

VINÍCIUS DOS SANTOS SANTANA

**“ESTUDO DE ARBOVIROSES EM PACIENTES POSITIVOS
PARA MALÁRIA DA REGIÃO AMAZÔNICA”**

São José do Rio Preto-SP

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VINÍCIUS DOS SANTOS SANTANA

**“ESTUDO DE ARBOVIROSES EM PACIENTES POSITIVOS
PARA MALÁRIA DA REGIÃO AMAZÔNICA”**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio
Preto, para a obtenção do título de Mestre em
Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Santana, Vinícius dos Santos.

Estudo de arboviroses em pacientes positivos para malária da região Amazônica / Vinícius dos Santos Santana. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

74 f. : il ; 30 cm.

Orientador: Maurício Lacerda Nogueira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Arbovírus. 3. Malária - Região Amazônica. I. Nogueira, Maurício Lacerda. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título

CDU - 578

Vinícius dos Santos Santana

**Estudo de arboviroses em pacientes positivos para malária da
região Amazônica**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Virologia junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Paula Rahal
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 09 de Março de 2010.

AGRADECIMENTOS

À minha família que esteve sempre presente e me dando apoio. Aos meus amados pais Vanderlei Santana e Ana Maria P. S. Santana por todo amor, ensinamentos e sábios conselhos. À minha irmã Natália dos Santos Santana e à minha namorada Amanda Kelly de Lima Alvelan.

Ao meu orientador Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pela paciência e confiança para investir na minha formação, e ainda mais, pela sua amizade durante esses 2 anos de convivência.

Aos meus amigos do Laboratório Pesquisa em Virologia: Adriano, Ana Carolina Terzian, Ariele, Ana Theresa, Carol Pacca, Daiane, Danilo, Gislaine, Lígia, Mariana, Milena, Raphael, Roberta, Tatiana, Sílvia e Vanessa. Obrigado pelos conselhos, apoio, amizade e por compartilhar as minhas alegrias e também os meus problemas.

Aos meus amigos do mestrado pela convivência, confidências, riso farto e cumplicidade.

Ao curso de Pós Graduação em Microbiologia do IBILCE/Unesp, especialmente à Profa. Dra. Paula Rahal, pela coordenação e dedicação que desprende ao curso de Pós Graduação a cada dia e pela amizade a mim dedicada.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Microbiologia deste instituto, pelos ensinamentos, auxílio e amizade.

Aos professores Dra. Paula Rahal e Dr. Carlos Eugênio Cavasini, pela disponibilidade na composição da banca. Agradeço as sugestões que contribuirão para a melhoria deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

A região Amazônica apresenta extensas áreas de floresta e ecossistemas naturais, provendo condições favoráveis para a existência de muitos arbovírus. Mais de 200 arbovírus foram isolados na região Amazônica, e aproximadamente 40 estão associados a doenças humanas. Quatro dos 40 são considerados ser de importância para a saúde pública no Brasil: vírus da Dengue (sorotipos 1 a 4), Oropouche, Mayaro e Febre Amarela. Juntamente com os arbovírus, a malária é uma doença endêmica, e aproximadamente 98% dos casos estão restritos à região da Amazônia Legal. Este trabalho teve como objetivo analisar 111 amostras clínicas de soro de pacientes que residiam em Novo Repartimento (Pará), Porto Velho (Rondônia), Plácido de Castro (Acre) e Oiapoque (Amapá) previamente confirmados para malária. Para tal finalidade, foi utilizada a técnica de *Multiplex-Nested-PCR* e *RT-Nested-PCR* para a detecção e identificação dos principais arbovírus brasileiros, pertencentes aos gêneros *Flavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus*. Duas amostras de pacientes de Novo Repartimento foram positivas para Dengue sorotipo 2, e também, ambos tinham infecção por *Plasmodium vivax*. Apesar de dados escassos, infecções duplas por dengue e malária deveriam ser comuns em áreas onde ambas as doenças são co-endêmicas em muitas partes do mundo. Na região Amazônica Brasileira, esta situação provavelmente ocorre mais frequentemente que a detectada. Apesar de ambas as doenças causarem sintomas similares, e infecções simultâneas com dois agentes etiológicos podem resultar em uma doença com sintomas sobrepostos, e possivelmente, tanto o espectro clínico da doença e/ou o tratamento pode ser afetado. Neste contexto uma coinfeção por malária e dengue não poderia ser descartada, e o diagnóstico deveria ser realizado concomitantemente para dengue e malária em pacientes febris vivendo ou retornando de áreas onde ambas as doenças são co-endêmicas. A confirmação da malária por gota espessa é rápida, e o pequeno número de casos de infecções simultâneas

diagnosticadas no Brasil, provavelmente, quando confirmada, ninguém normalmente procura por outro patógeno como o agente causador da doença.

Palavras-chave: Arbovírus, Malária, região Amazônica

The Amazon region has extensive forested areas and natural ecosystems, providing suitable conditions to the existence of several arboviruses. Over 200 arboviruses were isolated in the Amazon region, and about 40 are associated to human diseases. Four out of 40 are considered to be of public health importance in Brazil: dengue virus (serotypes 1-4), Oropouche, Mayaro and Yellow Fever. Along with arboviruses, malaria is an endemic disease caused by protozoans *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Brazil, and about 98% of the cases are restricted to the Legal Amazon region. The aim of this study was to test 99 serum clinical samples from patients living in Novo Repartimento (Pará), Porto Velho (Rondônia), Plácido de Castro (Acre) and 12 plasma samples from patients living in Oiapoque (Amapá), previously confirmed for malaria. For this purpose, we used *Multiplex-Nested-PCR* and *RT-Nested-PCR* assays for detection and identification of the major Brazilian arboviruses, belonging to the genus *Flavivirus*, *Alphavirus* and *Orthobunyavirus*. We detected Dengue virus serotype 2 in two serum samples from patients living in Novo Repartimento, and both had active *Plasmodium vivax* infections. Despite scant data, dual dengue and malaria dual infections should be common in areas where both diseases are co-endemic in many places of the world. In the Amazon region, this situation is likely to occur more frequently than detected. In spite of having similar clinical findings, and simultaneous infections with two etiological agents can result in a disease with overlapped symptoms, possibly either clinical spectrum of the disease or treatment can be affected. In this context, concurrent dengue and malaria could not be ruled out, and diagnosis should be made concomitantly in febrile patients living or returning from areas where both diseases are co-endemic. The malaria confirmation by thick smear assay is quick, and probably, the small number of simultaneous infections

cases diagnosed in Brazil is because, when malaria is confirmed, nobody normally searches for another pathogen as the causative of the disease.

Keywords: Arbovirus, Malaria, Amazon region

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
2. Arboviroses	13
2.1. Gênero <i>Flavivirus</i>	13
2.1.1 Vírus do Dengue (DENV)	14
2.1.2 Vírus da Febre Amarela (YFV)	15
2.1.3 Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV)	16
2.1.4 Vírus do Nilo Ocidental (West Nile, WNV)	17
2.1.5 Vírus Rocio (ROCV)	18
2.1.6 Vírus Ilhéus (ILHV)	18
2.2 Gênero <i>Alphavirus</i>	19
2.2.1 Vírus Mayaro (MAYV)	19
2.2.2 Vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV)	20
2.2.3 Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV)	21
2.2.4 Vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV)	21
2.3 Gênero <i>Orthobunyavirus</i>	22
2.3.1 Vírus do Oropouche (OROV)	23
OBJETIVO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 Amostras clínicas	28
5.2. Vírus	28
5.3 Extração de RNA	29
5.4 Estratégia de estudo	30
5.4.1 Primers	31
5.4.2 Duplex-RT-PCR para detecção de <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i>	32
5.4.3 Multiplex-Nested-PCR para identificação de <i>Alphavirus</i>	32
5.4.4 Multiplex-Nested-PCR para identificação de <i>Flavivirus</i>	33
5.4.5 RT-Nested-PCR para a identificação do vírus Oropouche	33
5.5 Sequenciamento nucleotídico	34
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	51
ANEXO	62

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais

O Brasil é um país tropical de grande extensão territorial, apresentando extensas áreas de florestas e outros ecossistemas naturais na região Amazônica, bem como uma grande diversidade de plantas e animais, apresentando condições favoráveis para a ocorrência de diversas arboviroses que são mantidas em uma grande variedade de ciclos zoonóticos (FIGUEIREDO, 2007; FIGUEIREDO, 2000).

Os arbovírus são vírus de RNA transmitidos por artrópodes (FIGUEIREDO, 2007), na maioria pertencente às famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) e *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*) (VASCONCELOS et al., 1998). São mantidos na natureza envolvendo vetores artrópodes hematófagos (na maioria mosquitos e carrapatos), e vertebrados silvestres (na maioria pássaros e mamíferos (VASCONCELOS et al., 2005; FIGUEIREDO, 2007).

A malária é uma doença infecciosa aguda, e seus agentes etiológicos no Brasil são *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*, sendo transmitidos ao homem através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Todos os anos milhares de casos de malária são notificados no Brasil e, atualmente, a maioria está restrita à Amazônia Legal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Juntamente com as espécies de *Plasmodium*, mais de 200 espécies diferentes de arbovírus que foram isolados na região Amazônica (FIGUEIREDO, 2007), 40 estão associados a doenças em humanos (VASCONCELOS et al., 1998). Por outro lado, somente quatro destas doenças causadas por arbovírus são consideradas de importância na saúde pública na região Amazônica: Oropouche

(ORO), Dengue (DEN), Mayaro (MAY) e Febre Amarela (YF), todos eles associados com surtos epidêmicos, ocorrendo os dois primeiros (ORO e DEN) em áreas urbanas, e os dois últimos (MAY e YF), principalmente em áreas rurais (VASCONCELOS et al., 1992; VASCONCELOS et al., 2001).

Há poucos relatos sobre coinfeção por dengue e *Plasmodium* na literatura, e todos eles foram de casos isolados (CHARREL et al., 2005; BHALLA et al., 2006; DERESINSKI, 2006; THANGARATHAM et al., 2006; WARD, 2006; KAUSHIK et al., 2007; CHANDER et al., 2009).

Recentemente, coinfeções por dengue e *Plasmodium* foram reportadas na região Amazônica da Guiana Francesa (CARME et al., 2009). Na região Amazônica Brasileira, coinfeção por arbovírus e *Plasmodium* foi reportada em 1990. A primeira detecção foi em 1971, e as outras 5 foram detectadas em 1974, 1983, 1984 e 1987. Estes casos de febre de origem desconhecidas foram previamente diagnosticados como malária, e apesar do tratamento, os sintomas permaneceram e os agentes etiológicos encontrados foram os vírus Guaroa, Tacaiuma e Catu, todos arbovírus pertencentes à família *Bunyaviridae* (VASCONCELOS et al., 1990).

De acordo com Charrel et al. (2005) e Bhalla et al. (2006), apesar de escassos relatos disponíveis publicados, esta situação provavelmente ocorre mais frequentemente que a detectada.

2. Arboviroses

2.1. Gênero *Flavivírus*

O gênero Flavivírus é constituído por 53 espécies de vírus. Destes, 27 são transmitidos por mosquitos, 12 por carrapatos, e 14 são agentes zoonóticos sem vetor conhecido (GUBLER et al., 2007). As partículas virais são pequenas (aproximadamente 50 nm), envoltas por um envelope lipídico, contendo uma única fita de RNA polaridade positiva de aproximadamente 11 kb. O genoma é composto por 10 genes na seguinte ordem: 5'-C-PrM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3' que estão contidos em uma ORF. A poliproteína codificada pela ORF é clivada resultando em 3 proteínas estruturais (E, M e C) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a e NS2b, NS3, NS4a e NS4b, e NS5) (LINDENBACH et al., 2007).

Atualmente, onze flavivírus são conhecidos no Brasil: Bussuquara (BUS), Cacipacoré (CPC), Dengue tipos 1 a 4 (DENV 1-4), Iguape (IGU), Ilhéus (ILH), Rocio (ROC), Encefalite de Saint Louis (SLE), e Febre Amarela (YFV), incluindo o vírus selvagem e a linhagem vacinal 17DD (FIGUEIREDO, 2000).

2.1.1 Vírus do Dengue (DENV)

Os vírus do dengue são os flavivírus mais importantes causadores de doença no Brasil (FIGUEIREDO, 2000). Em 1981, DENV-1 e DENV-4 foram os primeiros a serem isolados em uma epidemia ocorrida em Boa Vista (Roraima). Após um período de silêncio epidemiológico, DENV-1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro) e o Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais) em 1986-1987, espalhando-se pelo país desde então, com a introdução de DENV-2 em 1990-1991, e o DENV-3 em 2001-2002 (CÂMARA et al., 2007).

