as características clínicas e epidemiológicas da Dengue, da Chikungunya e da Zika no Brasil.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Definição e epidemiologia

As arboviroses são infecções causadas por arbovírus, ou seja, por vírus que são transmitidos ao homem e a outros animais através da picada de artrópodes (*Arthropod-borne vírus*), os quais, recebem essa denominação, principalmente porque parte do ciclo replicativo desses vírus ocorre no corpo dos insetos. (LOPES N, et al., 2014; WEAVER SC, 2018). Nos últimos anos, mesmo com todos os esforços empreendidos para o controle dos vetores, as arboviroses emergentes apresentaram elevado potencial para geração de surtos epidêmicos (MILLET JP, et al., 2017).

A dengue, considerada a arbovirose mais globalizada, apresenta crescimento dramático nos últimos 50 anos. Antes de 1970, era restrita a apenas cinco países. Atualmente, cerca de metade da população mundial está em risco de infecção por dengue, com estimativas de 400 milhões de pessoas infectadas e 22.000 mortes registradas anualmente (JONES R, et al., 2020). No Brasil, foram registrados 1.450.270 casos possíveis de dengue em 2022, com incidência de 679,9 casos por 100 mil habitantes. Neste mesmo ano, o país registrou 1.473 casos de dengue grave e 18.145 casos de dengue com sinais de alarme com 1.016 óbitos confirmados, (BRASIL, 2022). Até o mês de abril de 2023, foram registrados 899,5 mil casos de dengue e 333 óbitos pela doença, o que representa um aumento de 30% em comparação com os registros do mesmo período de 2022. Os Estados com a maior incidência de casos no período foram: Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Paraná, Minas Gerais, Acre, Santa Catarina e Rondônia (BRASIL/MS, 2023).

A febre Chikungunya é uma arbovirose tropical que tem o nome traduzido como “doença que dobra as articulações”, referindo-se à postura desencadeada pela artralgia crônica que provoca nos indivíduos infectados (WEAVER SC, 2018). Os primeiros casos de Chikungunya registrados no Brasil ocorreram em 2014 no município de Oiapoque, Estado do Amapá (Região Norte) e em Feira de Santana na Bahia (Região Nordeste), em setembro de 2014. Desde então, todos os anos há registrados dessa arbovirose no país (NUNES MR, et al., 2015). Em 2023, até o mês de abril, 86,9 mil casos prováveis de chikungunya foram registrados no Brasil (40,7 casos por 100 mil habitantes) com 19 óbitos confirmados. Esse dado revela um aumento de 40% no número de casos notificados, quando comparado com o mesmo período de 2022, com as maiores incidências em Tocantins, Minas Gerais, Espírito Santo e Mato Grosso do Sul (BRASIL 2023).

Em relação à febre Zika, esta arbovirose foi detectada no Brasil no ano de 2015, sendo que o maior surto da história dessa doença ocorreu em maio de 2015 no Nordeste do Brasil chegando a atingir proporções pandêmicas, a partir de então, todos os anos ocorrem notificações dessa arbovirose. Em 2023, até o mês de abril, 6,2 mil casos de zika foram notificados no Brasil, esse dado representa uma incidência igual a 3 casos por 100 mil habitantes e um aumento de 289% em relação ao registrado no mesmo período de 2022, quando ocorreram 1,6 mil notificações da doença no país (BRASIL, 2023).

As epidemias de arboviroses são caracterizadas sobretudo pela variação do perfil epidemiológico da população, emergência e re-emergências de sorotipos em diferentes regiões do país, e pelo aumento dos casos graves e fatais, que decorrem algumas vezes do diagnóstico tardio ou equivocado. Além destes fatores, o grande número de pessoas suscetíveis às doenças e a mudança na circulação de sorotipo do vírus, são alguns condicionantes favoráveis à ocorrência das arboviroses urbanas.

Mecanismos de transmissão

Os vírus que causam a dengue, chikungunya e zika, podem ser transmitidos ao homem por via vertical, vetorial e transfusional. Porém, a principal e mais eficiente forma de transmissão é a vetorial, que ocorre através da picada de fêmeas infectadas do mosquito *Aedes aegypti* no ciclo humano-vetor-humano. Na natureza, esses vírus são conservados entre os mosquitos, sobretudo mediante a transmissão vertical (LOPES N, et al., 2014). Após o processo de hematofagia de sangue infectado, o vírus passa por um período de incubação extrínseco que ocorre no corpo do inseto e dura em média de 8 a 12 dias, no caso do DENV e ZIKV, e de 3 a 7 dias em relação ao CHIKV, e após este intervalo o mosquito estará apto a transmitir os vírus por toda a vida (BRASIL, 2023).

Se tratando da dengue, a transmissão vertical em humanos é geralmente rara. Contudo, no caso da Chikungunya, pode ocorrer a transmissão perinatal em gestantes no período de viremia, em alguns casos provocando infecção neonatal grave, especialmente antes dos cinco meses e meio de gestação. Contudo, em relação à zika, a transmissão vertical pode ocorrer em diferentes idades gestacionais e resultar em malformações no feto e aborto. Estudos indicam ainda que o vírus da zika pode ser transmitido de uma pessoa infectada, com ou sem sintomas, para seu parceiro pelo contato sexual, até mesmo meses após o início da infecção (DECKARD D, et al., 2016; DUARTE G, et al., 2017).

Em relação ao período de incubação intrínseco desses arbovírus, ou seja, aquele que ocorre no corpo do indivíduo infectado, pode variar de acordo com o arbovírus envolvido. No que tange ao vírus da dengue, esse período varia de 3 a 7 dias (TERRA MR, et al., 2017). Após este período inicia-se o período de viremia, que tem início geralmente um dia antes do aparecimento da febre e estende-se até o quinto dia da doença. Quanto à Chikungunya, o período de incubação intrínseco do vírus pode variar de 4 a 7 dias. O período de incubação no homem geralmente inicia-se 2 dias antes do aparecimento dos sintomas e pode perdurar por até 10 dias. No caso da Zika, esse período dura em média de 2 a 7 dias, e as manifestações clínicas, geralmente se estendem por até 10 dias. (BRASIL, 2022).

Manifestações Clínicas

A dengue é a arbovirose urbana de maior impacto epidemiológico no cenário brasileiro (BRASIL, 2017). Apresenta como sintomas característicos: febre alta, cefaleia, mal-estar, dor nas articulações, etc., contudo, também pode ser assintomática. Quando uma pessoa é infectada por um sorotipo (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 e VDEN-4), ela adquire imunidade definitiva a ele, não podendo ser infectada novamente por esta mesma cepa viral (BRASIL, 2019) e proteção parcial e transitória contra os sorotipos heterólogos por 1 a 3 anos (LONDONO-RENTERIA B, et al. 2016).

Em 2014, no Brasil, uma nova classificação para os casos de dengue estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), passou a ser adotada pelo Ministério da Saúde. Os casos passaram a ser classificados como: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave (WHO, 2014). Os efeitos da doença podem ser fatais quando desenvolvem sintomas sistêmicos mais graves, incluindo vazamento capilar, hemorragia, choque e morte. (KHETARPAL N e KHANNA I, 2016). Na dengue grave, o comprometimento de órgãos específicos pode ocorrer sem choque ou qualquer outra característica dessa doença. Uma minoria desses casos pode evoluir para manifestações atípicas graves, como encefalopatia, encefalite, hepatite fulminante e miocardite. A progressão para dengue grave comumente ocorre após a fase febril, entre os dias 4 e 6 da doença e pode ser fatal (SANGKAEW S, et al., 2021).

Em relação à Chikungunya, esta doença se caracteriza por apresentar um quadro debilitante e seus principais sintomas são febre alta (tipicamente $> 39^{\circ}\text{C}$), erupções cutâneas, poliartralgia, mialgia, cefaleia, fadiga, náuseas e vômitos. Possui três fases: A fase aguda, que geralmente se estende até o vigésimo primeiro dia da doença; a fase pós-aguda, que ocorre a partir do vigésimo primeiro dia até o final do terceiro mês da infecção e a fase crônica, que tem início após três meses de incômodo em decorrência das dores articulares (EDINGTON F, et al., 2018).

