

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

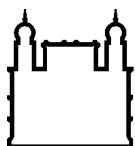
Doutorado em Medicina Tropical

**DENGUE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 1986-2012: BUSCA POR UM  
MARCADOR PRECOCE DE GRAVIDADE**

por

**BIANCA DE SANTIS GONÇALVES**

Rio de Janeiro  
Outubro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Bianca De Santis Gonçalves**

### **DENGUE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 1986-2012: BUSCA POR UM MARCADOR PRECOCE DE GRAVIDADE**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências na área de Virologia.

**Orientadoras:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Maria Bispo de Filippis  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira

**RIO DE JANEIRO**

Outubro de 2017

Gonçalves, Bianca De Santis .

Dengue no estado do Rio de Janeiro, 1986-2012: busca por um marcador precoce de gravidade / Bianca De Santis Gonçalves. - , 2017.  
xxi, 160 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

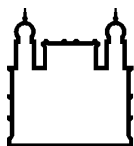
Orientador: Ana Maria Bispo de Filippis.

Co-orientador: Rita Maria Ribeiro Nogueira.

Bibliografia: f. 114-144

1. Dengue grave. 2. Marcador de gravidade. 3. Antigenemia da NS1. 4. Viremia. 5. Sorotipos. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Bianca De Santis Gonçalves**

### **DENGUE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 1986-2012: BUSCA DE UM MARCADOR PRECOCE DE GRAVIDADE**

**ORIENTADORAS:** Prof<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Bispo de Filippis  
Prof<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita Maria Ribeiro Nogueira

**Aprovada em: 16 / 10 / 2017**

**EXAMINADORES:**

**Membros da Banca**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof. Dr. Alex Pauvalid-Corrêa** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof. Dr Eduardo de Mello Volotão** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elzinandes Leal de Azeredo** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

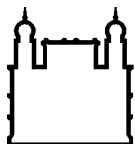
**Prof. Dr. Guilherme Amaral Calvet**(Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fiocruz)

**Membros Suplentes**

**Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Ferreira Barreto** (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 16 de outubro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Bianca De Santis Gonçalves**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bispo de Filippis e Dr<sup>a</sup>. Rita Maria Ribeiro Nogueira. Ao décimo sexto dia do mês de outubro de dois mil e dezessete, realizou-se às treze horas e trinta minutos, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Dinâmica do vírus dengue (DENV) no estado do Rio de Janeiro, 1986-2012: Estudo da gravidade da doença em relação a viremia, antigenemia da NS1, sorotipo e resposta imune”** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de Transmissão de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Alex Pauvalid Corrêa - CDC/FIOCRUZ, Dr. Guilherme Amaral Calvet - INI/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Elzinandes Leal de Azeredo - IOC/FIOCRUZ, Dr. Eduardo de Mello Volotão - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa - IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Debora Ferreira Barreto - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 16 de outubro de 2017.

Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula (Presidente da Banca): *Vanessa Salete de Paula*

Dr. Alex Pauvalid Corrêa (Membro da Banca): *Alex Pauvalid Corrêa*

Dr. Guilherme Amaral Calvet (Membro da Banca): *Guilherme Amaral Calvet*

Dr<sup>a</sup>. Elzinandes Leal de Azeredo (Membro da Banca): *Elzinandes Leal de Azeredo*

Dr. Eduardo de Mello Volotão (Membro da Banca): *Edu. de M. Volotão*

Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa): *Martha Cecilia Suárez Mutis*

Trabalho realizado no Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, com apoio financeiro e operacional da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Com carinho, para Pedro De Santis Lima, Gustavo Lima, Bernardino De Santis (*in memoriam*), Hilda De Santis, Edna De Santis, Lara De Santis, Edson De Santis e Afonso Gonçalves.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de viver, de acordar todas as manhãs e poder construir um dia melhor do que o anterior. Agradeço a Deus pelas pessoas que surgiram em minha vida, e muito mais por aquelas pessoas tão preciosas que ainda permanecem comigo; pela disposição para trabalhar, pela inspiração para escrever, pela perseverança insuflada em mim que tornou possível atravessar um caminho sinuoso até aqui. Agradeço a Ele por todo o bem e todo o mal que a vida me proporcionou, pois fortaleceram meu propósito de segui-Lo.

Agradeço especialmente à Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Bispo de Filippis, por conceder-me a honra em tê-la como orientadora, confiando em meu trabalho, por ter apoiado minha iniciativa de fazer o Doutorado-Sanduiche, ter ajudado muito nesse processo e ter apoiado também minha decisão de não o fazer por motivos pessoais, por tentar ajudar-me no que eu precisasse, por sua amizade e carinho.

Agradeço especialmente à Dr.<sup>a</sup> Rita Maria Ribeiro Nogueira, por conceder-me a honra em tê-la como orientadora, confiando em meu trabalho, por ter ensinado-me tanto com seu exemplo, sobre dengue e sobre a vida, por sempre mostrar-se disponível para tirar dúvidas, com carinho, tranquilidade e atenção.

Ao meu filho, Pedro, agradeço pela alegria diária que preenche meu coração e pelo sentido que sua presença deu à minha existência.

Ao meu amigo, companheiro, parceiro e também marido, Gustavo, por todo apoio, carinho, compreensão e dedicação, por entender minha ausência tantas vezes, por emprestar seu ombro amigo, pela preocupação comigo de tantas formas.

Às minhas meninas: D.Edna, minha mãe, D.Hilda, minha vó, e Lara, minha irmã-filha, por cuidarem com tanto amor e carinho do meu bebê, Pedro, para que eu pudesse concluir o presente trabalho; pela acolhida e incentivo todas as vezes que minha confiança tremulou, pela ajuda de tantas formas. Gratidão.

Ao amigo Dr Victor Fiestas, pela colaboração na classificação dos casos de dengue quanto à gravidade.

Aos amigos Jaqueline Bastos e Allison Fabri, pela amizade, e pelo tempo dedicado a ajudar-me a encontrar e separar as amostras selecionadas para este trabalho.

À Eliane Saraiva por me ensinar a técnica sorológica para pesquisa de IgG e prestar todo o auxílio necessário para a realização dos ensaios.

À Monique Lima pela colaboração nos ensaios sorológicos para a quantificação da NS1.



À amiga Dinair Couto Lima, pela amizade, carinho, pelos momentos de alegria e descontração, e pelo cultivo e quantificação dos quatro sorotipos do DENV para a realização da curva-padrão nas reações de PCR em tempo real.

À Priscila Nunes pela colaboração nas primeiras reações de PCR em tempo real e subsequentes análises.

Ao Prof. Dr Pedro Hernán Cabello pela colaboração com as análises estatísticas.

Ao Prof. Dr Marco Horta pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr Renan Moritz.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosany Bochner.

À minha amiga querida Liliane Conteville, por sua amizade, seu carinho sem fim, por suas palavras doces de encorajamento.

Ao amigo Dr Alex Pauvolid-Corrêa, um agradecimento muito especial, por sempre ter se mostrado disponível para ajudar-me, desde antes do doutorado, principalmente no processo para o Doutorado-Sanduiche no CDC/Fort Collins, EUA, e agora, pelo aceite em participar como membro da banca de avaliação desta tese.

Um agradecimento muito especial à Dr.<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula pelo aceite em ser revisora e também presidente da banca de avaliação desta tese, e por suas grandes contribuições como revisora.

À Dr.<sup>a</sup> Elzinandes Leal de Azeredo, ao Dr Guilherme Amaral Calvet e ao Dr Eduardo de Mello Volotão pelo aceite em participar como membros da banca de avaliação desta tese.

Ao Dr Filipe Aníbal Carvalho Costa e à Dr.<sup>a</sup> Débora Ferreira Barreto pelo aceite em participar como membros suplentes da banca de avaliação desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical por todo o suporte durante o curso.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Dr.<sup>a</sup> Martha Suarez, sempre tão solícita, gentil e atenciosa em me atender.

A todos os amigos do Laboratório de Flavivírus, os que ainda estão no LabFla e os que seguiram seu caminho por outras veredas, por ajudarem, direta ou indiretamente, na realização do presente trabalho, por tornarem as horas de trabalho mais leves e felizes, pelos bate-papos agradáveis, em especial a Mateus Felipe, Carla de Sousa, D.Ana Lúcia Bastos, D.Leda Santos, Sr José Farias, Patrícia Siqueira, Cíntia Damasceno, Aline Santos, Simone Sampaio, Marcos Mendonça, Solange Conceição, Fernanda de Bruycker-Nogueira, Aparecida (*in memoriam*),

Sônia Crescembine, Anielly Ferreira, Raíssa Domingues, Thiara Manuele, Celeste Torres, Clarice Monteiro, Karine Bredis.

Aos funcionários do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, pela convivência amigável, e em especial ao técnico Messias, que sempre forneceu insumos para a realização dos experimentos com boa vontade e alegria.