O vírus da dengue é composto de quatro sorotipos distintos, DENV-1 a DENV-4, que é transmitido pela picada dos mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. DENV

causa uma diversidade de doenças em humanos, desde doença febril aguda, febre do dengue (DF) e febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue (DHF-*Dengue Hemorrhagic Fever*/DSS- *Dengue Shock Syndrome*). A febre do dengue é uma doença auto-limitada, embora debilitante, caracterizada por febre, dor de cabeça, dor retroorbital, mialgia, artralgia, e exantema. DHF é marcada pelo aumento da permeabilidade vascular, trombocitopenia e manifestações hemorrágicas. DSS ocorre quando fluidos extravasam para os espaços intersticiais, resultando em choque, que sem tratamento apropriado pode levar à morte (CLYDE et al., 2006).

2.1.2 Vírus da Febre Amarela (YFV)

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África (VASCONCELOS, 2003). O YFV mantém-se em ciclos urbanos e silvestres. No ciclo urbano, a transmissão é feita pelo mosquito da espécie *Aedes aegypti* diretamente ao homem, atuando o próprio homem infectado, na fase virêmica, como amplificador e disseminador do vírus. No ciclo silvestre, envolvem-se primatas não-humanos e mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* como vetores (FIGREIREDO, 2007), sendo as espécies mais importantes *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, e *Sabethes chloropterus*, permanecendo infectados por toda a vida, e os macacos atuando somente como hospedeiros amplificadores do vírus (VASCONCELOS, 2003).

No Brasil, admitem-se três áreas epidemiológicas de risco da febre amarela: a área endêmica, área de transição (conhecida também como epizoótica ou de emergência) e a área indene. Atualmente, a área endêmica inclui as regiões Norte e Centro Oeste e o Estado do Maranhão. Nos últimos anos, a área epizoótica aumentou, passando a incluir além das regiões

ocidentais de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, bem como as dos Estados do Piauí e Bahia no nordeste, e Santa Catarina e Rio Grande do Sul na região Sul (VASCONCELOS et al., 2003).

O vírus da febre amarela (YFV) é o agente causador de hepatite severa, seguida de febre hemorrágica em aproximadamente 10% dos indivíduos infectados (FIGUEIREDO, 2007). A infecção pelo YFV pode ser assintomática, causar doença febril aguda ou branda, e casos graves de febre hemorrágica, apresentando falência hepática, insuficiência renal e morte (FONSECA, 1996).

2.1.3 Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV)

O vírus SLE causa uma doença aguda no homem, com um espectro de manifestações que varia de uma síndrome febril à fatal meningoencefalite (VASCONCELOS et al., 1991).

O vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) é amplamente distribuído nas Américas, do Canadá a Argentina (FIGUEIREDO, 2007). A primeira linhagem obtida no Brasil foi isolada em 1960, de um pool de dípteros da espécie *Sabethes belisarioi* capturado ao longo da estrada Belém-Brasília (VASCONCELOS et. al., 1998). Os reservatórios são os pássaros selvagens, primatas, preguiças, tatus e marsupiais, tendo como vetores mosquitos do gênero *Culex*, especialmente as espécies *Culex coronator* e *Culex declarator* (FIGUEIREDO, 2007; VASCONCELOS et. al., 1998; VASCONCELOS et al., 1991).

Na Amazônia brasileira, somente dois casos foram reportados, entretanto, a prevalência de anticorpos na população varia de 1 a 5 %. Mais além, imunidade para SLE foi assinalada em aves capturadas ao longo das rodovias amazônicas (VASCONCELOS et al., 1991). Em 2004, SLEV foi isolado na cidade de São Pedro, sudeste do Brasil, de um paciente com doença febril aguda e apresentava cefaléia severa, e pensava-se ter dengue (FIGUEIREDO,

2007). Em 2006, durante uma epidemia de DENV-3, houve o primeiro surto de SLEV em São José do Rio Preto, São Paulo, onde 12 casos e um caso de co-infecção por DENV-3 e SLEV foram reportados (MONDINI et. al., 2007).

2.1.4 Vírus do Nilo Ocidental (West Nile, WNV)

O vírus West Nile (WNV) foi primeiramente isolado em 1937 do sangue de uma mulher com febre no distrito West Nile de Uganda. Na década de 1950 causou em Israel uma doença febril em humanos e na década de 1970 ficou restrita à África, Europa, Ásia e Oceania. Em 1999 o vírus causou um surto de encefalite em humanos em Nova York. Nos anos subsequentes houve uma difusão da Costa Leste à Oeste dos Estados Unidos, e posteriormente em direção à América Central. A partir de 2004 foram identificados anticorpos em equinos da Colômbia e da Venezuela. Em 2006, o vírus foi isolado de equinos na Argentina (Buenos Aires) (KOTAIT et al., 2008). Pode ser dividido geneticamente em duas linhagens: a linhagem 1 mais comumente associada com doença humana; a linhagem 2 é mantida em focos enzoóticos na África e causam doença branda ocasional em humanos. Pássaros são os hospedeiros amplificadores primários, e o vírus é mantido e disseminado em um ciclo pássaro-mosquito-pássaro (MACKENZIE et. al., 2004), onde a maioria dos pássaros são de espécies migratórias (FIGUEIREDO, 2007). A emergência do WNV no Brasil é susceptível, pois muitas aves reservatórios migram do Hemisfério Norte para o Brasil. E, conseqüentemente, o Brasil também possui uma ampla variedade de espécies migratórias que anteriormente foram descritas como reservatórios, tal como a espécie *Passer domesticus* (FIGUEIREDO, 2007). O vírus é transmitido por mosquitos, geralmente do gênero *Culex* (MACKENZIE et. al., 2004), mas a transmissão por órgãos transplantados e transfusão de sangue também foram reportadas (PEARLER et. al., 2002; STRAMER et. al., 2005).

A febre do West Nile geralmente é caracterizada por febre, cefaléia, dor nas costas, mialgias e anorexia, persistindo de três dias a uma semana. Dor nos olhos, faringite, náusea, vômito, diarreia e dor abdominal pode também ocorrer. Aproximadamente de 1 em 150 infecções resultam em meningite ou encefalite (MACKENZIE et. al., 2004).

2.1.5 Vírus Rocio (ROCV)

O vírus Rocio (ROCV) foi o causador de uma epidemia de encefalite severa que durou de 1973 a 1980 no Vale do Ribeira, na costa Sudeste do Brasil (FIGUEIREDO, 2000). O vírus Rocio foi isolado uma vez de um papagaio da espécie *Zonothrichia capensis* na região do Vale do Ribeira, e anticorpos em outras espécies de pássaros sugerem que se mantém em um ciclo na qual pássaros selvagens (VASCONCELOS et al., 1998), incluindo algumas espécies migratórias, são provavelmente os reservatórios e os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Psorophora* são os vetores. No ano de 2004, dois pássaros foram encontrados apresentando anticorpos para o vírus Rocio na região Sul (FIGUEIREDO, 2007).

Tipicamente, a doença começa com febre, dor de cabeça, anorexia, náusea, vômito, mialgia e mal-estar. Tardamente, sinais de encefalite aparecem abruptamente, com fraqueza, distensão abdominal, confusão, comprometimento motor, irritação da meninge e síndrome cerebelar (VASCONCELOS et. al., 1998).

2.1.6 Vírus Ilhéus (ILHV)

O vírus Ilhéus foi isolado de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Psorophora* capturados em 1944 na cidade de Ilhéus, na costa leste do Brasil. Exceto para Febre Amarela e Dengue, este é o flavivírus com a mais alta taxa de anticorpos na população na bacia Amazônica. Ocorre

por todo o Brasil, tendo o mosquito da espécie *Psorophora ferox* como vetor mais importante. Outras espécies de *Psorophora* (*Psorophora albipes* e *Psorophora lutzii*) e a espécie *Aedes serratus* desempenham um papel secundário no ciclo de manutenção (VASCONCELOS et al., 1998). Morcegos e pássaros atuam como reservatório do vírus, não estando associado a epidemias, e foi isolado de alguns pacientes esporádicos (FIGUEIREDO, 2000). Os sintomas são repentinos e com febre alta, dor de cabeça intensa, calafrios, mialgia e fraqueza, persistindo os sintomas por 3 a 5 dias aproximadamente (VASCONCELOS et. al., 1998).

2.2 Gênero *Alphavirus*

O gênero *Alphavirus* compreende 25 vírus, todos transmitidos por artrópodes. São envelopados, de RNA de polaridade positiva com simetria icosaédrica. O nucleocapsídeo é envolto em um envelope lipídico derivado da membrana plasmática do hospedeiro que contém as proteínas virais, E1 e E2. Os genomas são de 11 a 12 kb e são organizados com as proteínas não-estruturais (nsP1-nsP2-nsP3-nsP4) no 5' terminal e proteínas estruturais(C, E3, E2, 6K e E1) no 3' terminal. As nsPs são traduzidas do RNA genômico e as proteínas estruturais do RNA subgenômico (GRIFFIN, 2007).

2.2.1 Vírus Mayaro (MAYV)

O vírus Mayaro foi o responsável por surtos de doença febril aguda na região Amazônica e no Planalto Central do Brasil (FIGUEIREDO, 2007). Os principais isolamentos no Brasil foram feitos em 1955, de pacientes com doença febril aguda. É endêmico na Amazônia e uma das mais altas taxas de anticorpos estão associadas a trabalhadores na

floresta. Por essa razão, a mais alta prevalência de anticorpos foi encontrada nas comunidades indígenas brasileiras (VASCONCELOS et al., 1998).

Surtos de Mayaro são geralmente limitados às zonas rurais próximas ou dentro de florestas, onde mosquitos da espécie *Haemagogus janthinomys*, o principal vetor, é encontrado com abundância (VASCONCELOS et al., 1998). O ciclo é semelhante ao ciclo silvático da febre amarela, incluindo macacos como reservatórios (FIGUEIREDO, 2007), embora pássaros possam atuar como hospedeiros secundários (VASCONCELOS et al., 1998). A doença do Mayaro é caracterizada por febre, cefaléia, mialgia, artralgia, artrite, sudorese, náusea, fotofobia e vertigem. Artralgia e febre estão presentes em todos os pacientes, enquanto rash maculopapular está presente em dois terços deles (VASCONCELOS et al., 1998; FIGUEIREDO, 2007).

2.2.2 Vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV)

O vírus da encefalite do leste (EEEV) está amplamente distribuído nas Américas (VASCONCELOS et al., 1998). No Brasil, o vírus já foi isolado nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, onde foi o responsável por epizootias. Na Amazônia, embora existam evidências sorológicas em residentes de certas localidades, não há indícios de surtos de encefalite (VASCONCELOS et al., 1991). O vírus é mantido em um ciclo envolvendo pássaros selvagens e roedores como reservatório. Uma ampla variedade de aves silvestres de diversas famílias parece ser susceptível, notavelmente as espécies *Thamnophilus aethiops* e *Phlegopsis nigromaculata* (família *Formicariidae*), e *Ramphocelus carbo* (família *Thraupidae*) das quais linhagens do vírus também foram obtidos (VASCONCELOS et al., 1998; VASCONCELOS et al., 1991). Mosquitos da espécie *Culex pedroi* são reconhecidos como vetores enzoótico, e da espécie *Aedes taeniorhynchus* como vetor epizoótico (FIGUEIREDO, 2007). Entretanto,

em 1991, 14 linhagens de EEEV foram obtidos de 96 pools de mosquitos da espécie *Aedes albopictus* capturados na Flórida, indicando que esta espécie pode desempenhar um papel na manutenção do vírus, e pode tornar-se um importante vetor em áreas tropicais. O vírus está associado com meningoencefalite no homem e equinos apresentando uma alta taxa de morbidade e mortalidade (VASCONCELOS et al., 1998).

2.2.3 Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV)

O complexo VEE é formado pelos subtipos I a VI: VEE (subtipos I e II), Mucambo (MUC, subtipo III), Pixuna (PIX, subtipo IV), Cabassou (CAB, subtipo V) e Rio Negro (subtipo VI). Na Amazônia brasileira, têm sido isolados os subtipos III (MUC) e IV (PIX) (VASCONCELOS et al., 1991; VASCONCELOS et al., 1998). O vírus é mantido em um ciclo envolvendo roedores, pássaros e mosquitos do gênero *Culex* podem estar envolvidos na transmissão do vírus ao homem (FIGUEIREDO, 2007; VASCONCELOS et al., 1998).

Nenhum caso humano de encefalite causada pelos vírus foi registrado no país, apesar da alta prevalência de anticorpos na população (IVERSSON, 1990).

A doença geralmente segue um curso benigno, caracterizado por febre alta, cefaléia severa, mal-estar, tonturas, calafrios, anorexia, mialgia e artralgia. Mais além, náusea acompanhada por vômito e diarreia pode ocorrer (OSORIO e YUILL, 1994).