Ao contrário de outras arboviroses, esta infecção é muito sintomática na maioria das pessoas, principalmente na fase aguda, contudo também pode ser sintomática nas fases subaguda e crônica, principalmente com manifestações articulares. (DE LIMA CAVALCANTI TYV, et al., 2022). Ocorre a recorrência da poliartralgia em 30-40% dos indivíduos infectados, que pode persistir por anos, principalmente em idosos e pacientes com comorbidades (AN W, 2017; GONZALEZ-SANCHEZ JA e RAMIREZ-ARROYO GF, 2018; BADAWI A, et al., 2018). As formas mais severas e irregulares são incomuns, porém, quando acontecem, podem levar o paciente à óbito.

O vírus Zika é um *Flavivírus*, com surtos registrados pela primeira vez em 2007 na Oceania (COLINAS SL, 2017). Com o surgimento da microcefalia em neonatos em 2016 no Brasil, o país tornou-se, segundo a OMS, uma “emergência de saúde pública de interesse internacional (WHO, 2022). Os sintomas comumente relatados nos casos de zika, caracterizam-se mais frequentemente por manifestações clínicas mais brandas

e autolimitadas, que incluem erupção cutânea, febre baixa (37,4 °C a 38,0 °C), artralgia, mialgia, fadiga, dor de cabeça e conjuntivite. A manifestação clínica mais proeminente decorre do potencial teratogênico do ZIKV, a microcefalia, associada a uma infecção pré-natal (MLAKAR J, 2016, OPAS, 2022). Além destes, sequelas neurológicas graves também foram descritas em adultos, incluindo meningite, meningoencefalite e síndrome de Guillain-Barré (PLOURDE AR e BLOCH EM, 2016, OPAS, 2022).

Manifestações clínicas atípicas e graves com miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca e arritmias como a fibrilação atrial podem ser subdiagnosticadas aumentando a mortalidade, principalmente em áreas de surto (ESCATULARO CE, 2020). Apesar das iniciativas para conter as doenças tropicais, como a dengue, a chikungunya e a zika, o número de casos tem apresentado um aparente acréscimo em todo o mundo. O aumento das infecções por arbovírus gera maior risco de complicações ou doença grave, principalmente em populações mais velhas e com comorbidades (BURGOS LM, 2020; ARAIZA-GARAYGORDOBIL D, 2021).

Métodos de diagnóstico

As técnicas conhecidas atualmente para o diagnóstico laboratorial da dengue, chikungunya e zika são realizadas através de métodos diretos, que consistem na pesquisa de vírus (isolamento viral por inoculação em células) e na pesquisa de genoma viral por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), e também por métodos indiretos por meio da pesquisa de anticorpos imunoglobulina da classe M (IgM) através de testes sorológicos (ensaio imunoenzimático – ELISA), de neutralização por redução de placas (PRNT), na inibição da hemoaglutinação (IH) e na pesquisa de antígeno NS1 (ensaio imunoenzimático – ELISA) (OPAS, 2022; CARBONE TRJ e FELIPE PG, 2019).

O isolamento é considerado padrão ouro para diagnóstico de arboviroses. Deve ser realizado até o quinto dia da doença, especialmente nos três primeiros dias de sintomas. No entanto, apesar de eficaz, este método é bastante dispendioso quanto ao tempo necessário para obtenção dos resultados e, ainda pode haver a necessidade de realização de novos testes para conseguir realizar o isolamento adequadamente (OPAS, 2022). Os testes moleculares são considerados pelo Ministério da Saúde padrão ouro na identificação do patógeno e no monitoramento do sorotipo circulante, estão entre os métodos de diagnósticos mais sensíveis, precisos e muito úteis durante a fase virêmica. Neste caso, a detecção do RNA viral é feita por reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (ROMÉRIO MF, et al., 2016).

A Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da polimerase modo convencional (RT-PCR), é uma técnica qualitativa que determina presença ou ausência do vírus e que vem sendo utilizado há mais de 30 anos para detecção viral (LANCIOTTI et al., 1992), e a Transcrição Reversa – Reação em Cadeia mediada pela Polimerase quantitativo (RT-qPCR), também conhecida como RT-qPCR em tempo real, é atualmente a mais eficiente no diagnóstico de muitas doenças, devido à elevada especificidade e sensibilidade que apresenta, sendo capaz de diminuir a ocorrência de reações cruzadas e de identificar os patógenos nos primeiros estágios da doença. Além disso, apresenta baixo risco de contaminação e menor tempo de reação (LIMA NETO AS, et al., 2016).

Os testes sorológicos identificam na amostra de soro analisada a presença de anticorpos contra os vírus, ou seja, confirmam a presença da imunoglobulina G (IgG) em amostras pareadas e em caso de pacientes com sintomas hemorrágicos, exames de plaquetometria e hematócrito são solicitados. A IgM específica pode ser detectada por Enzyme immunoassay - EIA em média a partir do 2º dia da doença e persiste por várias semanas até 3 meses. A IgG específica é detectada na fase convalescente e persiste por anos (SANTOS et al. 2015). Apesar de ser o método mais comum para o diagnóstico de *Flavivírus* nos estágios iniciais da doença, o teste de ELISA apresenta baixa sensibilidade o que acarreta inúmeras reações cruzadas entre os diversos arbovirus (LICÍNIO COL e AYRE FM, 2021).

Há também a realização de testes rápidos da dengue, os quais são imunocromatográficos e detectam a proteína não-estrutural 1 (NS1). É um teste qualitativo, em que a presença do antígeno NS1 sugere doença aguda e ativa. Contudo, deve ser realizado como exame de triagem; e seu resultado precisa ser confirmado por técnicas mais sensíveis (BRASIL, 2016).

No Brasil a cocirculação dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV é uma realidade em grande parte dos municípios brasileiros, de modo que, a investigação desses por métodos faz-se necessária (ROMEIRO MF, et al., 2016). A diferenciação entre os arbovírus é importante para evitar complicações no manejo do paciente, bem como para auxiliar na tomada de medidas preventivas para a não proliferação da doença. A similaridade de sintomas que há entre as arboviroses, compromete o diagnóstico clínico, por isso, o diagnóstico preciso e confiável, realizado por meio de testes moleculares figura-se de grande relevância para a vigilância epidemiológica. A justaposição dos exames com resultados positivos para dengue, chikungunya e zika no território brasileiro, pode favorecer o entendimento sobre a magnitude da circulação viral e também auxiliar os órgãos de saúde a desenvolver um melhor aparelhamento dos serviços prestados à população, a partir da elaboração de estratégias eficientes para prevenção de surtos e epidemias das arboviroses.

Medidas Profiláticas

As arboviroses expõem a população de todo o Brasil em uma situação de risco, sem contar as subnotificações que apresentam número muito elevado, decorrentes da insuficiência dos serviços de saúde para atender o crescente número de pessoas doentes, das dificuldades no diagnóstico laboratorial, e também devido àqueles que procuram atendimento apenas diante do agravamento do quadro de saúde (BRASIL, 2019). O cenário se torna mais preocupante ao se considerar que a dengue e chikungunya podem ocorrer concomitante no mesmo indivíduo o que dificulta a sua identificação clínica (BRASIL, 2019). A possibilidade de diagnósticos errôneos e o seu impacto no desfecho da doença, não podem ser negligenciados e precisam ser mais bem investigados.

O tratamento das arboviroses é feito mediante a administração de fármacos para amenizar o estado febril, as dores articulares e processos inflamatórios, de acordo os sintomas do paciente. Nesse sentido, a detecção precoce e o acesso a cuidados médicos adequados reduzem as taxas de mortalidade para abaixo de 1% (OPAS, 2022). Uma estimativa recente indica que o número de casos dessas arboviroses aumentou substancialmente após 2013 nas regiões tropicais (FRUTUOSO LCV, et al., 2020). A co-circulação de diferentes arbovírus em regiões endêmicas, à falta de imunizações para todas as infecções por arbovírus e a grande dificuldade do controle vetorial são alguns dos fatores que dificultam a prevenção às arboviroses (MARTINS MM, et al., 2020).