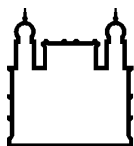
A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Gratidão.

“A medida do amor é amar sem medida. ”

(Santo Agostinho)

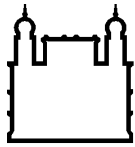
“Senhor, fazei de mim instrumento de Vossa paz.”

(São Francisco de Assis)



## RESUMO

Desde a reintrodução do vírus dengue (DENV) no Brasil em 1981, mais de 12.500.000 casos da doença já foram reportados, representando um grave problema de saúde pública para o país. A infecção por DENV pode ser assintomática ou sintomática, variando de uma forma branda a formas graves, como a febre hemorrágica da dengue e a síndrome do choque da dengue. Em 2009, a OMS estabeleceu um novo critério de classificação de casos que tem por objetivo aprimorar a triagem e o tratamento adequado aos pacientes. De acordo com esses critérios, os pacientes são classificados em dengue com sinais de alerta, dengue sem sinais de alerta e dengue grave. A detecção precoce de dengue grave em pacientes sem sinais de alerta que podem evoluir para a forma hemorrágica grave é muito importante para a escolha de uma terapia de suporte intensivo apropriada, uma vez que vacinas ou terapias específicas com eficácia comprovada não estão disponíveis. Buscando identificar um marcador de gravidade durante a fase aguda (0-5 dias de doença), correlacionamos as variáveis sexo, faixa etária, número de dias de doença, resposta imune, viremia, antigenemia da NS1, sorotipo e linhagem de DENV-2 à apresentação clínica da dengue, nos grupos “dengue sem sinais de alerta” (DSSA) e “dengue com sinais de alerta/dengue grave” (DCSA/DG) de pacientes residentes no estado do Rio de Janeiro. Resposta imune foi classificada por ELISA *in-house*, antigenemia determinada por quantificação da NS1 e viremia quantificada por PCR em tempo real. Do total de pacientes, com DSSA e DCSA/DG, 32,9% (108/328) apresentaram sinais de alerta/dengue grave (DCSA/DG), sendo que 58,3% (63/108) destes pacientes respondiam a uma primo-infecção. Do total de pacientes, com DSSA e DCSA/DG, 61,9% (200/323) foram classificados com infecção primária (perda de 5 amostras de soro). No estudo 1, os sinais de alerta/dengue grave foram mais frequentes em pacientes com 4-5 dias de doença ( $p=0,033$ ). Pacientes de 13-19 anos tiveram chance 75% maior de apresentar DCSA/DG ( $p<0,001$ ). Títulos mais altos de NS1 foram encontrados em homens ( $p=0,019$ ) e infecções primárias ( $p=0,001$ ). Viremia maior foi observada em mulheres ( $p=0,027$ ), pacientes com  $\geq 60$  anos ( $p=0,002$ ), infecções primárias ( $p<0,0001$ ), infecções com 0-1 dia ( $p=0,001$ ). No estudo 2, DENV-3 apresentou maior chance ( $p=0,025$ ) de induzir sinais de alerta/dengue grave. DENV-1 apresentou relação entre gravidade da dengue e antigenemia ( $p=0,030$ ). DENV-3 apresentou níveis mais altos da NS1 ( $p<0,0001$ ), antigenemia maior em infecções primárias ( $p=0,012$ ) e no 4º-5º dia de doença ( $p=0,035$ ); viremia mais alta foi observada nos pacientes com  $\geq 60$  anos ( $p=0,001$ ) e com 0-1 dia de doença ( $p=0,013$ ). DENV-4 apresentou níveis mais altos de viremia ( $p<0,0001$ ) e carga viral maior em infecções com 0-1 dia de doença ( $p<0,0001$ ). No estudo 3, DENV-2 (linhagem I) apresentou viremia maior nas infecções primárias ( $p=0,015$ ). Pacientes infectados pela linhagem II do DENV-2 e com idade  $\leq 12$  anos tiveram maior chance de desenvolver sinais de alerta/dengue grave ( $p=0,028$ ), e viremia mais elevada com 0-1 dia de infecção ( $p=0,002$ ). Diante das características epidemiológicas do estado do Rio de Janeiro, hiperendêmico, e tendo em vista que se tem acumulado um grande número de suscetíveis à infecção pelo DENV-3 ao longo de vários anos, a vigilância tem um papel muito importante para detectar de forma precoce a reemergência desse sorotipo, como já foi demonstrado na reemergência dos DENV-1 e DENV-2.



## ABSTRACT

Since the reintroduction of the dengue virus (DENV) in Brazil in 1981, more than 12,500,000 cases of the disease have been reported, representing a serious public health problem for the country. DENV infection can be asymptomatic or symptomatic, ranging from mild to severe forms, such as dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. In 2009, WHO established a new case classification criteria that aims to improve screening and appropriate treatment for patients. According to these criteria, patients are classified as dengue with warning signs, dengue without warning signs and severe dengue. Early detection of severe dengue in patients with no warning signs that may progress to severe hemorrhagic form is very important for the choice of appropriate intensive supportive therapy, since vaccines or specific therapies with proven efficacy are not available. Aiming to identify a severity marker during the acute phase (0-5 days of disease), we correlated the variables sex, age range, number of days of disease, immune response, viremia, NS1 antigenemia, serotype and DENV-2 lineage to clinical presentation of dengue, in the groups "dengue without warning signs" (DWWS) and "dengue with warning signs/severe dengue" (DWWS/SD) of patients living in the state of Rio de Janeiro. Immune response was classified by in-house ELISA, antigenemia determined by quantification of NS1 and viremia quantified by real-time PCR. Of the total number of patients with DWWS and DWWS/SD, 32.9% (108/328) presented warning signs/severe dengue, and 58.3% (63/108) of these patients responded to a primary infection. Of the total number of patients, with DWWS and DWWS/SD, 61.9% (200/323) were classified with primary infection (loss of 5 serum samples). In study 1, warning signs/severe dengue were more frequent in patients with 4-5 days of disease ( $p=0.033$ ). Patients aged 13-19 years had a 75% higher chance of presenting DWWS/SD ( $p<0.001$ ). Higher NS1 titers were found in males ( $p=0.019$ ) and primary infections ( $p=0.001$ ). Higher viremia was observed in women ( $p=0.027$ ), patients with  $\geq 60$  years ( $p=0.002$ ), primary infections ( $p<0.0001$ ), infections with 0-1 days ( $p=0.001$ ). In study 2, DENV-3 presented a greater chance ( $p=0.025$ ) of inducing warning signs/severe dengue. DENV-1 presented an association between dengue severity and NS1 antigenemia ( $p=0.030$ ). DENV-3 had higher levels of NS1 ( $p<0.0001$ ), higher antigenemia in primary infections ( $p=0.012$ ) and in the 4th-5th day of disease ( $p=0.035$ ); higher viremia was observed in patients  $>60$  years of age ( $p=0.001$ ) and with 0-1 day of disease ( $p=0.013$ ). DENV-4 had higher levels of viremia ( $p<0.0001$ ) and higher viral load in infections with 0-1 day of disease ( $p<0.0001$ ). In study 3, DENV-2 (lineage I) presented major viremia in primary infections ( $p=0.015$ ). Patients infected with DENV-2 lineage II and aged  $\leq 12$  years were more likely to develop warning signs/severe dengue ( $p=0.028$ ), and higher viremia with 0-1 day of infection ( $p=0.002$ ). Given the epidemiological characteristics of the hyperendemic Rio de Janeiro state, and considering that a large number of DENV-3 susceptible individuals have accumulated over several years, surveillance plays a very important role in detecting early the re-emergence of this serotype, as already demonstrated in the reemergence of DENV-1 and DENV-2.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1.1-Distribuição da dengue no mundo, 2010-2016.....	1
Figura 1.2-Genoma do DENV.....	12
Figura 1.3-Ciclo de replicação do DENV no hospedeiro vertebrado.....	17
Figura 1.4-Resposta imune à infecção pelo DENV. ....	20
Figura 1.5-Linha do tempo geral de uma infecção primária por DENV.....	21
Figura 1.6-Critérios da nova classificação clínica de casos de dengue.....	29
Figura 5.1-Fluxo de recebimento das amostras de soro e respectivas fichas epidemiológicas dos pacientes selecionados para este estudo.....	43
Figura 5.2-Número de amostras selecionadas e perdidas ao longo das triagens do estudo.....	45
Figura 7.1-Níveis circulantes de NS1 em pacientes apresentando DSSA e DCSA/DG.....	60
Figura 7.2-Carga viral em pacientes apresentando DSSA e DCSA/DG.....	61
Figura 7.3-Níveis circulantes de NS1 em pacientes do sexo feminino e masculino.....	63
Figura 7.4-Níveis circulantes de NS1 em pacientes com infecção primária e secundária.....	64
Figura 7.5-Níveis circulantes de NS1 em pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4.....	65
Figura 7.6-Carga viral em pacientes do sexo feminino e masculino.....	66
Figura 7.7-Carga viral em pacientes com idade $\leq$ 12 anos, de 13-19 anos, de 20-59 anos ou com idade $\geq$ 60 anos.....	67
Figura 7.8-Carga viral em pacientes com infecção primária ou com infecção secundária.....	68
Figura 7.9-Carga viral em pacientes com 0-1 dia de doença, 2-3 dias de doença ou 4-5 dias de doença.....	69