2.2.4 Vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV)

O vírus da encefalite equina do oeste (WEEV) é amplamente distribuído nas Américas, do Canadá à Argentina. No Brasil, anticorpos contra o agente foram encontrados da Amazônia à região Sul, e linhagens foram obtidas de pássaros selvagens, os principais

hospedeiros vertebrados de WEEV em outros locais. Na mesma região, entretanto, uma alta prevalência de anticorpos foram encontrados em pássaros selvagens pertencentes à família *Formiicaridae*, especialmente as espécies *Phlegopsis nigromaculata* e *Hylophilax poecilonota*, e à Família *Tyrannidae*, principalmente a espécie *Corythopsis torquata*, das quais vírus já foram isolados. Embora, WEEV foi isolado de espécimens únicas de *Aedes fulvus*, *Culex taeniopus* e *Cx. portesi*, na Amazônia, os vetores artrópodes no Brasil, não foram cuidadosamente investigados e muitos outros vetores podem existir (VASCONCELOS et al., 1991). Na América do Norte, WEEV está associada com meningoencefalites nos homens e equinos, com alta morbidade e mortalidade. As doenças iniciam-se com febre alta, cefaléia e sintomas de envolvimento do sistema nervoso central (CNS), letargia, rigidez de pescoço, fotofobia, sonolência, vertigem, irritabilidade, convulsões, tremor e deficiência neuro-motora superior, e mudanças no status mental (VASCONCELOS et. al., 1998).

2.3 Gênero *Orthobunyavirus*

A família *Bunyaviridae* inclui mais de 300 vírus distintos compreendidos em 4 gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus* (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007). A grande maioria destes vírus é de arbovírus transmitidos por mosquitos, flebótomos ou carrapatos e mantidos na natureza como agentes causadores de zoonoses. Fazem exceção os Hantavirus, que infectam roedores e têm mecanismos de transmissão relacionados à inalação de aerossóis das excretas desses animais. Também, pertencem à família *Bunyaviridae* o gênero *Tosposvirus*, dos quais 28 incluem vírus que infectam vegetais (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007). No Brasil foram isolados dezenas de vírus da família *Bunyaviridae*, sendo o mais importante deles, do ponto de vista epidemiológico, o OROV, por causar epidemias extensas na região Amazônica (VASCONCELOS, et al, 1998).

2.3.1 Vírus do Oropouche (OROV)

O vírus Oropouche (OROV) pertence ao gênero *Orthobunyavirus* (família *Bunyaviridae*), sorogrupo Simbu, é envelopado apresentando de 80 a 120 nm, e possui três segmentos de RNA de fita única, polaridade negativa, que são designados (large=L), (medium=M) e (small=S). Estes segmentos são responsáveis pela codificação de seis proteínas, sendo três estruturais: a proteína do nucleocapsídeo (N), codificada no segmento S; e duas glicoproteínas de superfície, Gn e Gc, codificadas no segmento M. As proteínas não estruturais NSs, NSm e L (polimerase viral) são codificadas nos segmentos S, M e L, respectivamente (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

Entre os anos de 1961 e 2006, um grande número de epidemias foi registrado em diferentes centros urbanos do estado do Pará, do Amazonas, Amapá, Maranhão, Tocantins e Rondônia, sendo considerada, a Febre do Oropouche, a mais frequente arbovirose que acomete o homem depois da dengue na Amazônia brasileira (NUNES et al., 2007). Diferentemente de Trinidad, Peru e Panamá, onde apenas os genótipos I, II e III circulam, respectivamente, no Brasil as três diferentes linhagens foram encontradas (NUNES et al., 2005; AZEVEDO et al., 2007).

O vírus é mantido na natureza em dois ciclos distintos: um ciclo silvático incluindo preguiças, macacos e talvez pássaros como reservatórios, e mosquitos das espécies *Culex quinquefasciatus* e *Ae. scapularis* como vetores; e um ciclo urbano envolvendo o homem como reservatório e a espécie de mosquito *Culicoides paraensis* como o vetor (PINHEIRO et al., 1997; FIGUEIREDO, 2007).

A Febre do Oropouche é caracterizada por um início abrupto com febre, cefaléia, mialgia, artralgia, anorexia, tontura, calafrios e fotofobia são os sintomas mais observados, algumas vezes associada com meningite asséptica. Náusea, vômito, diarréia, dor epigástrica,

dor retrotubular, congestão conjuntival e sensação de queimação também foram reportadas. Exantema é raro e somente foi observado em 5% de todos os pacientes. A recorrência dos sintomas é comum da doença (VASCONCELOS et al., 1998; PINHEIRO et al., 1997).

Finalmente, desde os anos 80, dengue se tornou o principal problema de saúde pública no Brasil e se tornou mais frequente na região Amazônica. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de arbovírus (especialmente o vírus do dengue) em amostras clínicas de pacientes com malária da região Amazônica.

OBJETIVO

4. OBJETIVOS

- Identificar arboviroses brasileiras em amostras clínicas de soro e plasma de pacientes previamente confirmados para malária da região Amazônica utilizando métodos de biologia molecular para identificação de *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*.
- Realizar o levantamento dos dados epidemiológicos de dengue e malária referente ao ano em que as amostras foram coletadas.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras clínicas

Em nosso estudo, nós investigamos a presença de arbovírus em 99 amostras clínicas de soro e 12 de plasma, sendo 40 de Novo Repartimento (Pará), 30 de Plácido de Castro (Acre), 29 de Porto Velho (Rondônia) e 12 de Oiapoque (Amapá), que foram previamente confirmadas para malária por gota espessa. As amostras de soro de pacientes que residiam Novo Repartimento, Plácido de Castro e Porto Velho foram coletadas no ano de 2004, e as amostras de plasma de Oiapoque em 2009. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP.

5.2. Vírus

Os arbovírus utilizados neste estudo como controles positivos estão listados na Tabela 1. Com exceção da amostra viral Dengue 3, isolada no Laboratório de Pesquisas em Virologia da FAMERP, as demais foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Morais Figueiredo do Laboratório de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Os vírus foram propagados em culturas celulares, segundo metodologia descrita por Figueiredo (1990), bem como em camundongos neonatos, conforme descrito por Shope & Sather (1979). Para tanto, camundongos lactentes (Balb/c), com dois dias de idade, mantidos em gaiolas e acompanhados de suas mães, foram inoculados via intracerebral com 20µl de suspensão viral. Os animais foram diariamente observados para presença de sintomas característicos de infecção, tais como retardo do crescimento, apatia e encefalite. Depois de detectadas as lesões, os animais foram recolhidos e sacrificados para extração do extrato

cerebral por meio de introdução de uma agulha na região occipital e aspiração de todo o conteúdo tecidual. O aspirado foi diluído (1:20) em meio de cultura contendo antibióticos, centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm (Eppendorf A-4-44), 4°C e armazenado em alíquotas de 200µl a -80°C, até o momento do uso. A infecção foi confirmada pela detecção do genoma viral nas suspensões celulares e extratos cerebrais por métodos de RT-*Nested*-PCR específicos para arboviroses (Bronzoni, Moreli *et al.*, 2004; Bronzoni, 2005).

Em relação ao WNV utilizamos plasmídeo contendo a região NS5 da cepa NY99 (cedido pelo Prof. Luiz Tadeu Figueiredo).

Tabela 1. Relação das estirpes de arbovírus brasileiros utilizadas no estudo.

Família	Gênero	Vírus (abreviação)	Estirpes (abreviação)
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Mayaro (MAYV)	BeAr 20290
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Dengue (DENV)	DENV 1 Mochizuki DENV 2 SpH 125367 DENV 3 RP41 DENV 4 Boa Vista
		<i>St. Louis Encephalitis</i> (SLEV)	BeH 355964
		Ilhéus (ILHV)	BeH 7445
		Rocio (ROCV)	SpH 34675
		West Nile (WNV)	NY 99
		Febre Amarela (<i>Yellow Fever</i> -YFV)	17DD (vacina)
		<i>Bunyaviridae</i> <i>Orthobunyavirus</i>	Oropouche (OROV)

5.3 Extração de RNA

O RNA foi extraído a partir de 140µl de amostras clínicas, suspensões celulares ou do extrato cerebral de camundongos, utilizando, para tanto, o *Qiamp Viral RNA Kit* (QIAGEN Inc., USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final obtido foi de 60µl.

5.4 Estratégia de estudo

As amostras clínicas foram analisadas para a detecção e classificação do agente viral em *Alphavirus* e/ou *Flavivirus* segundo estratégia desenvolvida por Bronzoni e colaboradores, na qual se utiliza o método de RT-PCR em duas etapas. Na primeira delas, *primers* gênero-específicos são usados simultaneamente, em um sistema de *Duplex-RT-PCR*. Em uma segunda etapa, *primers* espécie-específicos foram usados simultaneamente em um sistema de *Nested-PCR* para a identificação da espécie viral. Desta forma, três *Multiplex-Nested-PCR* (M-N-PCR) foram usadas: uma para a identificação dos vírus VEE, EEE, WEE, MAY e AURA; outra M-N-PCR para a identificação dos vírus DEN (sorotipos 1 a 3), YF e SLE; e a última para a identificação dos vírus DEN-4, ILH, ROC e WN. Para a detecção e identificação do vírus Oropouche, seguiu-se a metodologia de RT-N-PCR desenvolvida por Morelli e colaboradores (2002). A Tabela 2 relaciona os arbovírus pesquisados nas amostras clínicas.

FAMÍLIA	GÊNERO	VÍRUS (ABRVIACÃO)
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Venezuelan Equine Encephalitis (VEEV) Eastern Equine Encephalitis (EEEV) Western Equine Encephalitis (WEEV) Aura (AURAV) Mayaro (MAYV)
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Dengue (DENV sorotipos 1 a 4) St. Louis Encephalitis (SLEV) Ilhéus (ILHV) Rocio (ROCV) Febre Amarela (<i>Yellow Fever</i> - YFV) West Nile virus (WNV)
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	Oropouche (OROV)

Tabela 2. Relação dos arbovírus brasileiros pesquisados.

5.4.1 Primers

Os *primers* usados para a detecção dos *Alphavirus* se ligam a regiões do gene da proteína nsP1, enquanto que os usados para a detecção dos *Flavivirus* se ligam a regiões do gene da proteína NS5. Para a detecção do OROV foram usados *primers* que se ligam no segmento S do genoma viral. Os *primers* usados no presente estudo estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3. *Primers* utilizados no estudo.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' - 3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Referência
<i>Primers</i> gênero-específicos para <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i>			
M2W (+)	YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	434	Pfeffer <i>et al.</i> (1997)
CM3W (-)	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC		
FG1 (+)	TCAAGGAACCTCCACACATGAGATGTACT	1000	Fulop <i>et al.</i> (1993)
FG2 (-)	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA		
<i>Primers</i> espécie-específicos para <i>Alphavirus</i>			
NVEE (+)	ACGGAGGTAGACCCATCCGA	400 ¹	Bronzoni <i>et al.</i> (2004)
NEEE (+)	CCACGGTACCGTTGCC	124 ¹	
NWEE (+)	GGCGGCAGACCTGCTGGAA	208 ¹	
NAURA (+)	TCAATGCACCTTCGACCA	86 ¹	
NMAY (+)	GGAAGTTGGCCAAGGC	270 ¹	
<i>Primers</i> espécie-específicos para <i>Flavivirus</i>			
NDEN1 (-)	CGTTTTGCTCTTGTTGCGC	472 ²	Bronzoni <i>et al.</i> (2005)
NDEN2 (-)	GAACCAGTTTGGTTDRITTCATCGCTGCC	316 ²	
NDEN3 (-)	TTCCTCGTCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659 ²	
NDEN4 (-)	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222 ²	
NSLE (-)	ATT CTT CTC TCA ATC TCC GT	232 ²	
NBSQ (-)	AAG TGA CAC CTG TTC AGG GTA	388 ²	
NILH (-)	TCC ACC GCT GAT CTG AGC CCG TGA	474 ²	
NROC (-)	TCA CTC TTC AGC CTT TCG	230 ²	
NYF-253 (-)	TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT	253 ²	
<i>Primers</i> específicos para <i>Oropouche</i>			
BUN-S	AGT AGT GTG CTC CAC	300	Moreli <i>et al.</i> (2002)
BUN-C	AGT AGT ATA CTC CAC		
BS-S	GTG GGG TCC AAT TTG C		
BS-C	TGA ACC CTA TGC ATC T		

¹Com o *primer* cM3W. ²Com o *primer* FG1. (+): sentido genômico; pb: pares de bases.

5.4.2 Duplex-RT-PCR para detecção de *Alphavirus* e *Flavivirus*

A RT foi realizada pela adição de 8µl de RNA em uma mistura contendo 4µl de solução tampão cinco vezes concentrada (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1,4µl de DTT (*Dithiothreitol*) a 0,1M, 1,6µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP (*DeoxynucleosideTriphosphate*), 1µl de cada *primer* cM3W (a 100µM) e FG2 (a 15µM), 20U do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-Invitrogen, USA), 200U de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20µl. A mistura foi incubada a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 minutos.

A mistura de PCR consistiu de 8µl do produto da RT, 5µl da solução tampão 10 vezes concentrada (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 2µl de MgCl₂ a 50mM, 4µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP, 1µl de cada *primer* M2W (a 50µM) e FG1 (a 15µM), 1U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 50µl. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 2 min, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min. As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA).