Em relação à busca de imunizantes contra a dengue, em dezembro de 2022, uma vacina contra os quatro sorotipos da doença, a QDENGAR[®] (TAK-003), desenvolvida pelo laboratório japonês Takeda, foi aprovada pela agência sanitária da União Europeia. E, em março de 2023, esta mesma vacina foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil. Segundo o fabricante, a vacina apresentou eficácia geral de 80,2%, nos ensaios clínicos e reduziu as hospitalizações em 90%. (BRASIL, 2023). Contudo, é válido ressaltar que, mesmo frente ao avanço que a QDENGAR[®] representa no combate à dengue, o controle dos vírus transmitidos pelo mosquito *Ae. aegypti* ainda inspira a associação de uma série de parâmetros na saúde pública.

Algumas medidas de prevenção estão relacionadas ao saneamento do meio ambiente, as ações de educação e o combate direto ao vetor, utilizando-se meios químicos, físicos e biológicos (BRASIL, 2016). O conhecimento sobre a circulação de um ou mais sorotipos do vírus da dengue e a identificação das infecções causadas por CHIKV e pelo ZIKV, podem contribuir para a elaboração de medidas exitosas. Contudo, a principal forma de prevenção às arboviroses consiste na drástica redução da população do mosquito transmissor, *Aedes aegypti*, as vigilâncias entomológicas e epidemiológicas devem ser indissociáveis e aliadas nestas ações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dengue, a Zika e a Chikungunya são arboviroses de importante impacto epidemiológico para a saúde pública brasileira. Nesta perspectiva, entender a estrutura, patogenicidade e distribuição das arboviroses é fundamental para alcançar êxito frente ao controle dessas doenças que continuam sendo um grande desafio para os serviços de saúde do Brasil e do Mundo. Desse modo, a prevenção é imprescindível para que seja

alcançada uma melhoria no quadro crítico instalado pelas arboviroses, sendo necessário o intensivo e constante investimento em campanhas de combate ao vetor, aquisição de maior conhecimento sobre a dinâmica de sintomas e transmissão dessas doenças, assim como a utilização de técnicas diagnósticas mais eficazes e rápidas, a fim de reduzir a disseminação das arboviroses, minimizar o número de óbitos, pessoas sequeladas e a onerosidade causada aos cofres públicos diante da necessidade de afastamento das necessidades laborais para tratamento, que precede o afastamento das atividades essenciais pelo pacientes sintomáticos.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTOS

O presente trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão / Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (PPSUS - FAPEMA / MS-DECIT / CNPq / SES) [Nº02052/20], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão- (SES/MA), pela Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus Caxias, Laboratório de Entomologia Médica (LABEM), e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA LS, et al. Saneamento, Arboviroses e Determinantes Ambientais: impactos na saúde urbana. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2020; 25: 3857-3868.
2. AN W, et al. Progresso recente na pesquisa do vírus chikungunya. *Virology*, 2017; 32: 441–453.
3. ARAIZA-GARAYGORDOBIL D, et al. Dengue e o coração. *Cardiovasc. J. Afr.*, 2021; 32: 276–283.
4. BADAWI A, et al. Prevalência de comorbidades crônicas em chikungunya: Uma revisão sistemática e meta-análise. *Int J. Infect. Dis.* 2018; 67: 107–113.
5. BRASIL, 2022. Boletim Epidemiológico Vol.53 Nº18—Português (Brasil). GOV.BR—Português (Brasil). Disponível online: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no18/view> (acessado em 19 de março de 2022).
6. BRASIL, 2023. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Português (Brasil). Disponível online: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/qdenga-vacina-dengue-1-2-3-e-4-atenuada-novo-registro> (acessado em 19 de abril de 2023).
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança. Brasília-DF, 2016.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília – DF, 2019.
9. BURGOS LM, et al. Em nome das Doenças Tropicais Negligenciadas e outras Doenças Infecciosas que Afetam o Coração (projeto NET-Heart). Doenças Tropicais Negligenciadas e Outras Doenças Infecciosas do Coração. O Projeto NET-Heart: Justificativa e Design. *Glob. Coração*, 2020; 15: 60.
10. CARBONE TRJ e FELIPE PG. Arboviroses urbanas e o Exército Brasileiro: a visão do reumatologista. *Escola de Saúde do Exército: Revista Científica*. 2019; 2: 52-79.
11. COLINAS SL, et al. Epidemiologia da infecção pelo vírus Zika. *J. Infectar. Dis.*, 2017; 216(Supl. 10): S868–S874.
12. DE LIMA CAVALCANTI TYV, et al. Uma Revisão sobre Epidemiologia do Vírus Chikungunya, Patogênese e Desenvolvimento de Vacinas Atuais. *Vírus*, 2022; 14: 969.
13. DECKARD D. Trew et al. Male-to-male sexual transmission of Zika virus—Texas, January 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2016; 65: 372-374.
14. DONALÍSIO MR, et al. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Revista Saúde Pública*, 2017; 51: 30.
15. DUARTE G, et al. Infecção do vírus Zika em gestantes e microcefalia. *Rev. Bras. Ginecol.*, 2017; 39: 235-248.
16. EDINGTON F, et al. Incidência de dor articular e artrite após febre chikungunya nas Américas: revisão sistemática da literatura e metanálise. *Articulação Osso da Coluna*, 2018; 6: 669–78.
17. ESCATULARO CE, et al. Doenças Tropicais Negligenciadas e outras Doenças Infecciosas que afetam o Coração (projeto NET-Heart). Zika e coração: uma revisão sistemática. *Tendências Cardiovasc. Med.*, 2020; 32: 52–58.

18. FRUTUOSO LCV, et al. Estimated rate and leading causes of death among individuals with chikungunya in 2016 and 2017 in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2020; 53.
19. GIRARD M, et al. Arbovírus: uma ameaça global à saúde pública. *Vacina*, 2020; 38: 3989–3994.
20. GONZALEZ-SANCHEZ JÁ e RAMIREZ-ARROYO GF. Vírus Chikungunya: História, Distribuição Geográfica, Quadro Clínico e Tratamento. *PR Health Science*, 2018; 37: 187–194.
21. JONES R, et al. Arbovírus vetores de preocupação epidemiológica nas Américas: uma revisão de escopo de estudos entomológicos sobre vetores do vírus zika, dengue e chikungunya. *PLoS ONE*, 2020; 15: e0220753.
22. KHETARPAL N e KHANNA I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *J Immunol Res.*, 2016; 2016: 6803098.
23. LIMA NETO AS, et al. Dengue, zika e chikungunya - desafios do controle vetorial frente à ocorrência das três arboviroses. *Rev Bras Promoç Saúde*, 2016; 29(3): 305-308.
24. LONDONO-RENTERIA B, et al. Arboviroses e potenciais vacinas bloqueadoras da transmissão. *Parasitas & Vetores*, 2016; 9: 516.
25. LOPES N, et al. Características gerais e epidemiologia dos arbovirus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 2014; 5(3): 55-64.
26. MARTINS MM, et al. A. Arboviral diseases in pediatrics. *Jornal de Pediatria*, 2020; 96: 2-11.
27. MILLET JP, et al. Zika vírus importado em cidade europeia: como prevenir a transmissão local? *Microbiol frontal.*, 2017; 8: 1319.
28. MLAKAR J, et al. Zika Vírus Associado à Microcefalia. *N. Engl. J. Med.*, 2016; 374: 951–958.
29. NUNES MR, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.*, 2015; 13: 102.
30. OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Diretrizes para o Diagnóstico Clínico e Tratamento da Dengue, Chikungunya e Zika; Organização Pan-Americana da Saúde: Washington, DC, EUA, 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55867>. Acessado em: 10 de março de 2022.
31. PLOURDE AR e BLOCH EM. Uma Revisão da Literatura sobre o Zika Vírus. *Emerg. Infectar. Dis.*, 2016; 22: 1185–1192.
32. ROMEIRO MF, et al. Evaluation and optimization of SYBR green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the flavivirus genus in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2016; 49: 3: 279-85.
33. SANGKAEW S, et al. Preditores de risco de progressão para doença grave durante a fase febril da dengue: uma revisão sistemática e meta-análise. *Lancet Infect. Dis.*, 2021; 21: 1014–1026.
34. TAJUDEEN YA, et al. Enfrentando a ameaça global à saúde dos arbovírus: uma avaliação das três abordagens holísticas para a saúde. *Promoção de Saúde. Perspectiva*, 2021; 11: 371–381.
35. TERRA MR, et al. *Aedes aegypti* e as arboviroses emergentes no Brasil. *Uningá review*, 2017; 30: 3.
36. VIANA LRC, et al. Arboviroses reemergentes: perfil clínico-epidemiológico de idosos hospitalizados. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 2018, 52: 2018.
37. WEAVER SC. Previsão e prevenção de epidemias de arbovírus urbanos: um desafio para a comunidade global de virologia. *Res. Antiviral.*, 2018, 156: 80–84.
38. WHO. World Health Organization. Dengue. 2014. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue#tab=tab_3. Acessado em: 15 março de 2021.
39. WHO. World Health Organization. Ending neglect to achieve the Sustainable Development Goals: a roadmap for neglected tropical diseases 2021–2030. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>. Acessado em: 14 de março de 2022.