Figura 7.10-Carga viral em pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4.....	70
Figura 7.11-Níveis circulantes de NS1 em pacientes infectados por DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4.....	80
Figura 7.12-Carga viral em pacientes infectados por DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4.....	81
Figura 7.13-Níveis circulantes de NS1 em pacientes infectados por DENV-3 com infecção primária ou com infecção secundária.....	82
Figura 7.14-Níveis circulantes de NS1 em pacientes infectados por DENV-3 com 0-1 dia de doença, com 2-3 dias de doença ou com 4-5 dias de doença.....	83
Figura 7.15-Carga viral em pacientes com idade $\leq 12$ anos, de 13-19 anos, de 20-59 anos ou com idade $\geq 60$ anos.....	84
Figura 7.16-Carga viral em pacientes infectados por DENV-2 com infecção primária ou com infecção secundária.....	85
Figura 7.17-Carga viral em pacientes infectados por DENV-3 com 0-1 dia de doença, com 2-3 dias de doença ou com 4-5 dias de doença.....	86
Figura 7.18-Carga viral em pacientes infectados por DENV-4 com 0-1 dia de doença, com 2-3 dias de doença ou com 4-5 dias de doença.....	87
Figura 7.19-Carga viral em pacientes infectados por DENV-2 linhagem II com 0-1 dia de doença, com 2-3 dias de doença ou com 4-5 dias de doença.....	94
Quadro A-Ano de coleta das amostras do estudo 1 e respectivo número de pacientes por ano de coleta.....	46
Quadro B-Ano de coleta das amostras do estudo 2 e respectivo número de pacientes por ano de coleta.....	46
Quadro C-Ano de coleta das amostras do estudo 3 e respectivo número de pacientes por ano de coleta.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-Títulos de IgG e número de dias após o início dos sintomas para classificação da resposta imune.....	49
Tabela 7.1-Características dessócio-demográficas dos pacientes e parâmetros clínicos.....	56
Tabela 7.2-Sinais e sintomas observados nos pacientes com dengue.....	57
Tabela 7.3-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV.....	58
Tabela 7.4-Características sócio-demográficas dos pacientes relacionadas aos sorotipos infectantes de DENV e parâmetros clínicos.....	72
Tabela 7.5-Sinais e sintomas observados nos pacientes com dengue em relação aos sorotipos de DENV.....	73
Tabela 7.6-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV-1.....	74
Tabela 7.7-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV-2.....	75
Tabela 7.8-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV-3.....	76
Tabela 7.9-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV-4.....	77
Tabela 7.10-Características sócio-demográficas e parâmetros clínicos dos pacientes relacionadas às linhagens I e II do DENV-2.....	89
Tabela 7.11-Sinais e sintomas observados nos pacientes com dengue, linhagens I e II do DENV-2.....	90



Tabela 7.12-Associações entre os desfechos apresentação clínica e viremia e as variáveis do estudo para DENV-2 linhagem II.....	91
Tabela 7.13-Associações entre o desfecho viremia e as variáveis do estudo para as linhagens I e II do DENV-2.....	92

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ADE** – Antibody Dependent Enhancement

**Ae.** - *Aedes*

**ALT** – alanina aminotransferase

**AST** – aspartato aminotransferase

**°C** – Grau Célsius

**C** – Proteína do capsídeo ou core

**C6/36** – Célula de mosquito *Ae. Albopictus* clone 6 passagem 36

**d.C.** – Depois de Cristo

**DO** – Densidade ótica

**DCSA/DG** – Dengue Com Sinais de Alerta/Dengue Grave

**DENV** - Dengue vírus

**DG** – Dengue grave

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DSSA** – Dengue Sem Sinais de Alerta

**E** - Proteínas do envelope

**ELISA** – Ensaio Imunoenzimático (do inglês: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

**EUA** – Estados Unidos da América

**FA** – Febre Amarela

**FD**- Febre da dengue

**FHD** – Febre hemorrágica da dengue

**FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz

**HI** – Inibição da hemaglutinação

**IC** – Intervalo de confiança

**IFN** – Interferon

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgG-ELISA** - Ensaio imunoenzimático de captura do anticorpo da classe IgG (do Inglês: *IgG antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*)

**IgM** – Imunoglobulina M

**IOC** – Instituto Oswaldo Cruz

**IQR** – Intervalo interquartilico

**kDa** – KiloDalton

**LABFLA** – Laboratório de Flavivírus

**LATHEMA** – Laboratório de Transmissores Hematozoários

**µL** - Microlitro

**M** – Proteína de membrana

**MAb** – anticorpos monoclonais anti-NS1 purificados de camundongo

**MAC-ELISA** - Ensaio imunoenzimático de captura do anticorpo IgM (do Inglês: *IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*)

**min** – minuto

**ml** - Mililitro

**mNS1** – NS1 associada a membrana da célula

**n** – número amostral

**NA** – não se aplica

**ng/ml** – nanograma por mililitro

**nm** - Nanômetros

**nM** – nanomolar

**NS** – Proteínas não estruturais  
**OMS** - Organização Mundial da Saúde  
**OPAS** - Organização Pan-Americana de Saúde  
**OR** – Odds Ratio  
**OR<sub>AJ</sub>** - Odds Ratio ajustada  
**OR (IC)** – Odds Ratio (Intervalo de Confiança)  
**PBS** – Tampão Salina Fosfato  
**PCR** – Reação da cadeia pela polimerase  
**pH** – Potencial de Hidrogênio  
**prM**- Proteína pré-membrana  
**qRT-PCR** - Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real  
**RdRp** - RNA polimerase dependente de RNA  
**RE** - Retículo endoplasmático  
**RJ** - Rio de Janeiro  
**RNA** - Ácido ribonucleico  
**RNA<sub>m</sub>** - RNA mensageiro  
**RT** – Transcrição reversa (do inglês: *Reverse transcriptase*)  
**RT-PCR** – Transcrição reversa seguida da reação pela cadeia da polimerase (do inglês: *Reverse transcription polymerase chain reaction*)  
**SCD** – Síndrome do choque por dengue  
**SNC** – Sistema nervoso central  
**sNS1** – NS1 sob a forma extracelular secretada (não-*virion*)  
**TLRs** – receptores do tipo Toll  
**UTR** - Região não traduzida (do Inglês: *Untranslated regions*)  
**U.V.** – Luz ultravioleta  
**VERO** – Célula de rim de macaco verde Africano  
**X<sup>2</sup>**- Qui-quadrado

# SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 – Histórico.....	3
1.2 – Epidemiologia da dengue .....	4
1.2.1 – Dengue no mundo .....	4
1.2.2 – Dengue no continente Americano.....	5
1.2.3 – Dengue no Brasil.....	7
1.3 – Epidemiologia molecular do DENV no Brasil .....	9
1.4 – Agente etiológico: DENV .....	11
1.4.1 – Estrutura do DENV .....	11
1.4.2 – Proteínas do DENV .....	12
1.5 – Ciclo de replicação do DENV no hospedeiro vertebrado .....	15
1.6 – Vetores e ciclo de transmissão do DENV .....	17
1.7 – Resposta imune .....	19
1.8 – Manifestações clínicas da infecção pelo DENV .....	21
1.9 – Patogenia da dengue.....	23
1.9.1 – Biomarcadores de gravidade da dengue.....	25
1.10 – Classificação dos casos de dengue.....	28
1.11 – Diagnóstico laboratorial .....	29
1.11.1 – Diagnóstico molecular.....	31
1.11.2 – Diagnóstico sorológico .....	32
1.11.2.a – Ensaio imunoenzimático para captura da imunoglobulina G (IgG).....	32
1.11.2.b – Ensaio imunoenzimático para pesquisa do antígeno NS1.....	33
1.11.2.c – Ensaio imunoenzimático para quantificação do antígeno NS1.....	34
1.12 – Prevenção e controle .....	35
1.12.1 – Vacinas em desenvolvimento contra o DENV.....	36
1.12.2 – Controle vetorial.....	37
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	40
3.1 – OBJETIVO GERAL .....	40
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>4 – CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	41
<b>5 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
5.1 – DESENHO DO ESTUDO.....	42
5.2 – AMOSTRAGEM .....	43
5.2.1 – Origem das amostras dos pacientes e das fichas epidemiológicas .....	43
5.2.2 – Estratificação da idade dos pacientes por faixa etária .....	48