5.4.3 Multiplex-Nested-PCR para identificação de *Alphavirus*

A mistura de M-N-PCR consistiu de 1µl do produto obtido na D-RT-PCR, 1 U da enzima polimerase, 5µl da solução tampão 10 vezes concentrada, 2µl de MgCl₂ a 50mM, 1µl do *primer* cM3W a 100µM, 1µl dos *primers* espécie-específicos NVEE, NEEE, NWEE e NMAY (a 15µM cada), 4µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP e água suficiente para

completar 50µl. A mistura foi submetida a 25 ciclos térmicos iguais aos descritos para a primeira PCR.

Os *amplicons* foram visualizados à luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose a 1% (peso/volume) seguido de coloração com brometo de etídeo (Ausubel, 1997).

5.4.4 Multiplex-Nested-PCR para identificação de *Flavivirus*

A M-N-PCR para identificação dos *Flavivirus* foi realizada conforme descrito no item 4.4.2., com a exceção dos *primers* usados, os quais foram NDEN-1, NDEN-2, NDEN-3, NYF-253 e NSLE, juntamente com o *primer* FG1 (1µl de cada *primer* a 15µM) para a primeira M-N-PCR. E a segunda M-N-PCR foi realizada para a identificação dos outros *Flavivirus* conforme descrito no item 1.4.3, utilizando os *primers* FG1, NDEN-4, NROC, NILH, e NWN (1µl de cada *primer* a 151µM).

5.4.5 RT-Nested-PCR para a identificação do vírus Oropouche

A RT foi realizada pela adição de 8µl de RNA em uma mistura contendo 4µl de solução tampão cinco vezes concentrada (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1,4µl de DTT (*Dithiothreitol*) a 0,1M, 1,6µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP (*DeoxynucleosideTriphosphate*), 1µl do *primer* BUN-C (a 15 µM), 20U do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-Invitrogen, USA), 200U de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20µl. A mistura foi incubada a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 minutos.

A mistura de PCR consistiu de 8µl do produto da RT, 5µl da solução tampão 10 vezes concentrada (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 2µl de MgCl₂ a 50mM, 4µl da mistura

contendo 250 μ M de cada dNTP, 1 μ l do *primer* BUN-C (a 15 μ M) e 1 μ l BUN-S (a 15 μ M), 1U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 50 μ l. A mistura foi submetida a 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min. As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA).

A mistura da Nested-PCR consistiu de 1 μ l do produto obtido na RT-PCR, 1 U da enzima polimerase, 5 μ l da solução tampão 10 vezes concentrada, 2 μ l de MgCl₂ a 50mM, 1 μ l do *primer* BS-S a 15 μ M, 1 μ l do *primer* BS-C (15 μ M), 4 μ l da mistura contendo 250 μ M de cada dNTP e água suficiente para completar 50 μ l. A mistura foi submetida a 25 ciclos térmicos iguais aos descritos para a primeira PCR.

Os *amplicons* foram visualizados à luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose a 1% (peso/volume) seguido de coloração com brometo de etídeo (AUSUBEL 1997).

5.5 Sequenciamento nucleotídico

Os *amplicons* obtidos foram seqüenciados pelo método dideoxinucleotídeo (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977). Em algumas ocasiões, foram previamente clonados em vetor plasmidial.

Os *amplicons* obtidos nos métodos de (M)-N-PCR foram purificados com etanol baseado na metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001) (Sambrook, 2001). Os *amplicons* foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5 ml para a adição de 3 μ L de acetato de Sódio 3M seguido da adição de 150 μ l de etanol 100%. O DNA foi precipitado por 20min a -80°C. Após centrifugação de 20 minutos a 13200 rpm (Eppendorf F45-24-11), 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 μ L de etanol 70% (Merck). Em seguida foi realizada centrifugação de 10 minutos, a 13200 rpm, 4°C para obtenção de um precipitado, o qual foi homogeneizado em 20 μ L de água ultra-pura (Invitrogen).

A clonagem dos *amplicons* foi feita em vetor pGEMT easy vector (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante. Para a reação de ligação, foram misturados 1 µl do produto da N-PCR, na concentração de 50 ng/µl, 1 µl de vetor e 1 µl da enzima T4 Ligase. Após incubação overnight a 4°C. Bactérias eletro-competentes *E.coli* DH5α (100 µl) foram transformadas com 5 µl do produto da ligação no eletroporador a 25000 volts por 3 segundos. Logo em seguida, 1 mL de meio LB foram adicionados e as bactérias foram incubadas por 1 hora e meia a 37°C, sob agitação constante de 200rpm (câmara com agitação, modelo MA-830, Marconi). Foram plaqueados 100 µl da transformação em Ágar/LB/ampicilina (50 µg/mL) seguido de incubação overnight a 37°C.

Uma vez identificada a presença de colônias, estas foram colocadas em 4 mL de meio LB contendo 2 µl/mL de ampicilina (50 µg/mL) e incubadas overnight a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Para a identificação das colônias que apresentavam o inserto de interesse, PCR foi realizada com 2 µl da cultura bacteriana, seguindo as metodologias descritas no item 5.4.2.

Os clones positivos tiveram seu DNA extraído usando o FastPlasmid Mini (Eppendorf, Alemanha), segundo recomendações do fabricante.

O seqüenciamento foi realizado utilizando o *Big Dye Terminator Kit v3.1* (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. Na reação de PCR para seqüenciamento foram utilizados tanto os *primers* genéricos quanto os espécie-específicos (3,2 µM). O DNA obtido foi centrifugado por 20 minutos, a 13200 rpm, 4°C, precipitado com 80 µL de isopropanol 75% e homogeneizado com 2,0 µL de tampão contendo EDTA 0,5M pH8.0 e Blue Dextran. O DNA foi desnaturado a 95°C por 2 minutos, e a eletroforese foi realizada no aparelho ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências foram analisadas usando o programa DS Gene 2.0 (Alcerys, USA) e o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

Totalizando, no período de Janeiro a Setembro do ano de 2004, houve 14.942 casos de dengue registrados nos Estados estudados. No mesmo ano, juntamente com os casos de dengue, houve 219.900 casos de malária registrados no período de Janeiro a Outubro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005a, 2005b, 2005c, 2005d). No ano de 2009, no Estado do Amapá, foram confirmados 13.558 e 3140 casos de malária e dengue, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a, 2009b) (Figura 1). Nos municípios estudados houve 39.525 casos de malária no total, no ano de 2004 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005a, 2005b, 2005c, 2005d) (Figura 2).

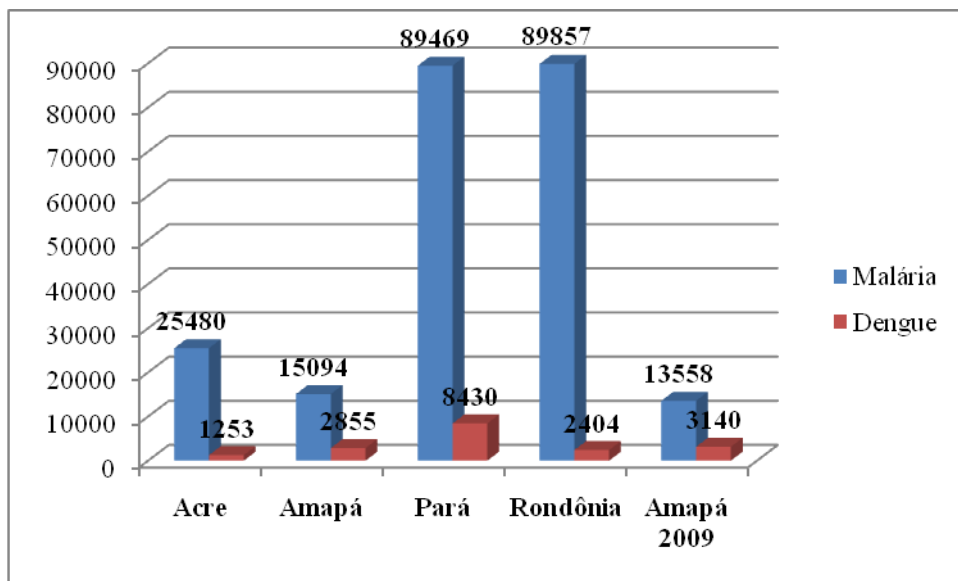


Figura 2. Número de casos de malária e dengue registrados nos Estados estudados no ano de 2004, e no Estado do Amapá no ano de 2009.

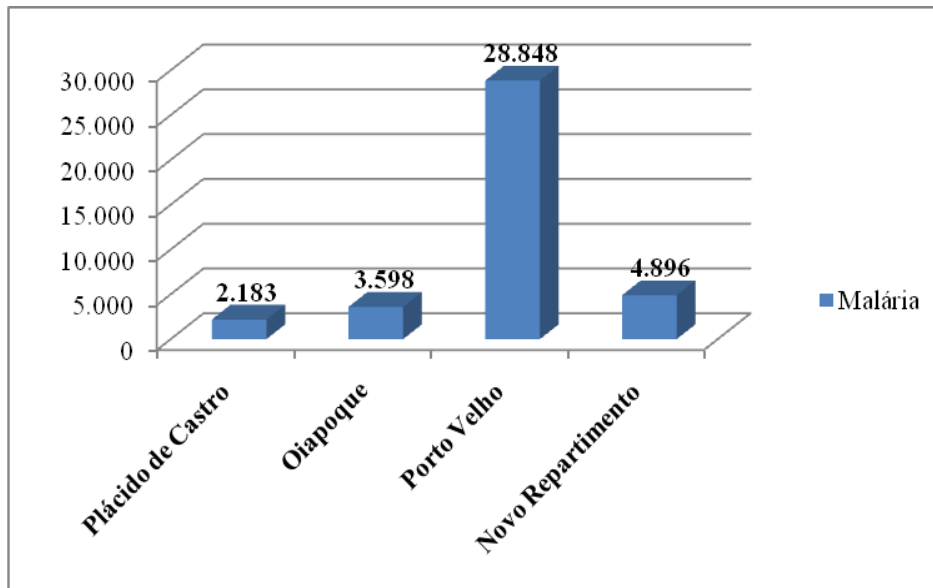


Figura 2. Número de casos de malária registrados nos municípios estudados no ano de 2004.

No Acre, dos 22 municípios do Estado, 11 são prioritários para o Programa de controle da dengue, concentrando 79,4% da população, porém Plácido de Castro não está entre estes municípios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005a). No Amapá, 3 dos 62 municípios são prioritários, concentrando 79% da população, entre eles está o município Oiapoque (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005b). Em Rondônia, 10 dos 52 municípios são prioritários, concentrando 56% da população, entre eles está Porto Velho (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005c). No Pará, 32 dos 143 municípios são prioritários, concentrando 61,3% da população, não estando incluso o município Novo Repartimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005d).

Exceto para os casos autóctones, a transmissão da malária está restrita à região da Amazônia Legal (Figura 3A). Em contraste, de acordo com dados do ano de 2006, aproximadamente 3.970 municípios brasileiros estão infestados pelo mosquito *Aedes aegypti* (Figura 3B). Portanto, todos os municípios estudados estão enquadrados nas áreas de risco de transmissão das doenças mais prevalentes na região Amazônica, dengue e malária (Figura 4)