Predictor effect of the Rapid Survey (LIRAA) and priority areas for Dengue surveillance in Maranhão, Brazil

Efeito preditor do Levantamento Rápido (LIRAA) e áreas prioritárias para vigilância da Dengue no Maranhão, Brasil

Received: 21-07-2024 | Accepted: 25-08-2024 | Published: 31-08-2024

Sêmilly Suélen da Silva Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5275-2456>

Universidade Federal do Maranhão

E-mail: semillysuelen@gmail.com

Ana Cecília Ribeiro Cruz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4607-9346>

Instituto Evandro Chagas, Brasil/Sessão de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

E-mail: anacecilia@iec.gov.br

Karen Brayner Andrade Pimentel

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0776-1542>

Universidade Federal do Maranhão,

E-mail: braynerpimentel@gmail.com

Valéria Cristina Soares Pinheiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4652-4884>

Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias, Brasil

E-mail: vc_pinheiro@hotmail.com

ABSTRACT

Dengue fever is a serious public health problem in Brazil. However, there are still mechanisms involved in the dynamics of the disease that need to be better elucidated, especially in Maranhão. In this sense, the objective was to evaluate the predictive effect of LIRAA in relation to the incidence of dengue fever in Maranhão in 2022, and to identify priority municipalities for interventions through geospatial analysis. This is a scholastic study, carried out with data obtained from the Zoonosis Surveillance Units - UVZ of the municipalities, in the Notifiable Diseases Information System (SINAN). A simple linear regression with post-hoc analyses and the Local Moran Index (LISA) were performed. A positive effect of LIRAA on the incidence of dengue fever was observed ($R^2 = 0.0352$; $p = 0.0062$). LISA indicated ten high-risk municipalities and six in a transition situation to high risk of dengue fever in the state. LIRAA has proven to be an efficient entomoepidemiological surveillance tool and the identification of priority areas for surveillance can help health authorities in developing specific strategies to contain future epidemics.

Keywords: Dengue; Vector control; Linear models; Spatial analysis.

RESUMO

A dengue é um grave problema de saúde pública no Brasil. No entanto, ainda existem mecanismos envolvidos na dinâmica da doença que precisam ser mais bem elucidados, principalmente no Maranhão. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o efeito preditivo do LIRAA em relação à incidência de dengue no Maranhão em 2022, e identificar municípios prioritários para intervenções por meio de análise geoespacial. Trata-se de um estudo escolar, realizado com dados obtidos das Unidades de Vigilância de Zoonoses - UVZ dos municípios, no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Foi realizada regressão linear simples com análises post-hoc e o Índice de Moran Local (LISA). Observou-se efeito positivo do LIRAA na incidência de dengue ($R^2 = 0,0352$; $p = 0,0062$). O LISA indicou dez municípios de alto risco e seis em situação de transição para alto risco de dengue no estado. O LIRAA demonstrou ser uma ferramenta eficiente de vigilância entomoepidemiológica e a identificação de áreas prioritárias para vigilância pode auxiliar autoridades de saúde no desenvolvimento de estratégias específicas para conter futuras epidemias.

Palavras-chave: Dengue; Controle de vetores; Modelos lineares; Análise espacial.

INTRODUCTION

Dengue is the world's leading arboviral disease (Wong et al., 2022). Caused by four distinct but closely related serotypes of Dengue virus (DENV) (1–4), it is transmitted primarily by infected *Aedes* sp mosquitoes (PAHO, 2024). While often asymptomatic resulting in mild febrile illness, in some situations, hemorrhages, critical organ damage, and even death may occur (PAHO, 2024).

The incidence of the disease has grown substantially over the past two decades, with cases reported to the World Health Organization (WHO) increasing from half a million in 2000 to more than 4.2 million in 2022 (UN, 2023). In Brazil, dengue fever is experiencing critical growth and is a serious public health problem, affecting all regions of the country, with recurring epidemics (Braga; Valle, 2007). In the first half of 2024 alone, more than 6 million notifications and 4,591 deaths were recorded in the country (Brazil, 2024). It is the country with the highest number of notifications and with the circulation of the four DENV serotypes (WHO, 2024). In Maranhão, the fourth most populous state in the Northeast, 7,369 cases of dengue were reported in 2022, and 10,935 probable cases in the first half of 2024, with six deaths (Brazil/MS, 2024).

In addition to issues problems caused by DENV in Brazil for decades, the introduction of Chikungunya virus (CHIKV) in 2014 and Zika virus (ZIKV) in 2015, into Brazilian territory further increased the challenges for controlling these urban arboviruses in the country (Nunes *et al.*, 2015, Zanluca *et al.*, 2015). The overlapping

clinical signs and symptoms presented by them, associated with the limitations faced in differential diagnosis, have been an aggravating factor in this complex epidemiological scenario, in which the search for more effective surveillance and control strategies focused mainly on the *Aedes aegypti* vector must be developed (Brazil, 2016).

There are numerous environmental, social, and cultural factors that trigger arboviral transmission and influence the spread of these diseases (Villabona-Arenas *et al.*, 2014). In this context regard, it is worth highlighting the wide dispersion of *Ae. aegypti* throughout the national territory. A predominantly urban vector, it found favorable conditions for its development, especially in breeding sites found in the peridomestic areas of residences, such as water storage containers (Soares-da-Silva *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2021). This high proliferation favors the high incidence of dengue, the increase in severe cases and deaths (Andrioli; Busato; Lutinski, 2020). In addition, it consolidates the difficulties faced in controlling this vector, as a major challenge in underdeveloped countries (Ribeiro *et al.*, 2018; Cavalcante *et al.*, 2020).

In Brazil, to identify the most vulnerable areas and provide rapid and timely indexes, arbovirus control programs have utilized been applying the Rapid Survey of Infestation Index by *Ae. aegypti* (LIRAA) in by municipalities since 2003 (Brazil, 2013, Brazil, 2017). This strategy consists of a sample survey of properties, in which the Building Infestation Index (IIP) obtained is used as a reference to define priority areas to receive interventions (Brazil, 2019).