5.2.3 – Estratificação do número de dias de doença .....	48
5.2.4 – Nova classificação dos casos de dengue quanto à gravidade .....	48
<b>5.3 – SOROLOGIA</b> .....	49
5.3.1 – Teste imunoenzimático para pesquisa de IgG.....	49
5.3.2 – Pesquisa do antígeno NS1 .....	50
5.3.2.1 – Dissociação do imunocomplexo antígeno NS1- anticorpo (Ag-Ac).....	50
5.3.2.2 – Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA.....	50
5.3.3 – Antigenemia da NS1.....	51
5.4 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR) .....	52
<b>6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	54
<b>7 – RESULTADOS</b> .....	55
7.1 – ESTUDO 1 .....	55
7.1.1 – Apresentação clínica do Estudo 1 .....	59
7.1.2 – Antigenemia da NS1.....	62
7.1.3 – Viremia.....	65
7.2 – ESTUDO 2 .....	71
7.2.1 – Apresentação clínica do estudo 2.....	78
7.2.2 – Antigenemia da NS1.....	81
7.2.3 – Viremia.....	83
7.3 – ESTUDO 3 .....	88
7.3.1 – Apresentação clínica do estudo 3.....	93
7.3.2 – Viremia.....	93
<b>8 – DISCUSSÃO</b> .....	95
<b>9 – CONCLUSÕES</b> .....	111
<b>10 – PERSPECTIVAS</b> .....	113
<b>11 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	114
<b>12 – ANEXOS</b> .....	145

## 1 – INTRODUÇÃO

A dengue é uma arbovirose aguda e sistêmica que se estabeleceu globalmente na transmissão de ciclos endêmicos e epidêmicos. A doença aumentou trinta vezes nos últimos cinquenta anos (PAHO/WHO, 2014), atingindo progressivamente o status de pandemia global (Gubler, 2002). Anualmente, estima-se que ocorram de 50 a 528 milhões de infecções (Bhatt et al., 2013) em mais de 110 países (Ranjit & Kissoon, 2011) onde a dengue é endêmica, representando metade da população mundial em área de risco (PAHO/WHO, 2014) (Figura 1.1).

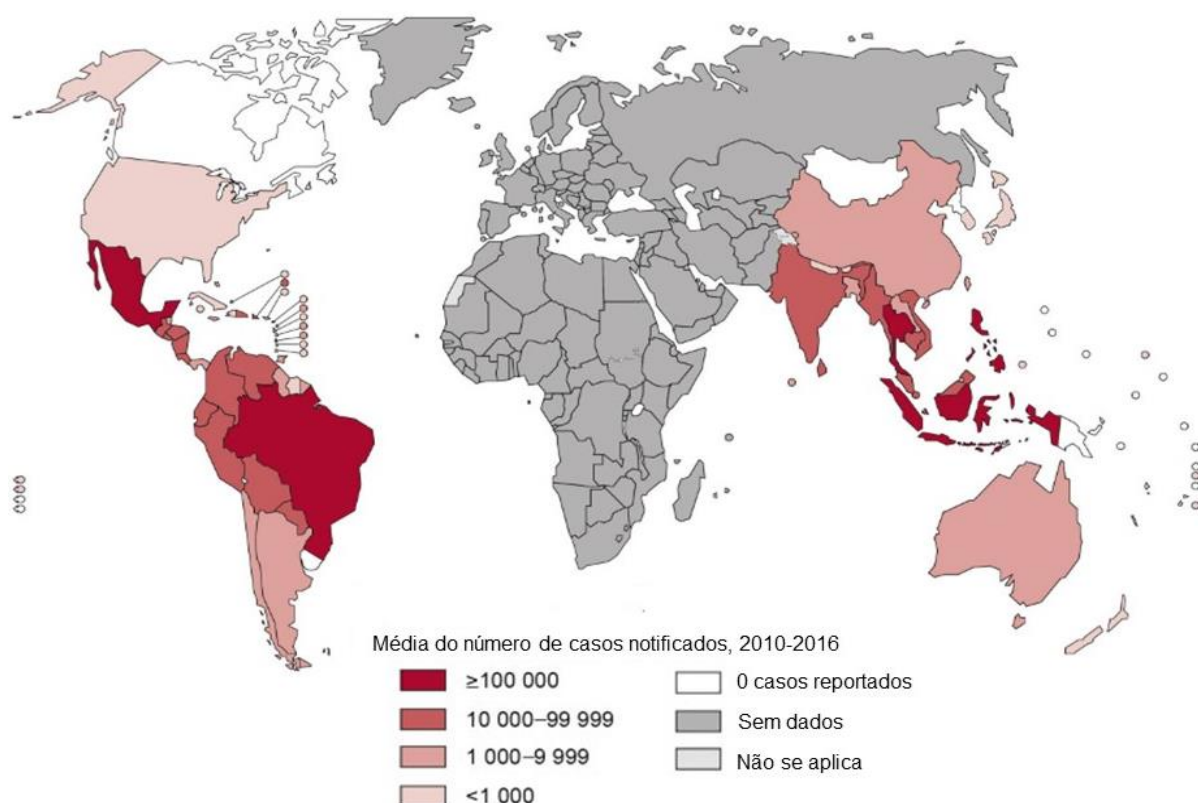


Figura 1.1-Distribuição da dengue no mundo, 2010-2016. Adaptado de WHO (2017).

O vírus dengue (Dengue virus - DENV) apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos, porém geneticamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) dentro do complexo antigênico dengue (Calisher et al., 1989). O DENV pertence ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) (Gubler, 1988) e é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, envolto por um nucleocapsídeo de geometria icosaédrica (Hammon et al., 1960).

A infecção por um sorotipo de DENV confere imunidade persistente específica ao sorotipo homólogo e imunidade passageira (em torno de 3 meses) aos demais sorotipos heterólogos (Halstead, 2007; Simmons et al., 2012).

A maioria das infecções por DENV é assintomática (subclínica) ou resulta na febre clássica da dengue (dengue sem sinais de alerta): febre leve e sintomas parecidos com resfriado (PAHO/WHO, 2014). Entretanto, aproximadamente 0,5% das infecções resultam em manifestações graves da doença, que podem ser fatais em 5% dos casos (Vasilakis et al., 2011).

Epidemias de dengue grave trazem um impacto na economia da mesma magnitude da malária e de outras doenças infecciosas importantes (Gubler, 2006). A literatura aponta, como principais fatores associados a formas graves da dengue: a cepa infectante, a idade, a carga genética do paciente, o sexo e o estado nutricional do indivíduo (Bravo et al., 1987; Kouri et al., 1987; Thisyakorn & Nimmannitya, 1993; Watts et al., 1999; Vaughn et al., 2000; Garcia-Rivera & Rigau-Perez, 2003; Wang et al., 2003; Kalayanaroj & Nimmannitya, 2005; Nguyen et al., 2008; Chen et al., 2009; de Araújo et al., 2009; Perez et al., 2010; Anders et al., 2011). Alguns autores associam a forma grave da dengue a infecções secundárias por sorotipos heterólogos (Kliks et al., 1988; Halstead, 1988; Kliks et al., 1989; Halstead, 2007; Dejnirattisai et al., 2010).

No Brasil, o vetor do DENV é o mosquito *Aedes aegypti* (Brasil, 2009). O controle vetorial vem sendo alvo dos esforços para conter a transmissão do DENV, empregando combinações de agentes químicos e biológicos para combater os mosquitos do gênero *Aedes*, incluindo seus criadouros (PAHO/WHO, 2014). Contudo, os esforços de controle vetorial não têm se mostrado suficientes para reduzir a incidência crescente de epidemias da dengue, e muito menos a expansão da distribuição geográfica da transmissão endêmica do DENV (Gubler, 1998).

Além da transmissão pelo vetor, em casos raros, DENV pode ser transmitido através de transplantes de órgãos ou por transfusão sanguínea a partir de doadores infectados (Weerakkody et al., 2014).

Até o momento, não foram desenvolvidos agentes antivirais efetivos para tratar a infecção, e o que temos ainda é o tratamento de suporte (PAHO/WHO, 2014). Recentemente, a vacina Dengvaxia<sup>®</sup> foi licenciada no Brasil, assim como nas Filipinas, México e em El Salvador (Sanofi Pasteur Media Release, 2016). A vacina foi autorizada pela ANVISA, e está sendo oferecida em clínicas particulares, em três doses, com intervalo de seis meses entre cada dose. Ainda assim, o desenvolvimento de estudos em busca de uma vacina eficiente contra os quatro sorotipos do DENV continua e os avanços são notáveis. Várias vacinas candidatas estão em diferentes fases de ensaios e a Organização Mundial da Saúde (OMS) oferece assessoria técnica e orientação para países e parceiros particulares objetivando apoiar a pesquisa em vacinas e sua avaliação (PAHO/WHO, 2014).

## 1.1 – Histórico

A dengue é uma doença antiga. A origem mais provável da palavra “dengue” deriva da língua Swahili (ou Kiswahili, que é uma linguagem Bantu falada tanto como primeira língua ou como uma segunda língua fluente na costa leste africana) (Christie, 1872 *apud* Gubler, 2014; Encyclopaedia Britannica, 2015).