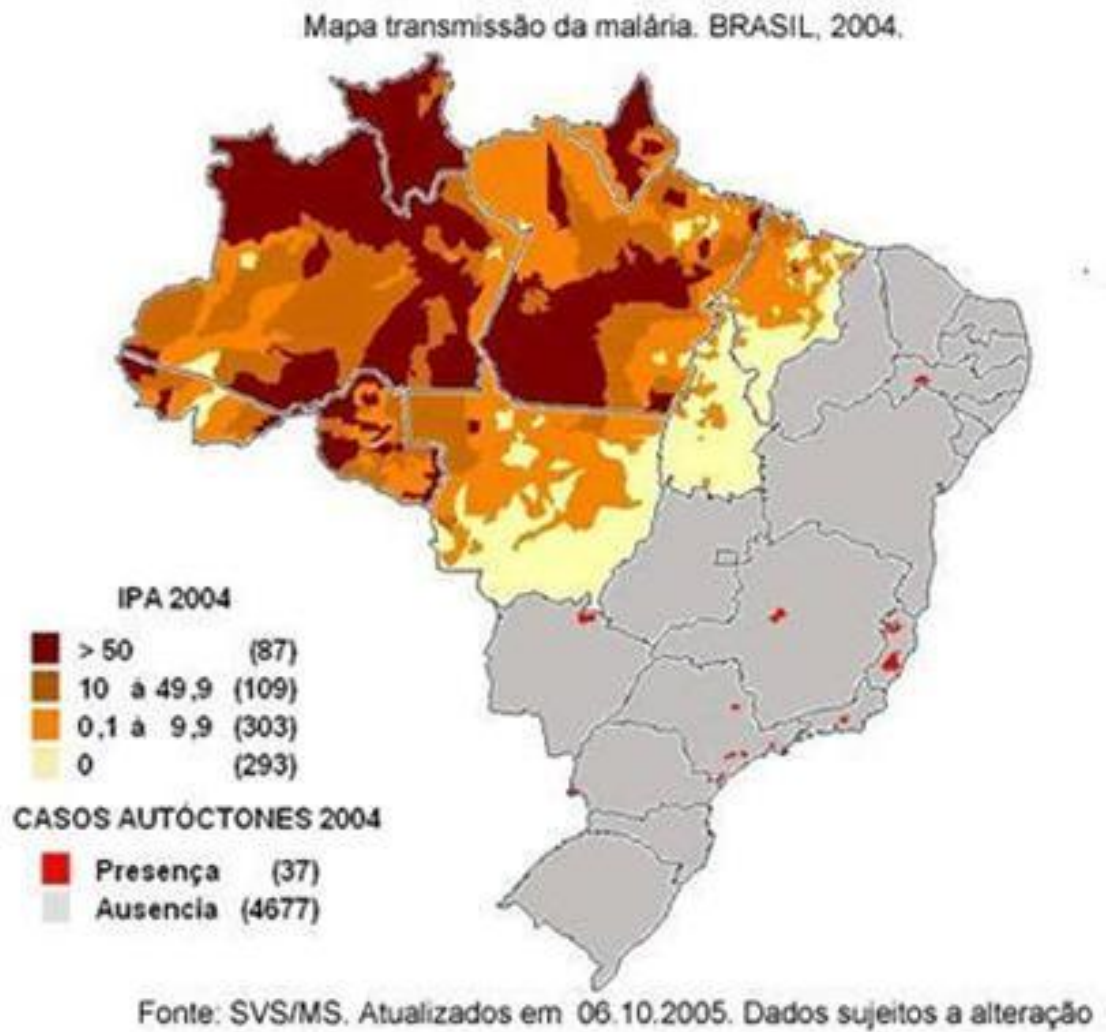


Figura 3A. Mapa de risco da transmissão da malária por município na Amazônia Legal.

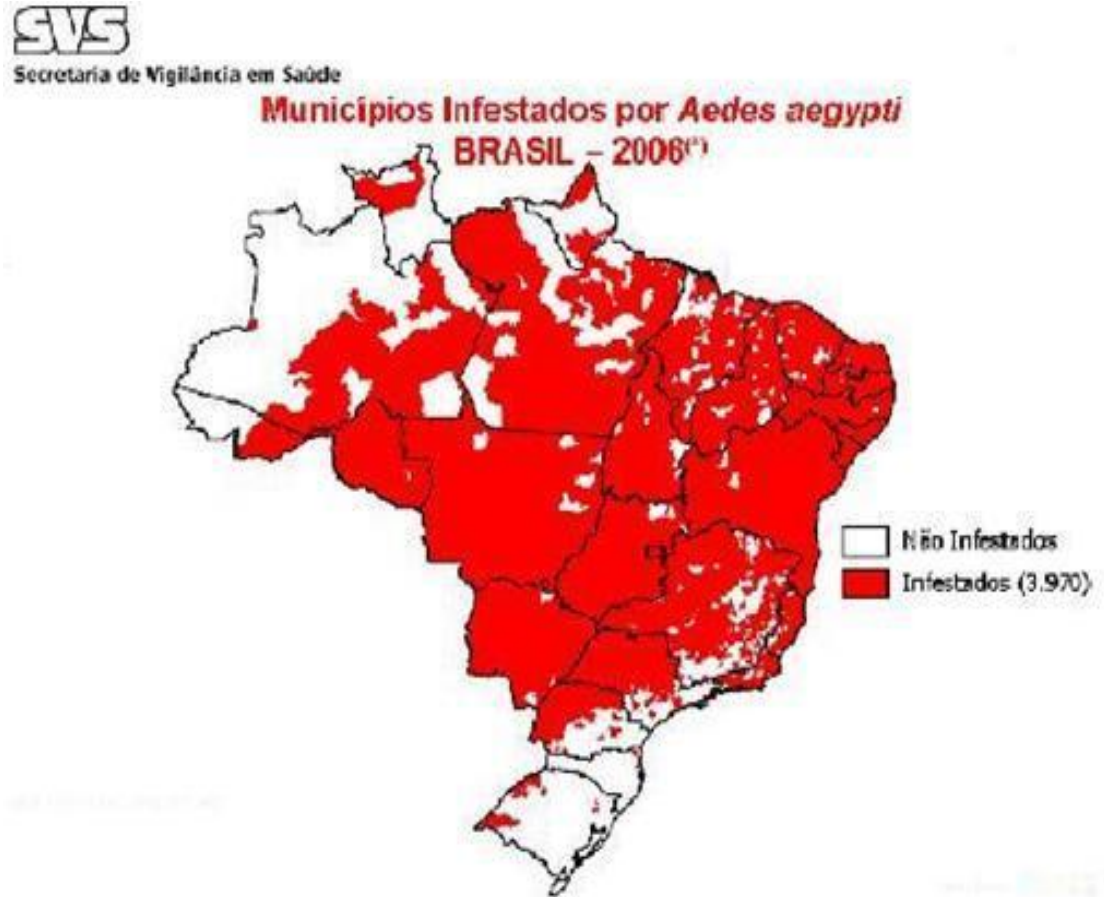
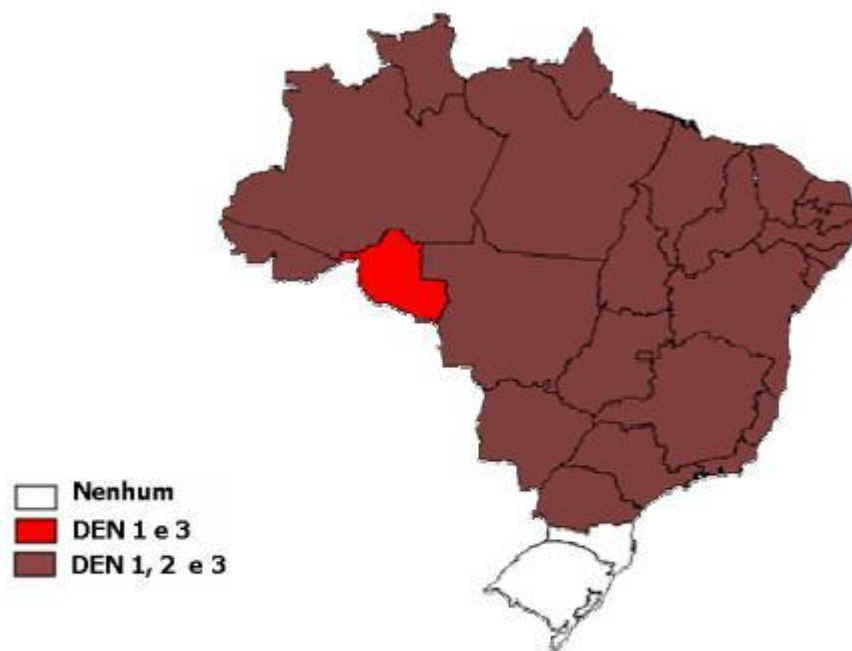


Figura 3B. Mapa dos municípios infestados pelo mosquito *Aedes aegypti* no Brasil.



Figura 4. Área de estudo onde as amostras foram coletadas na região Amazônica. Macapá, Estado do Amapá (AP; 00°02_20__S; 51°03_59__W); Novo Repartimento, Estado do Pará (PA; 04°19_50__S; 49°47_47__W); Porto Velho, Estado de Rondônia (RO; 08°45_43__S; 63°54_14__W) e Plácido de Castro, Estado do Acre (AC; 10°16_33__S; 67°09_00__W).

Dos 111 pacientes positivos para malária testados para a presença de arbovírus brasileiros, 80 tiveram infecção por protozoários da espécie *Plasmodium vivax* e 31 por protozoários da espécie *Plasmodium falciparum*. Dengue e malária concomitante foi detectada em 2 pacientes dos 111, que foram previamente diagnosticados como malária antes do screening molecular para arbovírus. Os pacientes com co-infecção residiam em Novo Repartimento (PA), sendo um homem de 57 anos e uma mulher de 20 anos, e ambos tinham infecção por Dengue (sorotipo 2) e pelo protozoário da espécie *Plasmodium vivax*. Houve tentativa de isolamento dos vírus detectados, porém não obtivemos sucesso. Em contraste, o sorotipo encontrado nas amostras é um dos sorotipos circulantes do vírus da dengue nos Estados estudados (Figura 5). O perfil eletroforético das amostras clínicas positivas para DENV-2 pode ser observado na Figura 6.



* Dados até o mês de fevereiro/05, sujeito a alterações.

Figura 5. Sorotipos circulantes do vírus da dengue por Estados, Brasil, 2004.
Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde.

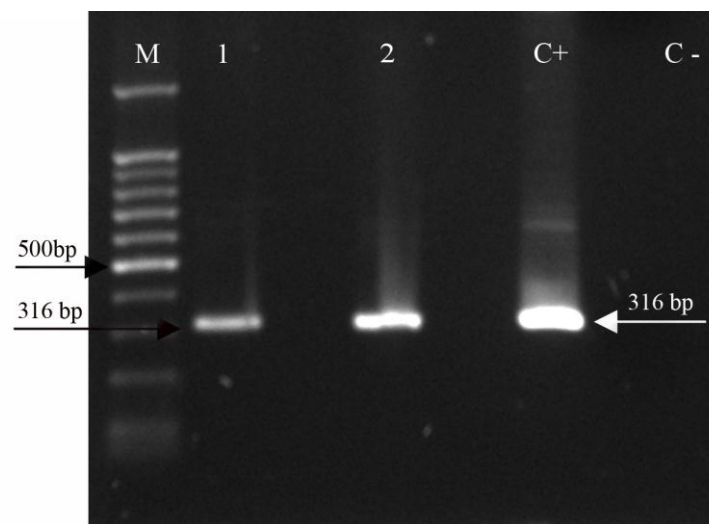


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos *amplicons* obtidas na Multiplex-Nested-PCR para a detecção de Flavivirus em amostras clínicas de pacientes de Novo Repartimento (Pará). M: marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 1 e 3: amostras positivas para DENV-2; +: controle positivo para DENV-2; e -: controle negativo.

Não houve detecção de nenhum dos outros arbovírus do gênero *Flavivirus* (Dengue (sorotipos 1, 3 e 4), Encefalite de Saint Louis, Ilhéus, Rocio e West Nile), assim como

nenhum *Alphavirus* (Encefalites equinas (EEEV, VEEV e WEEV), Aura e Mayaro) e *Orthobunyavirus* (Oropouche). O perfil eletroforético das amostras negativas pode ser observado na Figura 7.

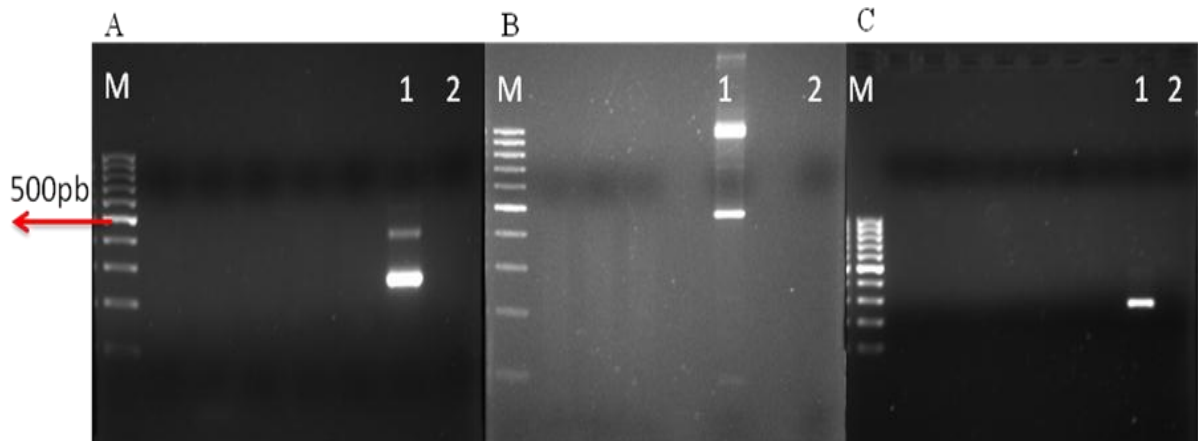


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (1%) da Multiplex-Nested-PCR. M: marcador de peso molecular (100 pb) e 2: controle negativo. A) Multiplex-Nested-PCR para detecção de Alphavirus; 1: controle positivo para o vírus Mayaro. B) Multiplex-Nested-PCR detecção de Flavivirus; 1: controle positivo para o vírus Ilhéus. C) RT-Nested-PCR para a detecção de Bunyavirus (Oropouche); 1: controle positivo para o vírus Oropouche.