Thus, the National Guidelines for the Prevention and Control of Dengue Epidemics provide for vector control based on these indices as one of the main components for the prevention of dengue and other arboviruses (Brazil, 2013, Brazil, 2017). The use of geospatial analysis is another method that has proven efficient in elucidating the dynamics of occurrence of these diseases and their vector (Paiva Júnior *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

After the COVID-19 pandemic, a period in which there was possible underreporting due to the suspension of the work of endemic agents and the concentration of public health actions in combating the pandemic, Brazil experienced the highest number of arbovirus cases in the Americas in 2022, including severe dengue, with a rising trend (PAHO/WHO, 2023). In this sense, the objective was to associate the larval indices of LIRAA obtained in the municipalities of Maranhão with the incidence of dengue and climatic variables, in order to evaluate the predictive potential of LIRAA in relation to the occurrence of cases registered in the State in 2022,

and to identify the priority municipalities for interventions through the geospatial analysis of the incidence of dengue cases this year.

METHODOLOGY

Study area

Maranhão covers an area of 331,983.29 km², making it the eighth largest state in Brazil and the second in the Northeast in terms of territorial extension (IBGE, 2018). To the North it borders the Atlantic Ocean (639.5 km), to the South and Southwest it meets the State of Tocantins (1,060 km), to the West it borders the State of Pará (798 km) and to the East and Southeast it meets the State of Piauí, with an extension of 1,365 km. The State has five Geographic Mesoregions (North, West, Center, and South Maranhão), subdivided into 21 Geographic Microregions, where its 217 municipalities are located (IBGE, 2022). In 2022, Maranhão had an estimated population of 6,776,699 inhabitants (IBGE, 2022), the fourth largest in the Northeast region, and has the lowest Human Development Index (HDI) in Brazil, equal to 0.676 (IBGE, 2021).

Study Type and Data Collection

This is an ecological study carried out data from LIRAA, the incidence of dengue fever and meteorological data from municipalities in Maranhão in 2022. The Building Infestation Indexes (IIP), reflecting the infestation status of *Ae. aegypti* larvae and pupae in properties, were obtained from LIRAA conducted by the Zoonosis Surveillance Units (UVZ) in the municipalities (Brazil/SVS, 2019). In relation to the general LIRAA of the State, based on the four surveys carried out in the municipalities, the value of an annual LIRAA was calculated.

The confirmed dengue cases in the municipalities of Maranhão in 2022 were obtained from the Notifiable Diseases Information System (SINAN) through the Information and Informatics Department of the Unified Health System (DATASUS), fed mainly by the notification and investigation of cases of diseases and diseases of compulsory notification (Consolidation Ordinance No. 4, of September 28, 2017), available at <https://datasus.saude.gov.br/acesso-a-informacao/doencas-e-agrivos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>.

The dengue incidence coefficient was calculated by the ratio between the number of new cases in 2022 and the resident population in Maranhão in the same

period, multiplied by 100,000. The population was obtained through the 2022 demographic census, available in the IBGE database (IBGE, 2022). Climate data were obtained from the Climate data database, available at: <https://pt.climate-data.org/>.

For spatial analysis, the geometric features of the State of Maranhão in shapefile format were obtained from the map portal of the Brazilian Institute of Geography and Statistics-IBGE, available at: <http://portaldemapas.ibge.gov.br>.

Data analysis

LIRAA Analysis

Data were managed using Microsoft Excel 2013 (version 2406). Based on the definitions of epidemic risk from the Ministry of Health, which classifies Brazilian municipalities, analyses were performed according to IIP values: $< 1\%$ = satisfactory situation; $\geq 1\%$ and $< 4\%$ = alert situation; $\geq 4\%$ = high epidemic risk situation (Brazil, 2009).

To test the effect of LIRAA on the incidence of dengue fever, using data from all of Maranhão, a simple linear regression was performed. To validate the model (post-hoc analyses), the following were performed: Shapiro-Wilk test to verify the normality of the residues; Outlier deviation test of the residues; Durbin-Watson test to verify the independence of the residues; and Breush-Pagan test to verify the homoscedasticity of the residues.

To test the effect of environmental variables on Dengue Incidence and LIRAA, a multiple linear regression analysis was used (one selection for each response variable). In one analysis, the predictor variables were six climate variables and the response was Dengue Incidence; and in another, the predictor variables were six climate variables and the response was LIRAA. Data from seven environmental variables were used: mean temperature, minimum temperature, maximum temperature, air humidity, sunny days and precipitation. The autocorrelation (covariance) of the predictor variables was tested and those with correlation greater than 80% were removed.

Models were selected based on the first-order Akaike Information Criterion (AIC) using the stepwise-backward algorithm. This selection was made in order to verify whether they met the assumptions of independent residuals and whether they were distributed identically.

After selecting the best model, it was subjected to the same post-hoc tests as a simple linear regression: Shapiro-Wilk test to verify the normality of the residuals; outlier deviation test of the residuals; Durbin-Watson test to verify the independence of the residuals; Breush-Pagan test to verify the homoscedasticity of the residuals. To improve the model fit, the incidence variable was log-transformed for its normalization. The software used in the analyses was R (version 4.3.2). For all analyses, the significance level adopted was 5% ($p < 0.05$).

Spatial analysis

Kernel density estimation was used to calculate the spatial distribution of gross dengue incidence. This method allows the generation of heat maps highlighting areas with the highest incidence of dengue, making it possible to identify critical areas in the state based on confirmed dengue cases in 2022 by municipality. A raster file with multiple data frames was generated for each case from the points in order to allow comparison of dengue incidence in different municipalities. The maps were created and laid out with their cartographic elements using QGIS software (version 3.22).

To analyze local autocorrelation and identify spatial clusters among municipalities in Maranhão, the global Moran Index and the Local Indicators of Spatial Association (LISA) were performed based on the dengue incidence rate smoothed by the Empirical Bayesian method. A first-order matrix was created to verify the dependence between areas. The index ranges from -1 to +1, subdivided into four quadrants: high-high, areas of higher priority; low-low, areas of lower priority; low-high and high-low, transition areas. The LISA was obtained through the GeoDa software, version 1.14.

RESULTS

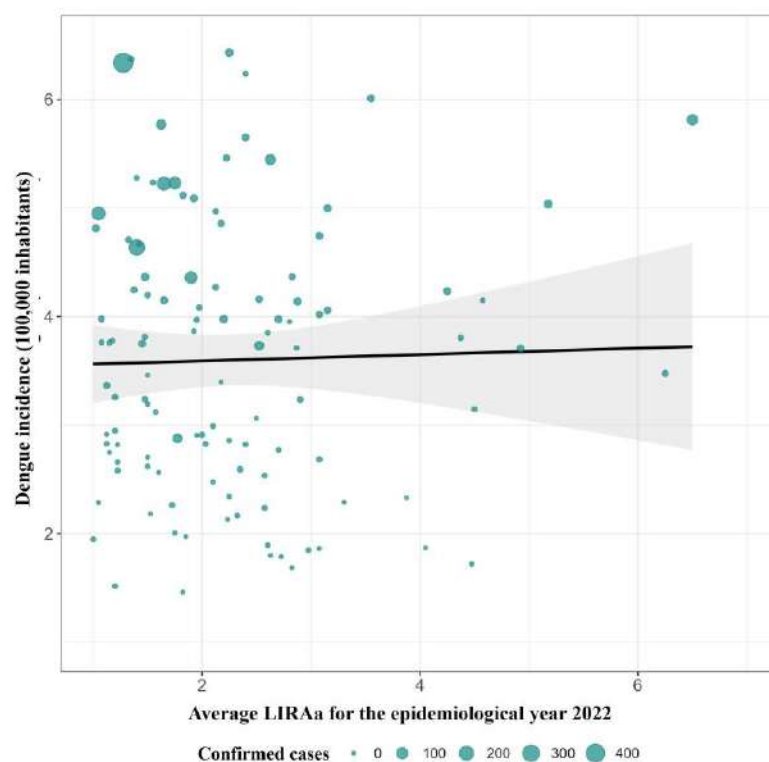
LIRAA Analysis on Dengue Incidence in Maranhão in 2022

The municipality of Tasso Fragoso presented the highest LIRAA index of the entire state in the year under study (11.2) and a high incidence of dengue (938.86). The second highest LIRAA index in the state was observed in Porto Franco (10.2), which presented an incidence of 334.94. São Raimundo das Mangabeiras, which in the first LIRAA exhibited an index of 7.3, presented a high incidence of dengue (1,038.8). The

municipalities that presented the highest LIRAA indexes in the second, third and fourth surveys were Tutóia, Carutapera and Miranda do Norte, respectively; however, all presented low incidences of arboviruses.