Alguns estudos envolvendo sequenciamento do DENV e outros flavivírus sugerem a origem africana para um flavivírus ancestral (Gubler, 2014). Não é sabido se a divergência dos quatro sorotipos de DENV ocorreu na África, Ásia ou em ambas as áreas, mas o fato de DENV ser predominantemente um vírus do Velho Mundo sugere que esse grupo divergiu e evoluiu à sua forma presente na Ásia (Gubler, 2014). A origem asiática dos sorotipos do DENV é suportada tanto por evidências ecológicas quanto filogenéticas (Gubler, 2006; Vasilakis & Weaver, 2008). Parece que os quatro sorotipos do DENV passaram a infectar seres humanos a partir da evolução de um ciclo selvagem para adaptação a aldeias e cidades depois que assentamentos urbanos se difundiram (Gubler, 2014). A literatura sugere que os sorotipos do DENV provavelmente evoluíram como vírus de mosquitos antes de adaptarem-se a primatas inferiores. A adaptação a humanos teria ocorrido há, aproximadamente, 1500 a 2000 anos (Holmes & Twiddy, 2003; Weaver & Barrett, 2004). Biologicamente, o DENV é adaptado aos seus hospedeiros vetores, mantendo-se por transmissão vertical em espécies de mosquitos responsáveis por ciclos silvestres com amplificação periódica em primatas inferiores (Gubler, 2014).

O primeiro registro de uma doença clinicamente compatível consta em uma enciclopédia médica chinesa, publicada pela primeira vez durante a Dinastia Chin (265 a 420 d.C.) e formalmente editada em 610 d.C. durante a Dinastia Tang, e novamente em 992 d.C. durante a Dinastia Sung do Norte (Nobuchi, 1979 *apud* Gubler, 1998). Os chineses apelidaram a doença de veneno da água, e acreditavam que ela estaria associada de alguma forma a insetos alados e água.

Com a expansão da indústria através das navegações nos séculos XVIII e XIX, cidades portuárias cresceram e tornaram-se mais urbanizadas, estabelecendo condições ideais para a proliferação do principal mosquito vetor, *Ae. aegypti*. Consequentemente, epidemias de dengue foram comuns nesse período, atingindo o continente americano, a Ásia, a Austrália (desde 1800) e o Pacífico. Tanto os mosquitos quanto os vírus foram disseminados para novas áreas geográficas causando grandes epidemias quase simultâneas (Rush, 1789 *apud* Dick et al., 2012; Hirsch, 1883 *apud* Gubler, 1998; Pepper, 1941 *apud* Gubler, 1998; Howe, 1977 *apud* Gubler, 1998).



Com o fim da II Guerra Mundial, que favoreceu a circulação de vários sorotipos em uma mesma área geográfica, a rápida urbanização no sudeste asiático conduziu ao aumento da transmissão e à hiperendemicidade (Gubler, 2014). Passaram a ocorrer surtos da forma grave da dengue, até então desconhecida. A primeira grande epidemia da forma grave da dengue ocorreu em 1953 nas Filipinas (sudeste asiático) como um resultado direto da mudança ecológica na região. No entanto, não atribuíram a epidemia à dengue, confundindo-a com febre amarela e outras arboviroses (Martinez-Torres, 1990). A forma grave da dengue só foi associada à doença cinco anos depois, em 1958, durante a epidemia de Bangcoc (Tailândia) (Martinez-Torres, 1990), e nos anos seguintes, surtos de dengue grave acometeram inúmeros países (Gubler, 1997).

Nos últimos 25 anos do século XX, deu-se a expansão geográfica de magnitude global e dramática de dengue grave, facilitada pela urbanização desordenada em países tropicais em desenvolvimento. Entre outros fatores estão a falta de controle efetivo do mosquito e a globalização (Gubler, 2006). Contudo, como os meios de transporte não eram tão rápidos no século XIX e nas primeiras décadas do século seguinte, parece que durante anos apenas um sorotipo persistia circulando em dada região, o que acarretava surtos epidêmicos de tempos em tempos, dadas as alterações na população de suscetíveis (Gubler, 2006).

O DENV foi isolado pela primeira vez somente em 1943, durante a II Guerra Mundial, sendo designado sorotipo 1 (DENV-1), por Hotta e Kimura (Hotta & Kimura, 1952). No ano seguinte, 1944, Sabin e Schlesinger isolaram vírus de soldados americanos lotados na Índia, Nova Guiné e Havaí e, conseguiram demonstrar que algumas cepas virais das três localidades eram antigenicamente semelhantes, sendo o vírus do Havaí considerado cepa protótipo (DENV-1 Havaí) (Gubler, 2014). Vários isolados de outra cepa viral antigenicamente distinta da Nova Guiné foram batizados “DENV-2”(Gubler, 2014). Em 1956, DENV-3 e DENV-4 foram isolados de pacientes com dengue grave com sintomas hemorrágicos durante uma epidemia em Manila, nas Filipinas (Hammon et al., 1960).

## **1.2 – Epidemiologia da dengue**

### **1.2.1 – Dengue no mundo**

A dengue é uma doença difundida pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com variações locais de risco influenciadas pela precipitação, temperatura e urbanização rápida não planejada (WHO, 2017). Antes de 1970, apenas nove países relatavam epidemias de dengue grave. Atualmente, a dengue é endêmica em mais de 100 países, distribuídos pelas regiões das Américas, Sudeste da Ásia, Pacífico Ocidental, Mediterrâneo Oriental e África, sendo as três primeiras áreas as mais seriamente afetadas (WHO, 2017). O número real de casos de dengue

no mundo está subnotificado e muitos casos são classificados equivocadamente (WHO, 2017). Bhatt e colaboradores (2013) estimam que 390 milhões de infecções ocorram anualmente, dos quais 96 milhões são formas sintomáticas.

A dengue grave foi reconhecida pela primeira vez na década de 1950 durante epidemias de dengue nas Filipinas e na Tailândia. Hoje, a forma grave da dengue afeta a maioria dos países asiáticos e latino-americanos, tornando-se uma das principais causas de hospitalização e morte entre crianças e adultos nessas regiões (WHO, 2017).

Em 2016, o mundo vivenciou grandes surtos de dengue. A região das Américas notificou mais de 2,38 milhões de casos e 1032 óbitos em 2016. E o Brasil foi responsável por quase 1,5 milhão de notificações, aproximadamente 3 vezes mais que em 2014. A Região do Pacífico Ocidental notificou mais de 375 mil casos suspeitos no mesmo ano, dos quais 176.411 foram registrados pelas Filipinas e 100.028 pela Malásia. Estima-se que, anualmente, 500 mil pessoas necessitem de hospitalização pela forma grave da dengue, e destas, 2,5% evoluem para o óbito (WHO, 2017).

### **1.2.2 – Dengue no continente Americano**

Doenças que apresentam características epidemiológicas e sinais clínicos semelhantes às características encontradas na dengue têm sido descritas nas Américas por mais de 200 anos.

No continente americano, a primeira epidemia de uma doença semelhante à dengue foi registrada em 1635 na Martinica e em Guadalupe, e em 1699 no Panamá, sem, contudo, haver confirmação clínico-laboratorial de que de fato o agente etiológico foi o DENV (McSherry, 1982; Gubler, 1997; Schneider & Droll, 2001; Halstead, 2008).

Até a década de 1960, a maioria dos surtos de dengue ocorria em intervalos de uma ou mais décadas e, desde então, esse intervalo tem diminuído (PAHO, 1994). Em 1953-1954, em Trinidad, o sorotipo 2 foi isolado, sem, contudo, haver epidemia (PAHO, 1994). A primeira epidemia documentada laboratorialmente de dengue nas Américas envolveu o sorotipo 3, afetando o Caribe e a Venezuela em 1963-1964 (PAHO, 1994). Em 1968-1969, várias ilhas do Caribe foram afetadas por uma epidemia na região, em que os sorotipos 2 e 3 foram isolados. Entre o início e meados da década de 1970, os sorotipos 2 e 3 estiveram associados a surtos extensivos na Colômbia, além de terem se tornado endêmicos na região caribenha (PAHO, 1994). Em 1977, o sorotipo 1 foi introduzido nas Américas e, após ter sido identificado na Jamaica, difundiu-se para a maioria das ilhas caribenhas causando surtos explosivos (PAHO, 1994). Surtos similares foram observados na região norte da América do Sul (Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa), na América Central (Belize, Honduras, El Salvador, Guatemala) e no México. Além disso, no estado do Texas, nos Estados Unidos, houve

o registro de transmissão autóctone de DENV-1 durante a segunda metade da década de 1980 (PAHO, 1994). Em torno de 702 mil casos de dengue foram notificados pelos países acometidos entre 1977 e 1980, sendo DENV-1 o principal sorotipo com circulação no continente americano (PAHO, 1994). Contudo, sugere-se que tenha ocorrido número maior de casos, uma vez que apenas em Cuba, que apresentava à época em torno de 10 milhões de habitantes, 42% desta população foi infectada por DENV-1 (PAHO, 1994).