6.1 Sequenciamento nucleotídico

O genoma viral detectado nas 2 amostras clínicas foi sequenciado (fig. 8) e analisado usando o software DS Gene 2.0 (Accelrys, USA) e BLAST para confirmação do diagnóstico. Ambas as amostras tiveram diagnóstico por PCR para o vírus da Dengue sorotipo 2. A análise nucleotídica destas amostras confirmou o diagnóstico por PCR.

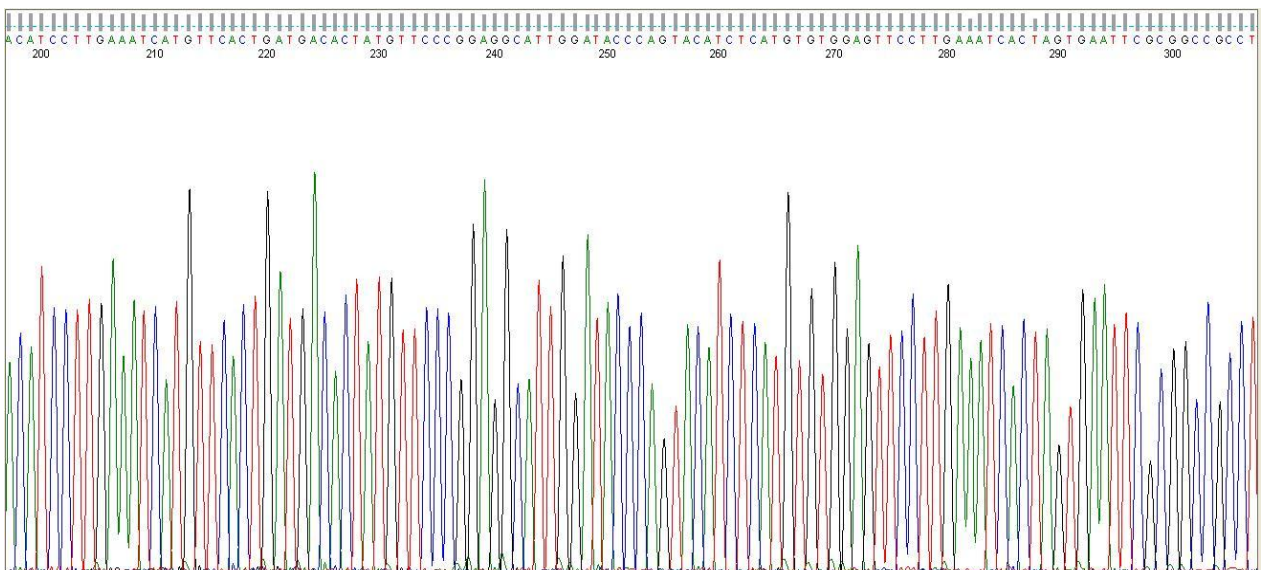


Figura 8. Parte do sequenciamento de uma amostra positiva para DENV-2 utilizando o primer espécie-específico nDEN2, visualizado utilizando o software Finch TV (Geospiza).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A região Amazônica Brasileira possui extensas áreas florestadas, ecossistemas naturais e uma ampla diversidade de animais que provêm um meio ambiente adequado para a proliferação de vetores e a transmissão de doenças relacionadas a eles. Atualmente, 99,8% dos casos de malária estão restritos a região da Amazônia Legal (Ministério da Saúde, 2008), onde aproximadamente 40 arbovírus cocirculam (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998).

No Brasil, 54 espécies de *Anopheles* são conhecidas e 33 destas ocorrem na região Amazônica brasileira (TADEI et al., 1998; TADEI & DUTARY THATCHER, 2000), e neste momento *An. nuneztovari*, *An. darlingi* e *An. albitarsis* são de especial interesse, pois estudos mostraram que estas espécies são infectadas com *Plasmodium* e são coletadas próximo às habitações humanas (TADEI et al., 1998), sendo *An. darlingi* o principal vetor da malária na Amazônia, pois é altamente antropofílico. *An. nuneztovari*, *An. triannulatus* e *An. albitarsis* podem ser considerados como vetores ocasionais desde que eles são encontrados infectados com *Plasmodium* somente em áreas onde *An. darlingi* começou um surto (TADEI & DUTARY THATCHER, 2000). Entretanto, alguns arbovírus identificados na região Amazônica possuem mosquitos *Anopheles* como vetores: o vírus Guaroa, que é o Bunyavírus mais amplamente distribuído na região Amazônica (exceto o vírus Oropouche) associado com casos esporádicos na área rural e foram encontrados em *Anopheles triannulatus* e *Anopheles nuneztovari*; e o vírus Tacaiuma, também um Bunyavírus associado com casos esporádicos em focos enzoóticos da região Amazônica, encontrados em *Anopheles triannulatus* (VASCONCELOS et al., 1998).

O *Ae. aegypti* foi reintroduzido no estado do Pará em 1992, e desde 1995 (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2000) vem causando epidemias de dengue. No entanto, a concomitância de infecções por dengue e malária reportada aqui é meramente acidental,

porque este arbovírus tem como vetor os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (FIGUEIREDO, 2000), que não são considerados vetores da malária. Desse modo, malária e dengue concomitante pode ser mais frequente, analisando-se pelas áreas de risco de contaminação para ambas as doenças, pois o município de Novo Repartimento (Pará) e os outros municípios estudados estão situados nessas áreas onde há o risco de contaminação.

Infecções mistas com muitos agentes etiológicos não são incomuns na malária (SINGHSILARAK et al., 2006). Apesar de dados escassos, infecções duplas por dengue e *Plasmodium* deveriam ser comuns em áreas onde ambas as doenças são co-endêmicas em muitas partes do mundo (WARD, 2006). Na região Amazônica Brasileira, esta situação provavelmente ocorre mais frequentemente que a detectada, considerando que malária é a doença mais prevalente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), e dengue é endêmica para esta região também (PENNA et al., 2009). Neste contexto uma coinfeção por malária e dengue não poderia ser descartada, e o diagnóstico deveria ser realizado concomitantemente para dengue e malária em pacientes febris vivendo ou retornando de áreas onde ambas as doenças são co-endêmicas.

Recentemente, nos casos publicados de coinfeção por malária e dengue, o diagnóstico da infecção por dengue foi feito baseado em IgM positivo para dengue (CHANDER et al., 2009; CHARREL et al., 2005; DERESINSKI, 2006; THANGARATHAM et al., 2006; BHALLA et al., 2006; WARD, 2006; KAUSHIK et al., 2007). Entretanto, mesmo os autores relatando uma especificidade relevante no teste, o mesmo não pode confirmar dengue recente (CARME et al., 2009), pois alguns falsos negativos são observados em infecções secundárias, e IgM detectáveis podem persistirem por mais de 90 dias (GUZMÁN & KOURI, 2004). Além disso, podem apresentar alta taxa de reatividade cruzada, e os anticorpos são melhores detectados em torno do quinto dia do início da doença, fazendo com que esta técnica seja inviável para o diagnóstico rápido. Mais além, IgM varia consideravelmente entre os

pacientes, alguns tendo IgM detectáveis do segundo ao quarto dia depois do começo dos sintomas, enquanto outros não desenvolvem IgM detectáveis até o oitavo dia do começo da doença (DE PAULA & FONSECA, 2004). Para este propósito, a metodologia baseada no diagnóstico molecular usada neste estudo (BRONZONI et al., 2005) é uma ferramenta adequada para detectar infecções por flavivírus, e pode ser aplicada como uma ferramenta rápida de diagnóstico em amostras clínicas quando uma infecção por flavivírus é suspeitada e quando um diagnóstico diferencial é requerido.

Os achados clínicos mais comuns da infecção por dengue são: febre (100%), mialgia (79%), rash (79%), cefaléia (68%), náusea (37%) e diarreia (37%) (SUNG, 2003). Similarmente, os achados clínicos típicos da malária são febre alta seguida por calafrios, sudorese profusa e cefaléia que ocorrem intermitentemente dependendo da espécie de *Plasmódio* infectante. Entretanto, em alguns pacientes sintomas prodromais aparecem alguns dias antes dos paroxismos da doença, como náusea, vômito, astenia, fadiga e anorexia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Em um recente estudo sobre técnicas de diagnóstico e gerenciamento de infecções duplas por malária e dengue, todos os pacientes com infecções mistas tiveram febre prolongada por mais que sete dias, mialgia, manifestações de sangramentos, rash e anemia (ABBASI et al., 2009). Mais além, de acordo com Vasconcelos et al. (1990), a febre contínua causada pela infecção por arbovírus pode mascarar a febre periódica associada aos parasitas da malária.

Apesar de ambas as doenças causarem sintomas similares, e infecções simultâneas com dois agentes etiológicos podem resultar em uma doença com sintomas sobrepostos (BHALLA, 2006), o diagnóstico de dengue e malária baseados em dados puramente clínicos pode se tornar difícil para os médicos (WARD, 2006), e possivelmente, tanto o espectro clínico da doença e/ou o tratamento pode ser afetado (THANGARATHAM et al., 2006). Finalmente, é importante lembrar que infecções duplas por dengue e malária requerem

atenção especial, porque o diagnóstico e tratamento apropriado atrasado podem resultar em complicações fatais (CHARREL et al., 2005; WARD, 2006).

A confirmação da malária por gota espessa é rápida e, provavelmente, o pequeno número de casos de infecções simultâneas diagnosticadas no Brasil é porque, quando confirmada, fecha-se o diagnóstico e normalmente não se procura por algum outro patógeno como o agente causador da doença.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- Foram detectadas co-infecções por dengue sorotipo 2 e *Plasmodium vivax* em pacientes da região Amazônica.

REFERÊNCIAS

ABBASI, A.; BUTT, N.; SHEIKH, Q. H.; BHUTTO, A. R.; MUNIR, S. M. AHMED, S. M. Clinical features, Diagnostic Techniques and Management of Dual Dengue and Malaria Infection. **J Coll Physicians Surg Pak**, Vol. 19, No. 1, p. 25-29, 2009.

AUSUBEL, F. B. R.; KINGSTON, R. E. ; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A. et al. Preparation and analysis of DNA. In: (Ed.). **Short protocols in molecular biology**, John Wiley & Sons, Inc, 1997.

AZEVEDO, R. S. S.; NUNES, M. R. T.; CHIANG, J. O.; BENSABATH, G.; VASCONCELOS, H. B.; PINTO, A. Y. N.; MARTINS, L. C.; MONTEIRO, H. A. O.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. C. Reemergence of Oropouche Fever, Northern Brazil. **Emerg Infect Dis**, Vol. 13, No. 6, June, 2007.

BHALLA, A.; SHARMA, N.; SHARMA, A.; SURI, V. Concurrent infection with dengue and malaria. **Indian J Med Sci**, vol. 60, No. 8, p. 330-331, August, 2006.

BRONZONI, R. V. M.; BLEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; FIGUEIREDO, NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Duplex Reverse Transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **J Clin Microbiol**, Vol. 43, No. 2, p. 696-702, 2005.

BRONZONI, R. V. M.; MORELI, M. L.; CRUZ, A. C. R.; FIGUEIREDO, L. T. M. Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, Vol. 98, No. 8, p. 456-61, 2004.

CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. R. C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev Soc Bras Med Trop**, Vol. 40, No. 2, p. 192-196, 2007.

CARME, B.; MATHEUS, S.; DONUTIL, G.; RAULIN, O.; NACHER, M.; MORVAN, J. Concurrent dengue and malaria in Cayenne hospital, French Guiana. **Emerg Infect Dis**, Vol. 15, No. 4, April, 2009.

CHANDER, J.; SINGLA, N.; SINGH, R. Concurrent Presence of Dengue and *Plasmodium falciparum*. **Tropical Medicine and Health**, Vol. 37, No. 2, p. 69-70, 2009.

CHARREL, R. N., BROUQUI, P., FOUCAULT, C., LAMBALLERIE, X. Concurrent Dengue and Malaria. **Emerg Infect Dis**, vol.11, No.7, July, 2005.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, Vol. 80, No. 23, p.11418-11431, December, 2006.

DA SILVA, A. N. M.; FRAIHA-NETO, H.; SANTOS, C. C. B.; SEGURA, M. N. O.; AMARAL, J. C. O. F.; GORAYEB, I. S.; LACERDA, R. N. L.; SUCUPIRA, I. M. C.; PIMENTEL, L. N.; CONN, J. E.; PÓVOA, M. M. Anophelines in Belém, Pará, Brazil: Current and retrospective data. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, Vol. 22, No. 8, p. 1575-1585, Agosto, 2006.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Braz J Infect Dis**, Vol. 8, No. 6, p. 390-398, 2004.

DERESINSKI, S. Concurrent *Plasmodium vivax* malaria and dengue. **Emerg Infect Dis**, Vol. 12, No.11, November, 2006.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, Vol. 40, No. 2, p. 224-229, Mar-Apr, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flavivirus. **Microbes Infect**, No. 2, 1643-1649, 2000.

GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: (Ed.). **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins, 5th ed., p.1023-1067, 2007.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: (Ed.). **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins, 5th ed., p.1154-1252, 2007.

GUZMÁN, M.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis**, Vol. 8, p. 69-80, 2004.