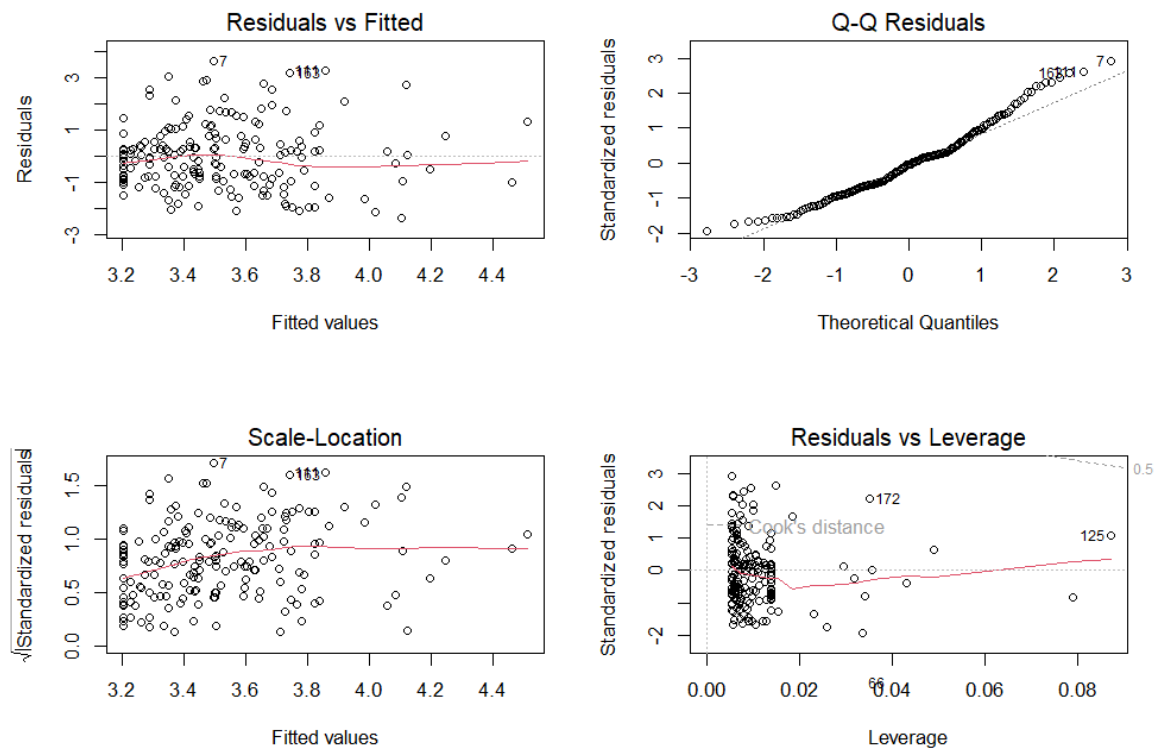
The analyses showed that there is a positive effect of LIRAA on the incidence of dengue, that is, as the LIRAA index increases, the incidence of dengue also increases. In other words, there is a positive correlation between the two variables. ($F = 10.41-186$; $R^2 = 0.0352$; $p = 0.0062$; $y = 0.2019x + 3.2017$) (Figure 1). All municipalities that at some point presented *Ae. aegypti* infestation rates in an alert or high-risk situation also exhibited high incidences of dengue or Chikungunya.

Figure 1. Simple regression analysis of LIRAA on the incidence of dengue in Maranhão in 2022.



Source: Authors themselves.

In Figure 2, the graphs show the dependence of dengue incidence on the influence of LIRAA. The analysis of the residuals of the models was displayed in a standardized and independent manner. In general, based on the aforementioned analyses, the model was considered to have a good fit.

Figure 2. Residue validation analyses.

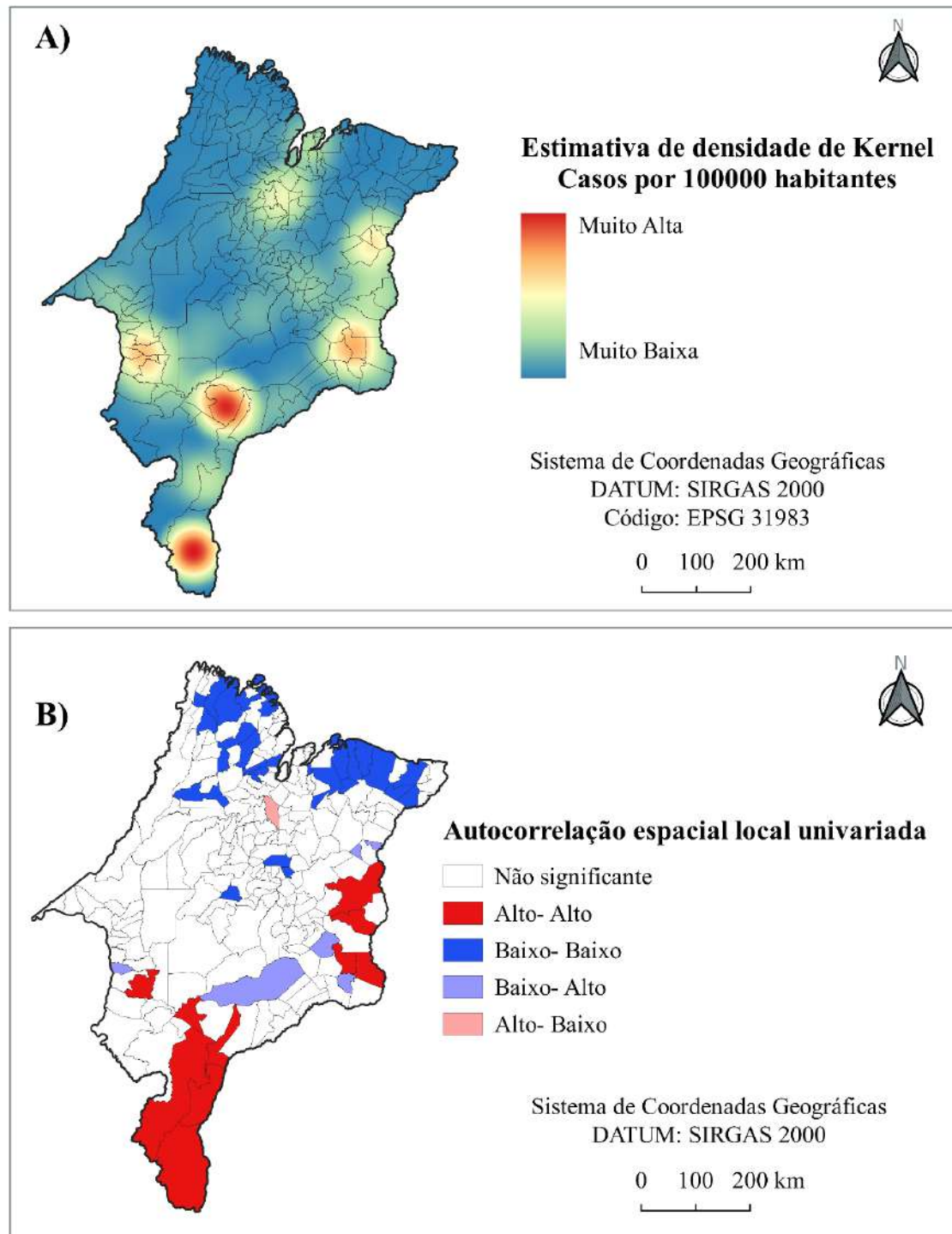
Source: Authors themselves.