Durante a década de 1980, a dengue difundiu-se amplamente na região, agravando consideravelmente o problema da dengue no continente americano (PAHO, 1994). Em 1982, ocorreu uma epidemia causada pelos sorotipos 1 e 4 na região norte do Brasil (Osanaí et al., 1983), enquanto em 1986, um grande surto de DENV-1 surpreendeu o estado do Rio de Janeiro e, subsequentemente, DENV disseminou-se para vários outros estados brasileiros (Schatzmayr et al., 1986; PAHO, 1994). Além disso, países sem registros anteriores de transmissão do DENV, ou onde a dengue não foi observada por várias décadas, sofreram epidemias extensivas causadas por DENV-1, como Bolívia (1987), Paraguai (1988), Equador (1988) e Peru (1990), onde DENV-4 também foi isolado (PAHO, 1994). Estudos sorológicos sugerem que milhões de indivíduos foram infectados durante os surtos, embora apenas 240 mil casos tenham sido notificados pelos cinco países entre 1986 e 1990, período em que número de casos de dengue grave aumentou significativamente (PAHO, 1994).

Até hoje, a epidemia de dengue grave, causada por DENV-2, ocorrida em Cuba em 1981 é, marcadamente, o mais importante evento na história da epidemiologia da dengue no continente americano; foram notificados mais de 344 mil casos de dengue e 158 óbitos, sendo 101 óbitos de crianças (Kouri et al., 1986; Gubler, 2006). Diante do quadro alarmante, o governo cubano implementou um programa de controle do vetor, o mosquito *Ae. aegypti*, que conseguiu eliminar a dengue e quase erradicou o vetor. Antes da epidemia em Cuba, casos suspeitos de dengue grave eram esporádicos no continente americano. Entretanto, a partir de 1981 até 1991, excetuando-se o ano de 1983, casos confirmados de dengue grave foram notificados anualmente (PAHO, 1994).

O segundo surto de dengue grave, com o isolamento dos sorotipos 1, 2 e 4, ocorreu na Venezuela, em outubro de 1989, atingindo o pico em janeiro de 1990, decrescendo em seguida e, aparentemente terminando em abril, embora casos de dengue grave tenham continuado a ocorrer ao longo do ano de 1990 (PAHO, 1994). Em torno de dois-terços dos 5990 casos e óbitos notificados acometeram crianças abaixo de 14 anos (PAHO, 1994).

Além de Cuba e Venezuela, outros países também notificaram casos de dengue grave: Brasil, Aruba, Colômbia, República Dominicana, El Salvador, Honduras, México, Nicarágua, Porto Rico, Santa Lúcia, Suriname e Ilhas Virgens (PAHO, 1994).

Atualmente, até a 41ª semana epidemiológica (27 de outubro de 2017), as áreas mais afetadas foram: 1) a região Andina, com 132 óbitos, 571 casos de dengue grave e o total de 120.792 casos de dengue e dengue grave; 2) o Cone Sul, com 88 óbitos, 184 casos de dengue grave e o total de 221.016 casos de dengue e dengue grave; 3) a região das Américas do Norte, Central e México, com 32 óbitos, 408 casos de dengue grave e o total de 136.984 casos de dengue e dengue grave; e o Caribe Latino, com um óbito, 65 casos de dengue grave e o total de 1.315 casos de dengue e dengue grave. Em seguida, o Caribe Hispânico registrou 3.101 casos de dengue, sem registro de casos de dengue grave ou de óbito (PAHO/WHO, 2017).

### 1.2.3 – Dengue no Brasil

Surtos de dengue no Brasil são registrados desde o século XIX. Em 1846, o Rio de Janeiro notificou uma epidemia de uma doença denominada *polka* (a mialgia e artralgia que acometiam os pacientes provocava espasmos, característicos da dança polca) (Mariano, 1916 *apud* Figueiredo, 2003). Além desse episódio, surtos de dengue provavelmente ocorreram no Rio de Janeiro em outros momentos durante o século XIX (Rego, 1872 *apud* Figueiredo, 2003), assim como no Nordeste e no Sul do Brasil (1896 em Curitiba) (Reis, 1896 *apud* Figueiredo, 2003). Além disso, no começo do século XX, foram notificadas epidemias no Rio Grande do Sul em 1917 (Mariano, 1916 *apud* Figueiredo, 2003) e no Rio de Janeiro em 1922-1923 (Pedro, 1923 *apud* Figueiredo, 2003). No final do século XX, com a disseminação de epidemias de dengue na América Central e no Caribe, um surto de DENV-1 e DENV-4 (isolados de pacientes e do vetor, *Ae. aegypti*) foi registrado em Boa Vista (Roraima) e na região amazônica. Entre julho de 1981 e agosto de 1982, a epidemia de dengue acometeu em torno de 11 mil pacientes, que apresentavam uma febre viral não-específica e benigna (Osanaí et al., 1983). O Brasil enfrentou inúmeras epidemias de dengue desde então, com a disseminação do vetor e do vírus por todo o país, especialmente nas áreas mais populosas.

Desde a introdução do DENV no Brasil em 1981, mais de 12.560.000 casos de dengue foram notificados (Osanaí et al., 1983; Schatzmayr et al., 1986; Nogueira et al., 1988; SVS/MS, 2017). A primeira epidemia de dengue no sudeste do Brasil teve início em Nova Iguaçu (Rio de Janeiro) em março de 1986, e foi causada pelo sorotipo 1. Foi uma epidemia explosiva em que DENV-1 foi isolado de pacientes que apresentavam doença exantemática caracterizada como dengue clássico. A partir de Nova Iguaçu, a epidemia se disseminou para o restante da região metropolitana do Rio de Janeiro (Schatzmayr et al., 1986). A partir de 1986, as infecções por DENV tornaram-se um problema de saúde pública nacional. Até 1987, estima-se que em torno de 3 milhões de indivíduos foram infectados e 95 mil casos de dengue foram notificados.

A maioria apresentava uma doença febril indiferenciada ou a clássica febre da dengue, caracterizada por cefaleia, dor retrobulbar, mialgia, eritemas e prurido, sendo raras as manifestações hemorrágicas (Marzochi et al., 1987; Figueiredo et al., 1990). A epidemia também atingiu Alagoas em 1986 e o Ceará, entre 1986 e 1993, acometendo, aproximadamente, 50 mil indivíduos neste último (Vasconcelos et al., 1995; FUNASA, 2002). Em 1987, a epidemia foi reportada no centro-oeste. A partir de 1990, DENV-1 foi identificado em todas as regiões do Brasil.

Em abril de 1990, o DENV-2 foi isolado pela primeira vez no Brasil, no município de Niterói, dando início a uma epidemia no estado do Rio de Janeiro (Nogueira et al., 1990). De agosto de 1990 a abril de 1991, durante a onda epidêmica provocada pela grande circulação do DENV-2, a dengue apresentou-se de forma mais grave que na epidemia do DENV-1, haja vista o maior número de hospitalizações e os pacientes com contagem baixa de plaquetas ( $\leq 10^5/\text{mm}^3$ ). A diferença na taxa de manifestações hemorrágicas entre as duas epidemias não foi significativa, e a classificação dos casos em ambas foi dengue clássico para o Ministério da Saúde (Nogueira et al., 1993). Foram 17 mil notificações, aproximadamente 340 casos de dengue grave com manifestações hemorrágicas e número incerto de óbitos (Cunha & Netto, 1991). Deu-se então, subsequente disseminação do vírus para outras regiões do país com maior número de casos graves de dengue e os primeiros casos fatais devido à infecção secundária (Nogueira et al., 1999).

DENV-1 e DENV-2 co-circularam desde então (Nogueira et al., 1991; Zagne et al., 1994). DENV-2 também atingiu a região amazônica, assim como o Nordeste, em 1994, além do isolamento de DENV-1 durante a mesma epidemia, com a notificação de 27 mil casos de dengue, 26 casos de dengue grave e 14 óbitos em 3 meses só no estado do Ceará (Vasconcelos et al., 1993; Vasconcelos et al., 1995). Assim como aconteceu com DENV-1, as epidemias de DENV-2 foram notificadas em praticamente todas as regiões do país, em muitos casos associadas ao DENV-1, com ao menos um caso de co-infecção por ambos os sorotipos (Rocco et al., 1998; FUNASA, 2002).