IVERSSON, L. B.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, M. D. B. Human disease caused by Venezuelan Equine Encephalitis sub-type IF in Ribeira Valley, São Paulo, Brazil. In: **Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol. 39, p. 143. New Orleans: Abstracts, 1990.

KAUSHIK, R. M.; VARMA, A.; KAUSHIK, R.; GAUR, K. J. B. S. Concurrent dengue and malaria due to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 101, p. 1048-1050, 2007.

KOTAIT, I.; ITO, F.; CARRIERI, M. L.; SOUZA, M. C. A. M.; PERES, N. F.; FERRARI, J. J. F.; ARAÚJO, F. A. A.; GONÇALVES, V. L. N. Programa de zoonoses e manejo de equídeos do Estado de São Paulo. *Boletim Epidemiológico Paulista*, Vol. 5, No. 54, p. 18-26, Junho, 2008.

LINDENBACH, B. D.; HEINZ, J. T.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: (Ed.). **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins, 5th ed., p. 1101-1152, 2007.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSON, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature medicine supplement**, Vol. 10, No. 12, December, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária – Brasília, 2009a. Disponível em portal.saude.gov.br/portal/.../pdf/situacao_da_malaria_site_svs_28_12.pdf Malaria no Brasil, acessado em 14 de Fevereiro de 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue: Semanas de 1 a 52 de 2009. **Ministério da Saúde**, 2009b. Disponível em

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf. Acessado em 14 de Fevereiro de 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de situação: Acre / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília, 2005a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de situação: Amapá / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília, 2005b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de situação: Pará / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília, 2005c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de situação: Rondônia / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília, 2005d.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da Malária no Brasil: **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília, 2008.

MONDINI, A.; BRONZONI, R. V. M.; CARDEAL, I. L. S.; SANTOS, T. M. I. L.; LÁZARO, E.; NUNES, S. H. P.; SILVA, G., C., D.; MADRID, M. C. F. S.; RAHAL, P.; FIGUEIREDO, L. T.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F.; NOGUEIRA, M. L. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **J Clin Virol**, Vol. 40, p. 84-86, 2007.

MORELI, M. L.; AQUINO, V. H.; CRUZ, A. C. R. FIGUEIREDO, L. T. M. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-Nested-PCR. **J Med Virol**, Vol. 66, p. 139-142, 2002.

NUNES, M. R. T.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; AZEVEDO, R. S. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. **Emerg Infect Dis**, Vol. 11, No. 10, October, 2005.

NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, H. B.; MEDEIROS, D. B. A.; RODRIGUES, S. G.; AZEVEDO, R. S. S.; CHIANG, J. O.; MARTINS, L. C.; VASCONCELOS, P. F. C. A febre do Oropouche: uma revisão dos aspectos epidemiológicos e moleculares na Amazônia brasileira. **Cad. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, Vol 15, No. 3, p. 303-318, 2007.

OSORIO, J. E.; YUILL, T. M. Venezuelan Equine Encephalitis In: Beran, GW. **Handbook of Zoonoses**. 2 ed, Boca Raton: CRC Press, p.33-46, 1997.

PEARLER, L. N.; MARFIN, A. A.; PETERSEN, L. R.; LANCIOTTI, R. S.; PAGE, P. L.; STRAMER, S. L.; STOBIEFSKI, M. G.; SINGS, K.; NEWMAN, B.; KAPOOR, H.; GOODMAN, J. L.; CHAMBERLAND, M. E. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. **N Engl J Med**, Vol. 349, No. 13, p. 1236-1245, 2005.

PENNA, G.; PINTO, L. F.; SORANZ, D.; GLATT, R. High Incidence of Diseases Endemic to the Amazon Region of Brazil, 2001-2006. **Emerg Infect Dis**, Vol. 15, No. 4, April, 2009.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche fever In: Beran GW, **Handbook of zoonoses**. 2ed. Boca Raton: CRC Press, p. 214-217, 1997.

SAMBROOK, J. R. In vitro amplification of DNA by Polymerase Chain Reaction. In: (Ed.). **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press Vol. 2, p. 8-29, 2001.

SANGER, F., NICKLEN, S., et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Nat Acad Sci**, U S A, Vol.74, No.12, p. 5463-7, 1977.

SCHMALJOHN, C. S.; NICHOL, S. T. *Bunyaviridae*. In: (Ed.). **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins, 5th ed., p. 1741-1789, 2007.

SHOPE R. E.; SATHER, G. E. Arboviruses In: Lennet, FH; Shimidt, NJ. **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**, 2ed., p. 767-814. Washington: American Public Health Association, 1979.

SINGHSILARAK, T., PHONGTANANANT, S., JENJITTIKUL, M., WATT, G., TANGPAKDEE, N., POPAK, N., CHALERMRUT, K., LOOAREESUWAN, S. Possible acute coinfections in Thai malaria patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, Vol. 37, No. 1, p. 1-4, 2006.

STORCH, G. Diagnostic Virology. In: D. M. H. Knipe, Peter M. (Ed.). **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins, Vol. 1, p. 566-604, 2007.

STRAMER, L. S.; FANG, C. T.; FOSTER, G. A., WAGNER A. G.; BRODSKY, J. P., DODD R. Y. West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. **N Engl J Med**, Vol. 335, No. 5, August, 2005.

SUNG, V.; O' BRIEN, D. P.; MATCHETT, E.; BROWN, G.; TORRESI, J. Dengue fever in travellers returning from southeast Asia. **J Travel Med**, Vol. 10, p. 208-213, 2003.

TADEI, W. P.; DUTARY THATCHER, B. Malaria vector in the Brazilian Amazon. *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* (1). **Rev Inst Med Trop S Paulo**, Vol. 42, No. 2, p. 87-94, 2000.

TADEI, W. P.; DUTARY THATCHER, B.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg**, Vol. 59, No. 2, p. 325-335, 1998.

TANGARATHAM, P. S.; JEEVAN, M. K.; RAJENDRAN, R.; SAMUEL, P. P.; TYAGI, B. K. Dual infection by Dengue virus and *Plasmodium vivax* in Alappuzha District, Kerala, India. **Jpn J Infect Dis**, Vol. 59, p. 211-212, 2006.

ROSA, A. P. A. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; PINHEIRO, F. P.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, E. S. T. et al. Arboviroses isolates in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology form man. In: (Ed.). **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Evandro Chagas Institute, p. 19-31, 1998

ROSA, A. P. A. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, E. S. T.; RODRIGUES, S. G.; MONDET, B.; CRUZ, A. C. R.; SOUZA, M. R.; ROSA, J. F. S. T. Dengue epidemic in Belém, Pará, Brazil, 1996-1997. **Emerg infect Dis**, Vol. 6, No. 3, May-June, 2000.

VASCONCELOS, P. F. [Yellow Fever]. **Rev Soc Bras Med Trop**, Vol. 36, No. 2, p. 275-93, Mar-Apr, 2003.

VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, A. P. A. T.; DÉGALLIER, N.; ROSA, J. F. S. T.; PINHEIRO, F. P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, Vol. 44 (2/3), p. 117-124, March-June, 1992.

VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, A. P. A. T.; PINHEIRO, F. P. ROSA, J. F. S. T. Arboviroses. In: Veronesi: **Tratado de Infectologia**, 3ed., p. 289-302. São Paulo: Atheneu, 2005.

VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, A. P. A. T.; ROSA, J. F. S. T.; DÉGALLIER, N. Concomitant infections by Malaria and Arboviruses in the Brazilian Amazon Region. **Rev Latinoam Microbiol**, Vol. 32, p. 291-294, 1990.

VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, J. F. S. T.; ROSA, A. P. A. T.; DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F. P.; SÁ FILHO, G. C. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, Vol. 33, No. 6, p. 465-476, Novembro-Dezembro, 1991.

VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA; A. P. A. T, RODRIGUES, S. G.; ROSA E. S. T.; DÉGALLIER, N.; ROSA, J. F. S. T. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, Vol. 17, p. 155-164, 2001.

VASCONCELOS, P. T. D. R.; PINHEIRO, F. P.; SHOPE, R. E.; ROSA, J. F. S. T.; RODRIGUES, S. G. et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil In: (Ed.). ROSA, A. P. A. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, J. F. S. T. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Evandro Chagas Institute, p. 72-99, 1998.

WARD, D. I. A case of fatal *Plasmodium falciparum* malaria complicated by acute dengue fever in East Timor. **Am J Trop Med Hyg**, Vol. 75, No. 1, p. 182-185, 2006.

ANEXO – Artigo aceito para publicação

São José do Rio Preto, January 19th 2010.

To the Editor

Revista Brasileira de Medicina Tropical

We are submitting the manuscript **Concurrent Dengue and Malaria in the Amazon region**. The authors **Vinícius dos Santos Santana, Lígia Carolina Lavezzo, Adriano Mondini, Ana Carolina Bernardes Terziana, Roberta Vieira de Moraes Bronzoni, Andrea Regina Baptista Rossit, Ricardo Luiz Dantas Machado, Paula Rahal, Mara Correa Lelles Nogueira, Maurício Lacerda Nogueira** confirms that they have contributed to the paper and agree with its submission and subsequent revisions. They have also confirmed that the results presented here are original and are not under consideration for publication elsewhere. They have no relationship of support that might be perceived as a conflict of interest.

Thanks in advance for your attention.

Maurício Lacerda Nogueira, MD, PhD

Laboratorio de Pesquisas em Virologia

FAMERP



English | Português
 Usuário Logado: **mauricionogueira**
[Sair do sistema](#)

[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões](#) > [#RSBMT-232](#) > **Avaliação**

#RSBMT-232 : Concurrent Dengue and Malaria in the Amazon region

RESUMO	AVALIAÇÃO	EDIÇÃO
Submissão		
Autores	Vinícius Santana, Ligia Lavezzo, Adriano Mondini, Ana Carolina Terzian, Roberta Bronzoni, Andrea Rossit, Ricardo Machado, Paula Rahal, Mara Nogueira, Mauricio L Nogueira	
Título	Concurrent Dengue and Malaria in the Amazon region	
Seção	Artigos Originais	
Editor	Dalmo Correia	
Por Pares		
Rodada 1		
Versão da Avaliação	RSBMT-232-24876-123510-2-RV.DOC 2010-01-21	
Iniciado	2010-01-21	
Última alteração	2010-01-27	
Documento transferido	Nenhum	
Decisão Editorial		
Decisão	Enviar novamente para avaliação 2010-01-20	
Notificar Editor	Registro de E-mails Editor/Autor 2010-02-05	
Versão do Editor	RSBMT-232-24876-124335-1-ED.DOC 2010-01-21	
Versão do Autor	RSBMT-232-24876-124320-1-ED.DOC 2010-01-21 EXCLUIR	
Transferir Versão do Autor	<input type="button" value="Arquivo..."/> <input type="button" value="Transferir"/>	

Title: Co-infecção por Dengue e Malária na região Amazônica

Current Title: Concurrent Dengue and Malaria in the Amazon region

Vinícius dos Santos Santana^{1,2}, Lígia Carolina Lavezzo^{1,2}, Adriano Mondini¹, Ana Carolina Bernardes Terziana¹, Roberta Vieira de Moraes Bronzoni¹, Andrea Regina Baptista Rossit⁵, Ricardo Luiz Dantas Machado⁵, Maurício Lacerda Nogueira^{1,2*}

¹Laboratório de Pesquisa em Virologia; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416

² Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

⁵Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro - 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo state, Brazil.

*Corresponding author: Laboratório de Pesquisa em Virologia-Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro - 15090-000, São José do Rio Preto, São Paulo state, Brazil. Telephone number: +55-21-17 3201 5731. Email: mauricio.nogueira@pq.cnpq.br

* This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP, Grant # 08/03828-1 to MLN and Grant # 02/0946-1 to ARBR; CNPq, Grant # 302353/03-8 to RLDM) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). MLN, PR, ARBR and RLDM are supported by a CNPq Fellowship.

Resumo

Introdução: A região Amazônica possui extensas áreas florestadas e ecossistemas naturais, provendo condições favoráveis para a existência de diversos arbovírus. Aproximadamente 200 arbovírus foram isolados no Brasil, e 40 estão associados com doenças em humanos. Quatro destes 40 são considerados ser de importância para a saúde pública no Brasil: vírus da Dengue (1-4), Oropouche, Mayaro e Febre Amarela. Juntamente com estes vírus, aproximadamente 98% dos casos de malária estão restritos à região da Amazônia Legal.

Métodos: O objetivo deste estudo foi investigar a presença de arbovírus em 111 amostras clínicas de sangue de pacientes que residiam em Novo Repartimento (Pará), Plácido de Castro (Acre), Porto Velho (Rondônia) and Amapá (Macapá). O RNA viral foi extraído, RT-PCR foi realizada seguida de uma Multiplex-Nested-PCR, usando primers genéricos e espécie-específicos para Flavivirus, Alphavirus and Orthobunyavirus.