Spatial distribution of dengue incidence in the state of Maranhão

When analyzing the spatial distribution of dengue, the Kernel tool identified critical for the disease areas in the southern region of Maranhão, in the municipalities of Alto do Parnaíba, São Raimundo das Mangabeiras, Tasso Fragoso; a point in the eastern region with high density, represented by the municipality of Lagoa do Mato, and two point with intermediate incidence identified in the municipalities of Caxias and Matões (Figure 3A).

According to the univariate local spatial autocorrelation, ten municipalities were considered to be at high risk of dengue fever in Maranhão: Alto Parnaíba, Balsas, Caxias, Fortaleza dos Nogueiras, Lagoa do Mato, Matões, Sambaíba, São Francisco do Maranhão, São João do Paraíso, and Tasso Fragoso. In addition to these, six municipalities are in transition to high-risk conglomerates: Afonso Cunha, Buriti Bravo, Campestre do Maranhão, Duque Bacelar, Mirador, and Sucupira do Riachão (Figure 3B).

Figure 3. Spatial distribution of dengue incidence in the state of Maranhão, 2022. **A)** Map of the Kernel density estimate of the crude incidence. **B)** Map of local indicators of spatial association for the incidence smoothed by the Empirical Bayesian method.



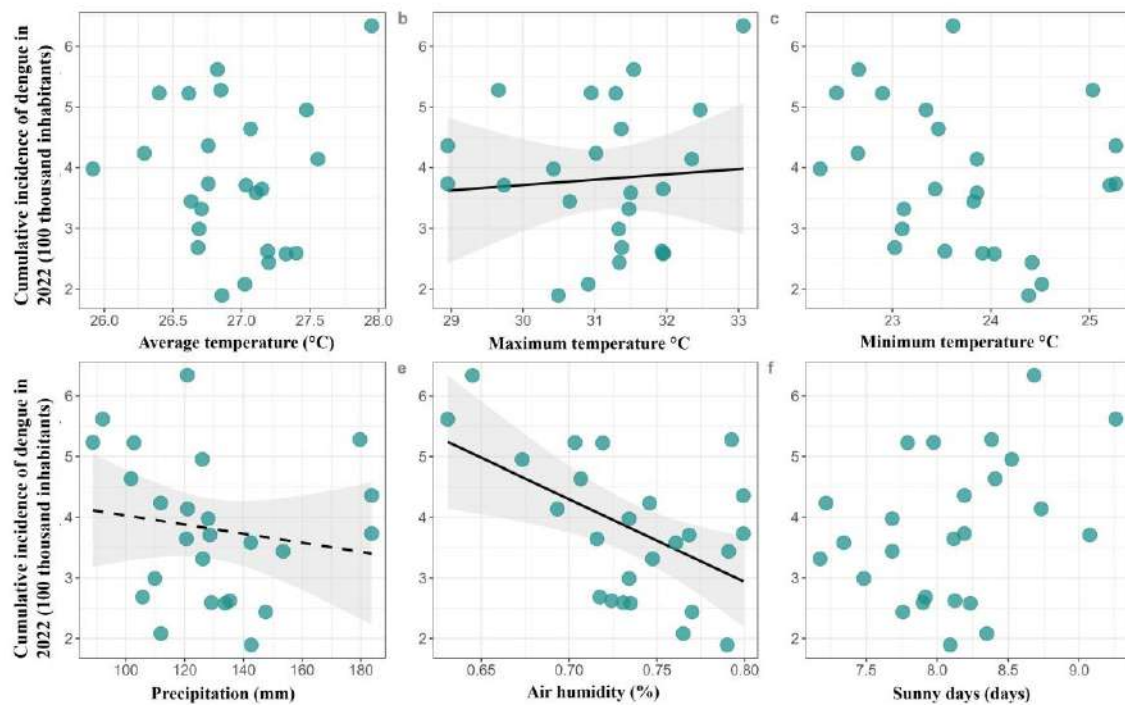
Source: IBGE, 2022.

Prepared by: Medical Entomology Laboratory – UEMA.

Analysis of dengue, climate variables and LIRAa

The analyses showed that there is an effect of environmental variables on the incidence of dengue ($F = 9.8743-21$; $R^2 = 0.5259$; $y = -0.8334x + 0.0180x -35.4534x + 53.5194$). (Figure 4). The influence of maximum temperature ($p = 0.0033$) and relative humidity ($p = 0.0000$) were significant. However, there was no effect of environmental variables on LIRAA. ($F = 2.3912-23$; $R^2 = 0.0548$; $p = 0.1257$) (Table 3).

Figure 4. Reported cases of dengue, climate variables and LIRAA in municipalities of Maranhão in 2022.



Source: Authors themselves.

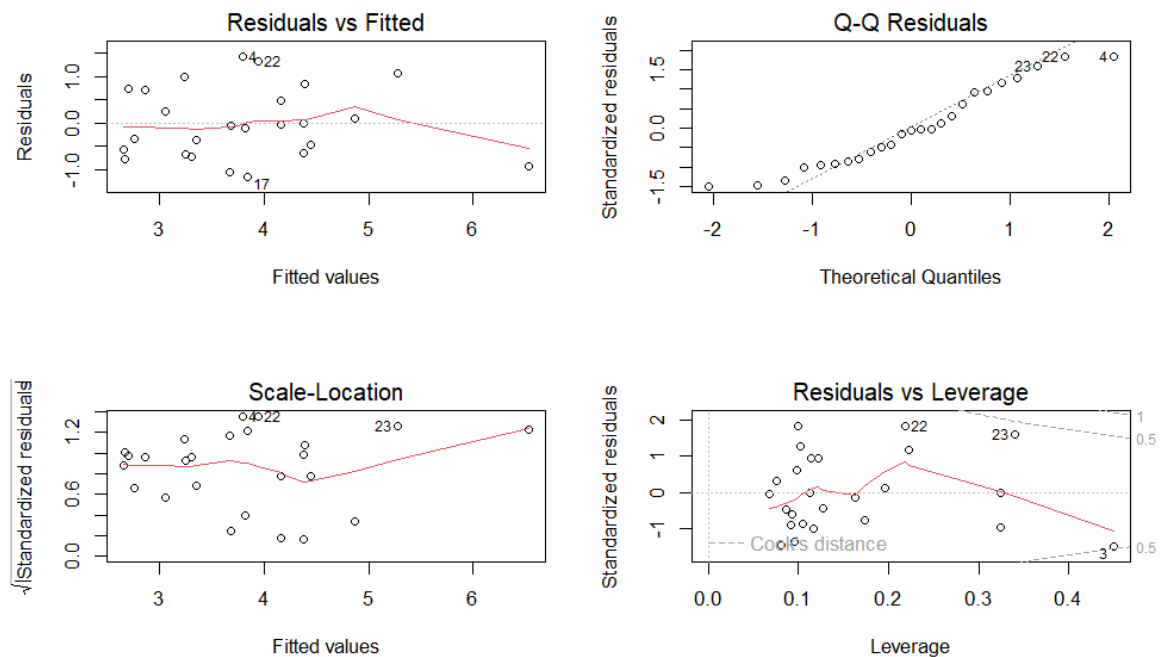
Table 1. Relationship between incidence and environmental predictors.

Model	Estimated	Standard error	t-value	p-value	Significance
Intercept	53.5194	11.3113	4.7320	0.0001	***
Maximum temperature	-0.8334	0.2511	-3.3190	0.0033	**
Precipitation	0.0181	0.0094	1.9230	0.0682	.
Air Humidity	-35.4534	6.6720	-5.3140	0.0000	***

Source: Authors themselves.

In Figure 5, the graphs show the validation analyses of the models: validation of the variance inflation factor test, normal distribution, independence and constant variance of the residuals. The graphs show that the validation analyses presented a model with excellent fit.

Figure 5. Analysis values for model validation.