Em 1999, DENV-3 foi isolado pela primeira vez no Brasil, de um paciente retornando de viagem à Nicarágua, o que sugere que o DENV-3 circulou na América Central e na América do Sul antes de atingir o Brasil (comunicação pessoal Rocco IM, Instituto Adolfo Lutz, 1999 *apud* Figueiredo, 2003). Ausente das Américas por quase 15 anos, DENV-3 foi introduzido no Brasil também pelo estado do Rio de Janeiro em 2000, dando início a uma epidemia em janeiro de 2001, com dispersão para o norte, nordeste e sudeste do país, atingindo seu ápice em 2002 (FUNASA, 2002). No verão de 2001-2002, o DENV-3 causou uma das maiores epidemias até então descritas no território nacional (Nogueira et al., 2001; De Simone et al., 2004; Nogueira

et al., 2005). O sorotipo 3 manteve-se prevalente na maioria dos estados brasileiros de 2002 a 2006, sendo substituído pelo DENV-2 em 2007-2008 (dos Santos et al., 2013). DENV-2 causou uma epidemia grave em todo o Brasil no ano de 2008, sendo o estado do Rio de Janeiro particularmente afetado, registrando 31,7% dos casos de dengue (255.818/806.036) (dos Santos et al., 2013). No ano seguinte, 2009, DENV-1 reemergiu na região sudeste, substituindo DENV-2 e DENV-3 (dos Santos et al., 2013).

Em 2010, após 28 anos sem ser notificado no país, DENV-4 reemergiu no Brasil, inicialmente em Roraima, atingindo em seguida Amazonas, Pará, Piauí, Pernambuco, Bahia, Ceará e, após 8 meses de sua reemergência, chegou ao Rio de Janeiro (Nogueira & Eppinghaus, 2011). Contudo, DENV-1 foi o sorotipo mais prevalente, causando epidemias com mais de 2 milhões de notificações em 2010 e 2011 (SVS/MS, 2017).

De 2011 até 2017 (até a 33ª semana epidemiológica, dia 19/08/17), o Brasil notificou mais de 6.799.432 casos de dengue, sendo os anos de 2013 (1.452.489 casos), 2015 (1.688.688 casos) e 2016 (1.500.535 casos) os mais representativos quanto ao número de registros de casos. O ano de 2017 mostra uma redução no número de notificações de dengue grave e óbitos em relação ao mesmo período do ano anterior: 169 casos notificados de dengue grave e 83 óbitos por dengue em 2017, enquanto em 2016, foram notificados 881 casos de dengue grave e 675 óbitos (SVS/MS, 2017).

O Sistema de Vigilância Epidemiológica registrou grandes epidemias de dengue: em 1986 do DENV-1, em 1990 do DENV-2, em 2002 do DENV-3, em 2008 do DENV-2, em 2010 do DENV-1, em 2013 do DENV-4, em 2015 e 2016 do DENV-1 (SVS/MS, 2017).

Fica evidenciada a importância do papel do estado do Rio de Janeiro na epidemiologia da dengue, sendo a porta de entrada e de dispersão de três (DENV-1, 2 e 3) dos quatro sorotipos atualmente circulantes no país. Nos últimos 25 anos, o estado foi marcado por extensas epidemias resultantes da introdução dos DENV-1 em 1986, DENV-2 em 1990, DENV-3 em 2000 e DENV-4 em 2011, sendo a Região Metropolitana a mais afetada (Schatzmayr et al., 1986; Nogueira et al., 2005; Nogueira & Eppinghaus, 2011).

### **1.3 – Epidemiologia molecular do DENV no Brasil**

A grande diversidade genética do DENV pode ter contribuído para consequências graves, como o aumento da patogenicidade, transmissibilidade e propriedades de virulência (Figueiredo, 2012). A diversidade genética permite o aumento da replicação viral após infecções heterólogas devido à imunidade reativa cruzada limitada (Chen & Vasilakis, 2011).

Os quatro sorotipos são geneticamente distintos, e cada um apresenta variações genéticas classificadas como subtipos ou genótipos (Añez et al., 2011).

Estudos de filogenia têm descrito cinco genótipos distintos para DENV-1: genótipos I ao V; seis genótipos para DENV-2: Asiático I, Asiático II, Sudeste Asiático/Americano, Americano, Cosmopolita e Selvagem; cinco genótipos para DENV-3: I ao V; e quatro genótipos para DENV-4: I ao IV (Tung et al., 2008; dos Santos et al., 2011; Añez et al., 2012; Dettogni & Louro, 2012).

No Brasil, circula o genótipo V do DENV-1 (Américas/África), o genótipo Sudeste Asiático/Americano do DENV-2, o genótipo III do DENV-3, e genótipos I e II do DENV-4 (de Araújo et al., 2012; Nunes et al., 2012; Faria et al., 2013; de Bruycker-Nogueira et al., 2015).

A introdução de novos genótipos de DENV pode ter facilitado o aumento da gravidade no quadro clínico da dengue nas epidemias mais recentes (Añez et al., 2011).

Os primeiros casos de dengue grave com manifestações hemorrágicas nas Américas, na década de 1980, foram causados pelo DENV-2, genótipo Asiático/Americano, que substituiu o genótipo Americano, acarretando casos mais graves (Rico-Hesse et al., 1997).

No Brasil, os primeiros casos de dengue grave com manifestações hemorrágicas passaram a ser notificados após a introdução de DENV-2 no estado do Rio de Janeiro (Nogueira et al., 1993). Análises filogenéticas confirmaram a origem asiática do genótipo referente às amostras de DENV-2 que circularam durante a epidemia de 1990 (Miagostovich et al., 1998). Amostras do genótipo Asiático/Americano foram isoladas durante períodos epidêmicos em 1990 e 1998 no Rio de Janeiro e também em 2007-2008 no mesmo estado (Oliveira et al., 2010; Romano et al., 2010; Nunes et al., 2016).

Esse panorama sugere que vírus geneticamente diferentes detectados no Rio de Janeiro podem ser o resultado de evolução local do DENV-2 desde sua introdução em 1990 (Oliveira et al., 2010; Faria et al., 2013). De fato, amostras de DENV-2 circulando no Brasil pertencem a diferentes linhagens do genótipo Asiático/Americano: linhagem I, que circulou de 1990 a 2003, e linhagem II para amostras isoladas a partir de 2007 (Faria et al., 2013; Nunes et al., 2016). A circulação da linhagem II do DENV-2 trouxe um grande impacto na epidemiologia da dengue, particularmente para o Rio de Janeiro. A epidemia de 2008, causada predominantemente pela linhagem II do DENV-2, foi considerada de grande magnitude, sendo notificados mais de 806 mil casos de dengue no Brasil e, só no estado do Rio de Janeiro houve, aproximadamente, 322 mil notificações e 252 óbitos (Nogueira et al., 2007; SVS, 2008).

Além do grande número de casos graves e óbitos, observou-se um aumento na gravidade dos casos em crianças ( $\leq 15$  anos) (Teixeira et al., 2009). Dessa forma, o perfil patogênico da

epidemia de 2008 no Rio de Janeiro foi marcado pela circulação da linhagem II do DENV-2 e pela faixa etária de crianças (Nunes et al., 2016).

## **1.4 – Agente etiológico: DENV**

### **1.4.1 – Estrutura do DENV**

O DENV é constituído por quatro sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que pertencem ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* (da qual o vírus da febre amarela é o tipo específico), abrangendo aproximadamente 50 vírus (Westaway & Blok, 1997; Fernandez-Garcia et al., 2009; Simmonds et al., 2017). Todos os flavivírus apresentam grupo de epítomos em comum presentes na proteína do envelope, o que leva a reações cruzadas em testes sorológicos, dificultando o diagnóstico sorológico laboratorial, ainda mais quando trata-se dos quatro sorotipos de um mesmo vírus (Gubler, 1998).

Esférico e relativamente pequeno, medindo cerca de 40 a 50nm de diâmetro, DENV é envolto por um envelope lipoproteico (Gubler, 1998). O vírion do DENV é caracterizado por uma superfície relativamente lisa, com aproximadamente 50 nm de diâmetro, e um núcleo eletrodense envolto por uma bicamada lipídica (Kuhn et al., 2002). Seu genoma é formado por fita simples de RNA de polaridade positiva que funciona como RNA mensageiro. O genoma, constituído por aproximadamente 10.700 bases, codifica dez proteínas, sendo três estruturais e sete não estruturais. As três proteínas estruturais que ocorrem em quantidades estequiométricas na partícula são: proteína C (100 aminoácidos), proteína prM (75 aminoácidos), e proteína E (495 aminoácidos). As proteínas não-estruturais são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Gubler, 1998; Kuhn et al., 2002). As proteínas estruturais atuam na conformação arquitetônica da partícula viral, enquanto as proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação e montagem dos novos vírus (Kinney & Huang, 2001).