Resultados: Nós detectamos o vírus da Dengue, sorotipo 2, em dois pacientes que residiam em Novo Repartimento (Pará), que também tinham infecção por *Plasmodium vivax*.

Conclusões: Apesar de dados escassos, esta situação, provavelmente, ocorre mais frequência que a detectada na região Amazônica. Definitivamente, é importante lembrar que ambas as doenças possuem achados clínicos similares, assim o diagnóstico deveria ser feito concomitantemente para dengue e malária em pacientes que residem ou estão voltando de áreas onde ambas as doenças são endêmicas.

Palavras-chaves: Arbovírus, Co-infecção, Flavivirus, Dengue, Malária, Região Amazônica.

Abstract

Background: The Amazon region has extensive forested areas and natural ecosystems, providing favorable conditions to the existence of many arboviruses. Over 200 arboviruses were isolated in Brazil, and about 40 are associated with human disease. Four out of 40 are considered to be of public health importance in Brazil: Dengue viruses (1-4), Oropouche, Mayaro and Yellow Fever. Along with these viruses, about 98% of the malaria cases are restricted to the Legal Amazon region.

Methods: The aim of this study was to investigate the presence of arboviruses in 111 clinical serum samples from patients living in Novo Repartimento (Pará), Plácido de Castro (Acre), Porto Velho (Rondônia) and Amapá (Macapá). The viral RNA was extracted, and RT-PCR was performed followed by a Multiplex-Nested-PCR, using Flavivirus, Alphavirus and Orthobunyavirus generic and species-specific primers.

Results: We detected Dengue virus serotype 2 in two patients living in Novo Repartimento (Pará) that had also active *Plasmodium vivax* infection.

Conclusions: Despite scant data, this situation is likely to occur more frequently than detected in the Amazon region. Finally, it is important to remember that both diseases have similar clinical findings, thus the diagnosis should be made concomitantly for dengue and malaria in patients living or returning from areas where both diseases are endemic.

Keywords: Arboviruses, Coinfection, Flavivirus, Dengue, Malaria, Amazon region.

Introduction

Every year thousands cases of malaria are diagnosed and about 98% of them are restricted to the Legal Amazon region¹. However, in the Brazilian Amazon region, approximately 200 arboviruses have been isolated, and about 40 have been associated with human disease. Among these viruses, dengue viruses are the most important flavivirus causing human disease and outbreaks of important public health impact².

Recently, concurrent dengue and malaria was reported in the Amazon region of French Guiana³. Altogether, there are few reports on dengue and malaria co-infection, and all of them were isolated cases^{4,5,6,7,8,9,10}.

In the Brazilian Amazon region, concomitant infection with malaria and arbovirus was reported in 1990. Therefore, the first detection was in 1971. The five other detections were identified in 1974, 1983, 1984 and 1987. These cases of unknown origin fever were previously diagnosed as malaria, and despite treatment the symptoms remained. All agents found were Catu, Guaroa and Tacaiuma viruses, all belonging to the genus Orthobunyavirus, family *Bunyaviridae*¹¹.

The aim of this study was to investigate the presence of arboviruses in clinical samples from patients of the Amazon region.

Methods

Clinical Samples

A total of 111 clinical blood samples that were previously confirmed for malaria were obtained during 2004 in Novo Repartimento (Pará, 40 samples), Plácido de Castro (Acre, 30 samples), Porto Velho (Rondônia, 29 samples), and twelve samples from the municipality of Oiapoque (Amapá/Macapá) obtained in 2009 (Figure 1). The sera were stored at -80°C. Viral RNA was extracted from 140 µl of each serum with the QIAamp Viral RNA Mini kit

(QIAGEN, Inc.) according to the manufacturer's instructions and yielded a 60 µl final volume. This study was approved by the Internal Ethical Review Board.

Study Strategy

Initially, clinical samples were tested for the presence of Flavivirus and Alphavirus as described by Bronzoni and colleagues¹². A Duplex-RT-PCR (D-RT-PCR) was performed using simultaneously Flavivirus and Alphavirus universal primers. After, three Multiplex-Nested-PCR (M-N-PCR) were performed using specie-specific primers to detect and identify Dengue virus (DENV1-3), Yellow Fever virus (YFV) and Encephalitis of Saint Louis virus (SLEV); other to detect DENV-4, Rocio virus (ROCV), Ilhéus virus (ILHV) and West Nile virus (WNV); another to detect Eastern Equine Encephalitis virus (EEEV), Venezuelan Equine Encephalitis virus (VEEV), Western Equine Encephalitis virus (WEEV), Mayaro virus (MAYV) and Aura virus (AURAV). Finally, a RT-PCR with primers that anneal to the 5' and 3' extremities of the genome segments of bunyaviruses and internal primers that anneal to the S segment of Simbu serogroup viruses in a Nested PCR was used to amplify Oropouche virus genome as described by Morelli and colleagues¹³. The amplicons were loaded into a 1% agarose electrophoresis gel and visualized under ultraviolet light. Amplicon sizes were determined by comparison with a 100 bp DNA ladder (Promega). Precautions to avoid contamination were followed, positive and negative controls were used in all reactions.

Results

In total, one hundred and eleven malaria-positive patients that were tested for arboviral detection, 80 had *Plasmodium vivax* and 31 *Plasmodium falciparum* infections. Concurrent dengue virus serotype 2 and malaria were confirmed in 2 of the 111 patients (Figure 2), which were previously diagnosed laboratorially to have malaria before molecular screening for

arboviruses. These patients were a man of 57 and a woman of 20 years old living in Novo Repartimento (Pará), and both had active *Plasmodium vivax* infections.

Virus isolation was attempted but unsuccessful, because it is very difficult to isolate arboviruses and the blood samples have to be collected when the viremia is occurring, which means during the first days of the disease.

Discussion

The Brazilian Amazon region has extensive forested areas, natural ecosystems and a large diversity of animals that provide a suitable environment for arbovirus transmission. Actually, 99.8% percent of malaria cases are restricted to the Legal Amazon region (Ministry of Health, 2008), where approximately 40 arboviruses considered to be of important public health cocirculate¹⁴.

In Brazil, about fifty four species of *Anopheles* mosquitoes are known and about thirty three of them occur in the Brazilian Amazon region^{15, 16}. *An. nuneztovari*, *An. darlingi*, *An. albitarsis* are considered of special interest because are found infected with *Plasmodium* near human habitations¹⁵. Nowadays, *An. darlingi* is the main vector because it is highly anthropophilic. *An. nuneztovari*, *An. triannulatus* and *An. albitarsis* are considered to be secondary vectors because are found infected with *Plasmodium* only in areas that *An. darlingi* started an outbreak¹⁶.

However, some arboviruses isolated in the Amazon region have *Anopheles* sp. mosquitoes as their vectors like: Guaroa virus widely spread and was associated with sporadic cases in the rural area, isolated from *An. triannulatus* and *An. nuneztovari*; and Tacaiuma virus, associated with sporadic cases in enzootic foci, isolated from *An. Triannulatus*¹⁷.

Otherwise, the concomitance of dengue and malaria reported here is merely incidental because this arbovirus has *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes as vectors¹⁸, that

are not considered to be vectors of *Plasmodium* sp. protozoans.

Mixed infections with many etiologic agents are not uncommon in malaria¹⁹. Despite scant data, dengue and malaria dual infection should be common in areas where both diseases are co-endemic in many places of the world¹⁰. In the Amazon region of Brazil, this situation is likely to occur more frequently than detected, considering that malaria is the most prevalent disease¹, and dengue is endemic to this region as well²⁰. In this context a coinfection with malaria and dengue could not be ruled out, and should be suspected in patients living or returning from areas where both diseases are endemic.

The most common dengue clinical findings are fever (100%), myalgia (79%), rash (79%), headache (68%), nausea (37%) and diarrhea (37%)²¹. Similarly, the typical malaria clinical findings are high-grade fever followed by chills, profuse sweating and headache that occur intermittently depending on infecting *Plasmodium* specie. However, in some patients prodromal symptoms appear some days before disease paroxysms as nausea, vomiting, asthenia, fatigue and anorexia¹. In a recent study about diagnostic techniques and management of dual dengue and malaria infection, all patients with dual infection have had prolonged fever for more than seven days, myalgia, bleeding manifestations, rash and anemia²². Moreover, according to Vasconcelos and colleagues in 1990, the continuous fever caused by the arboviral infection can mask the periodic fever associated with the malarial parasites¹¹.

Despite both diseases cause similar symptoms, and simultaneous infections with two different infectious agents may result in overlapped symptoms⁴, diagnosis of malaria and dengue based purely in clinical grounds may become difficult for physicians¹⁰, and possibly, either clinical spectrum of the disease or treatment may also be affected⁹. Finally, it is important to remember that dengue and malaria dual infection requires special attention because delayed diagnosis and appropriated treatment can result in fatal complications^{6,10}.

Probably, the small number of mixed cases diagnosed in Brazil is because thick or thin blood films test is quick, and after it is confirmed to malaria, nobody normally searches for another pathogen as the causative agent of the disease. Therefore, the diagnosis should be made concomitantly for dengue and malaria in patients living or returning from areas where both diseases are endemic.

Acknowledgments.

We thank all individuals enrolled in this study; Aline Barroso, Maria Cristina Figueredo and Mauro Tada for help in malaria field work; Prof. Luiz Hildebrando Pereira da Silva for facilities at CEPEM.

References

1. Sistema de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Ministério da Saúde, 2008.
2. Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(2):224-229.
3. Carne B, Matheus S, Donutil G, Raulin O, Nacher M, Morvan J. Concurrent Dengue and Malaria in Cayenne Hospital, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):668-671.
4. Bhalla A, Sharma N, Sharma A, Suri V. Concurrent infection with Dengue and Malaria. *Indian J Med Sci.* 2006;60(8):330-331.
5. Chander J, Singla N, Singh R. Concurrent Presence of Dengue and *Plasmodium falciparum*. *Tropical Medicine and Health.* 2009;37(2):69-70.
6. Charrel RN, Brouqui P, Foucault C, Lamballerie X. Concurrent Dengue and Malaria. *Emerg Infect Dis.* 2007;11(7):1153-1154.

7. Deresinski S. Concurrent *Plasmodium vivax* Malaria and Dengue. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1802-1803.
8. Kaushik RM, Varma A, Kaushik R, Gaur, KJBS. Concurrent dengue and malaria due to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:1048-1050.
9. Tangaratham PS, Jeevan MK, Rajendran R, Samuel PP, Tyagi BK. Dual Infection by Dengue Virus and *Plasmodium vivax* in Alappuzha District, Kerala, India. *Jpn J Infect Dis.* 2006;59:211-212.
10. Ward DI. A case of fatal *Plasmodium falciparum* malaria complicated by acute dengue fever in East Timor. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(1):182-185.
11. Vasconcelos PFC, Rosa APAT, Rosa JFST, Dégallier N. Concomitant Infections by Malaria and Arboviruses in the Brazilian Amazon Region. *Rev Latinoam Microbiol.* 1990;32:291-294.
12. Bronzoni RVM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. Duplex Reverse Transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):696-702.
13. Morelli ML, Aquino VH, Cruz, ACR, Figueiredo LTM. Diagnosis of Oropouche Virus Infection by RT-Nested-PCR. *J Med Virol.* 2002;66:139-142.
14. Rosa JFST, Rosa APAT, Vasconcelos, PFC, Pinheiro, FP, Rodrigues, SG, Rosa EST et al. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts and their pathology for man. In: Rosa, APAT, Vasconcelos, PFC, Rosa, JFST, editors. An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries. Instituto Evandro Chagas, Belém. 1998;19-31.

15. Tadei WP, Thatcher BD, Santos JMM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(2):325-335.
16. Tadei WP, Thatcher BD. Malaria vectors in the Brazilian Amazon. *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* (1). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42(2):87-94.
17. Vasconcelos PFC, Rosa APAT, Pinheiro FP, Shope RE, Rosa JFST, Rodrigues, SG et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: Rosa APAT; Vasconcelos PFC; Rosa, JFST, editors. *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries.* Instituto Evandro Chagas, Belém. 1998;72-99.
18. Figueiredo LTM. The Brazilian flavivirus. *Microbes Infect.* 2000;2:1643-1649.
19. Singhsilarak T, Phongtananant S, Jenjittikul M, Watt G, Tangpakdee N, Popak N et al. Possible acute coinfections in Thai malaria patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006;37(1):1-4.
20. Penna G, Pinto LF, Soranz D, Glatt R. High Incidence of Diseases Endemic to the Amazon Region of Brazil, 2001-2006. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(4):626-632.
21. Sung V, O'Brien DP, Matchett E, Brown GV, Torresi J. Dengue fever in Travelers Returning from Southeast Asia. *J Travel Med.* 2003;10:208-213.
22. Abbasi A, Butt N, Sheikh QH, Bhutto AR, Munir SM, Ahmed SM. Clinical Features, Diagnostic Techniques and Management of Dual Dengue and Malaria Infection. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2009;19(1):25-29.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)