Source: Authors themselves.

DISCUSSION

Arboviruses are a serious public health problem worldwide. In Brazil, in the first four weeks of 2024 alone, the country accounted for approximately 70% of the dengue cases reported in the Americas (WHO, 2024). In view of this alarming situation, the use of instruments and methods aimed at vector control, statistical tests, and spatial distribution have proven to be efficient in analyzing and interpreting data related to dengue and other neglected diseases (Rosso *et al.*, 2021; Mugabe *et al.*, 2021; Abdulsalam *et al.*, 2022).

This study reinforces the importance of reliably performing LIRAA in Brazilian municipalities and, at the same time, reaffirms that this technique can support local public policies to direct vector control and arbovirus prevention actions. The association observed between the high LIRAA rate and the increase in the number of dengue cases

in Maranhão further strengthens the role of this instrument in monitoring *Ae. aegypti* and in taking measures to prevent arbovirus outbreaks, especially dengue.

Similar results were found in the study carried out by Rivas et al. (2018) in Southern Brazil, and in that of Silva et al. (2020) in neighborhoods in Recife-PE, where the authors concluded that the information obtained through LIRAA allows vector control actions to be targeted more effectively. In addition to these, Ribeiro et al. (2021) when carrying out a comparative analysis between the IIP values and the Incidence Rates of 2011, 2012, 2013, 2015 and 2016, also obtained a significant correlation.

On the other hand, other authors question the prospect of LIRAA being a reference for guiding control actions (Chiaravalloti Neto *et al.*, 1999). Some have shown that LIRAA presents a certain degree of inaccuracy, and recommend adjustments in its implementation and the use of complementary policies to increase its predictive capacity (Souza *et al.*, 2018; Enslen; Lima Neto; Castro, 2020). However, the analyses carried out in this work show that the information obtained through LIRAA can be used to reliably indicate the regions with the greatest possibility of outbreaks in the territory.

The spatial distribution of dengue fever highlighted the most incident points in the southern region of Maranhão. These same municipalities, according to data from the Maranhão Health Department (SES), showed high incidences of dengue fever in 2022. Only two municipalities, Lagoa do Mato and Matões, which despite having appeared as incidents on the kernel map, according to the dengue fever data provided by SES for the year under study, showed low incidences of dengue fever and other arboviruses this year.

Univariate spatial autocorrelation indicated ten municipalities as areas of greatest risk of dengue fever in , and six that are in transition to these clusters, indicating that the incidence of dengue fever in a municipality can influence the occurrence and increase of this incidence in neighboring municipalities. In other words, the data reveal the municipalities that are priority areas for intensifying epidemiological surveillance in the state, and highlight those that are in transition to high-risk areas, and therefore need to strengthen actions aimed at preventing this disease.

Modeling of climate variables showed that relative humidity and maximum temperature positively influence the occurrence of dengue cases. Other authors have also reported that at the beginning of the year, due to the rainy season, which presents high relative humidity, there is an increase in the number of dengue cases (Costa *et al.*, 2021). Temperature is a climate variable that has been shown to regulate the occurrence

of dengue, with the favorable thermal threshold for the occurrence of the disease between temperatures considered high (Viana *et al.*, 2018). However, the lack of a relationship between environmental variables and LIRAA may attribute greater responsibility for the increase in this index to the population.

The data reveal efficiency in the predictive effect of LIRAA in relation to the incidence of dengue in Maranhão, and the spatial modeling indicated the areas with the highest risk of dengue and priority for the intensification of entomoepidemiological surveillance in the state. This study presented important techniques that can assist health authorities in the development of specific strategies and reinforces the need for more effective prevention and control actions in order to reduce the impact of the number of cases and the severity of dengue and other arbovirus epidemics.

REFERENCES

ABDULSALAM, Fatima Ibrahim et al. Influence of climate variables on dengue fever occurrence in the southern region of Thailand. **PLOS Global Public Health**, v. 2, n. 4, p. e0000188, 2022.

ANDRIOLI, Denise Catarina; BUSATO, Maria Assunta; LUTINSKI, Junir Antonio. Spatial and temporal distribution of dengue in Brazil, 1990-2017. **PLoS One**, v. 15, n. 2, p. e0228346, 2020.

BRASIL. Ministry of Health. Rapid Indices Survey for *Aedes aegypti* —LIRAA—for Entomological Surveillance of *Aedes aegypti* in Brazil. Brasília: Ministry of Health, Brazil;. Brasília: Ministry of Health, Brazil; 2013. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/levantamento_rapido_indices_aedes_aegypti.pdf . Acessado em 24 de maio de 2024.

BRASIL. Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. Epidemiological Bulletin. Brasília – DF, 2019.

CAVALCANTE, Ana Carolina Policarpo et al. Spatial modelling of the infestation indices of *Aedes aegypti*: an innovative strategy for vector control actions in developing countries. **Parasites & vectors**, v. 13, p. 1-13, 2020.

CHIARAVALLOTI NETO, Francisco et al. Evaluation of municipal actions to combat dengue vectors in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, 1989 to 1995. Journal of the **Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 32, p. 357-362, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estados: Maranhão**, Brasil, 2022. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/> >. Acesso em: 10 nov. 2022.

MUGABE, Vánio A. et al. Changes in the dynamics of dengue incidence in South and Central America are possibly due to cross-population immunity after Zika virus epidemics. **Tropical Medicine & International Health**, v. 26, n. 3, p. 272-280, 2021.

NUNES, Marcio Roberto Teixeira et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC medicine**, v. 13, p. 1-11, 2015.

ONU. 2024. **OMS: Brasil é o país mais afetado em novo surto de dengue nas Américas**. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2024/02/1827567>

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (PAHO/WHO), 2024. **Dengue**. Available in: <https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (PAHO/WHO), **Epidemiological Update: Dengue, Chikungunya and Zika**. January 25, 2023. Washington, D.C. PAHO/WHO. 2023. Available at: <https://www.paho.org/pt/documentos/atualizacao-epidemiologica-dengue-chikungunya-e-zika-25-janeiro-2023>

PAIVA JÚNIOR, Edmar Franco de et al. Automatic stratification of priority areas for dengue control using QGIS Model Builder in a multicriteria analysis. **Epidemiology and Health**, v. 29, n. 2, p. e2019028, 2020.

RIBEIRO, Guilherme Sousa et al. Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue?. **The Lancet Global health**, v. 6, n. 2, p. e140-e141, 2018. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00263320> RIBEIRO 2021

DE OLIVEIRA, Franklin Learcton Bezerra et al. *Aedes Aegypti* building infestation rates by cycle in Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brazil”“2007 a 2013. **Revista Gestão & Saúde**, v. 7, n. 1, p. ág. 260-269, 2016.

ROSSO, Fernando et al. Differentiating dengue from COVID-19: comparison of cases in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 3, p. 745, 2021.

SANTOS, Jefferson Pereira Caldas dos et al. ARBOALVO: territorial stratification to define areas of rapid response for surveillance and control of urban arboviruses in a timely manner. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 38, p. e00110121, 2022.

SILVA, Maria Beatriz Araújo et al. Use of the rapid index survey for *Aedes aegypti* (LIRAA) as a surveillance tool for the introduction of the Chikungunya virus in Recife. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 936-954, 2020.

SOARES-DA-SILVA, Joelma et al. Variation in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae) infestation in artificial containers in Caxias, state of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 174-179, 2012.

SOUSA, Sêmilly Suélen da Silva et al. Reproductive profile of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from an urban area endemic for arboviruses in the Northeast region of

Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e6310917631-e6310917631, 2021.

VILLABONA-ARENAS, Christian Julián et al. Detection of four dengue serotypes suggests rise in hyperendemicity in urban centers of Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2620, 2014.

WHO, 2024. **Dengue - Global situation.** Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON518> Acesso: 20 de julho de 2024.

WONG, Joshua M. et al. Dengue: a growing problem with new interventions. **Pediatrics**, v. 149, n. 6, 2022.

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