As partículas virais são envelopadas por uma bicamada lipídica que está inserida em uma estrutura icosaédrica formada pela glicoproteína E do envelope (Kuhn et al., 2002). A glicoproteína E está ancorada na membrana viral por duas hélices transmembrana C-terminais (Cockburn et al., 2012). Sua estrutura possui três domínios diferentes. O DI, que contém a região N-terminal, está no centro juntamente ao DII e ao DIII, lado a lado, sendo que DII apresenta um loop de fusão hidrofóbico (a sequência de aminoácido do loop é conservada entre os flavivírus) na sua ponta mais distante (Cockburn et al., 2012). O loop de fusão insere-se na membrana endossomal durante a mudança conformacional fusogênica da membrana dirigida pela acidificação do pH (Cockburn et al., 2012). Esse processo é necessário para liberar o ácido nucleico viral no citoplasma e iniciar a infecção. A porção C-terminal do ectodomínio, o DIII,



é um sanduíche com oito fitas beta ( $\beta$ ) com uma superfamília de imunoglobulinas. Acredita-se que DIII atua na ligação ao receptor (Crill & Roehrig, 2001).

É sabido que as partículas do DENV apresentam uma organização diferente das glicoproteínas da superfície de acordo com a temperatura: quando estão em temperatura acima de 34°C, como no corpo humano, e quando estão em temperaturas mais baixas, como acontece nos mosquitos (Fibriansah et al., 2013; Zhang et al., 2013). O entendimento dessa particularidade do vírus traz importantes implicações para a compreensão da forma como as partículas virais são apresentadas ao sistema imunológico humano, além de ser fundamental para o desenvolvimento de uma vacina efetiva (Rey, 2013).

#### 1.4.2 – Proteínas do DENV

O DENV apresenta um genoma formado por uma fita simples de RNA, com polaridade positiva e aproximadamente 11000 bases, e contém uma única sequência de leitura aberta, flanqueada por regiões 5' e 3' não traduzidas (Kuhn et al., 2002). A sequência de leitura aberta é traduzida em uma poliproteína composta por 3300 aminoácidos que é clivada pelas proteases do hospedeiro e do vírus em proteínas estruturais e não estruturais (Kuhn et al., 2002; Lindenbach et al., 2007; Lindenbach et al., 2013). As proteínas estruturais são codificadas na extremidade 5' do genoma, e os genes para as proteínas não estruturais estão localizados ao longo da sequência (Chambers et al., 1990). A ordem das proteínas codificadas na sequência de leitura aberta é 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3' (Chambers et al., 1990) (Figura 1.2).

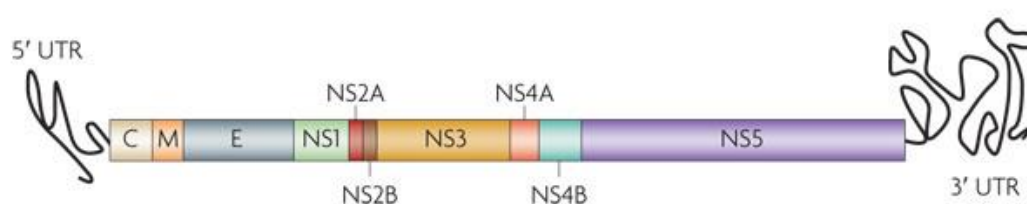


Figura 1.2-Genoma do DENV apresentando as 3 proteínas estruturais (Capsídeo, Membrana e Envelope) e as 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Adaptado de Guzmán e colaboradores (2010a).

As proteínas estruturais diferenciam os sorotipos virais e fazem a ligação do DENV às células do hospedeiro para a entrada do vírus (Lindenbach et al., 2013).

A proteína C, presente nos vírions, é uma proteína pequena (aproximadamente 12-14kD), que forma um componente estrutural do nucleocapsídeo (Chambers et al., 1990).

A proteína prM é uma glicoproteína precursora à proteína estrutural M, com aproximadamente 18,1-19,0kD. A prM sofre uma clivagem tardia para formar M e o segmento N-terminal. Esta clivagem está ligada à maturação do vírus ou à liberação deste, uma vez que prM e M são encontradas em vírus intracelulares e extracelulares, respectivamente (Chambers et al., 1990).

A proteína E, com aproximadamente 53-54kD, é a maior proteína estrutural das formas glicosiladas dos vírus, e são encontradas em alguns flavivírus, mas não em todos. Esta proteína atua em várias atividades biológicas como a montagem dos vírus, a ligação de receptores, a fusão de membrana, e é o maior alvo para anticorpos neutralizantes.

A glicoproteína E é o principal determinante antigênico das partículas virais e atua como mediadora entre a ligação e a fusão durante a entrada do vírus (Lindenbach & Rice, 2003).

A proteína M, produzida durante a maturação das partículas virais dentro da via secretora, é um pequeno fragmento proteolítico da proteína precursora prM (Lindenbach & Rice, 2003).

As proteínas não estruturais são essenciais para a replicação viral e são altamente conservadas entre os diferentes sorotipos. Nesse grupo, estão as proteínas grandes e altamente conservadas NS1, NS3 e NS5, e as quatro proteínas pequenas e hidrofóbicas NS2a, NS2b, NS4a e NS4b (Chambers et al., 1990).

O produto do gene NS1 é uma glicoproteína secretada a partir de células de mamíferos, produzida por todos os flavivírus, essencial para a replicação viral e para viabilidade do vírus (Mackow et al., 1987; Deubel et al., 1988; Mackenzie et al., 1996; Flamand et al., 1999; Panyasrivanit et al., 2009).

A glicoproteína NS1 existe em múltiplas formas oligoméricas (Muller et al., 2012). Caracteriza-se como um monômero, e também como um dímero quando está associada à membrana celular (mNS1), tanto dentro das células como na superfície delas, e ainda como um hexâmero, quando é secretada no meio extracelular (sNS1) (Smith & Wright, 1985; Westaway & Goodman, 1987; Winkler et al., 1988; Mason, 1989; Rastogi et al., 2016). A forma sNS1 é sintetizada dentro da célula infectada como um monômero solúvel e rapidamente dimeriza na luz do retículo endoplasmático. Atinge a superfície da célula e é secretada no meio extracelular predominantemente como um hexâmero composto por subunidades de dímeros (Winkler et al., 1989; Crooks et al., 1994; Flamand et al., 1999).

Dentre as proteínas não estruturais, a NS1 é altamente conservada para todos os sorotipos de DENV, e consiste em uma proteína com peso molecular aproximado de 46-55kDa (dependendo da extensão da glicosilação) (Rastogi et al., 2016). A glicosilação da NS1 é importante para secreção eficiente, para a virulência e para a replicação viral (Winkler et al.,

1988; Pryor & Wright, 1994; Crabtree et al., 2005; Somnuk et al., 2011). Expressa na superfície das células infectadas e secretada na circulação, a sNS1 na corrente sanguínea é um importante alvo dos anticorpos anti-DENV, estimulando uma resposta humoral forte (Libraty et al., 2002; Rothman, 2004; Muller et al., 2012). Anticorpos contra a NS1 podem desencadear a lise, mediada pelo complemento, das células infectadas pelo DENV *in vitro* (Schlesinger et al., 1987). O antígeno NS1 e os anticorpos anti-NS1 específicos podem ter um importante papel na patogênese da dengue grave (Falconar, 1997). A maior concentração de NS1 correlaciona-se diretamente com a gravidade da doença e o aumento da viremia. Além disso, o NS1 é um importante biomarcador para o diagnóstico precoce das infecções pelos flavivírus (Rastogi et al., 2016).

A proteína NS2A é a primeira de quatro proteínas hidrofóbicas relativamente pequenas (NS2A, NS2B, NS4A, NS4B) encontradas dentro das regiões NS2 e NS4 da poliproteína, apresentando cerca de 24-25kDa (Chambers et al., 1990). Uma série de regiões hidrofóbicas são conservadas entre os flavivírus quanto à posição, mas não quanto à sequência, sugerindo que essas proteínas são associadas à membrana. A NS2A está fortemente envolvida na replicação do RNA viral e na montagem do DENV (Chambers et al., 1990). A mutação de um único aminoácido na proteína NS2A bloqueia a replicação do vírus, além de inibir a transcrição do IFN- $\beta$ , que serve como antagonista do interferon (Muñoz-Jordan et al., 2003; Liu et al., 2004).

A NS2B trabalha como um cofator na serina-protease em NS2B-NS3, sendo necessária para a clivagem entre NS2A/NS2B e NS2B/NS3, e entre NS3/NS4A, além de outras clivagens internas (Falgout et al., 1991).

A NS3, a segunda maior proteína viral (aproximadamente 68-70kD), é altamente conservada entre os flavivírus (Rice et al., 1986; Mandl et al., 1989). A NS3 desempenha, na replicação do RNA viral, atividade como protease e possivelmente como um nucleotídeo trifosfatase/helicase, sugerindo sua localização citoplasmática com associação à membrana (Chambers et al., 1990).

As proteínas NS2B, NS4A e NS4B, assim como a NS2A, são fracamente conservadas entre os flavivírus, embora contenham características estruturais similares (Rice et al., 1986; Mandl et al., 1989; Chambers et al., 1990). As proteínas NS2B e NS4B são rapidamente identificadas nas células infectadas (Chambers et al., 1990).

Entre as proteínas não estruturais dos flavivírus, a NS5 é a maior (103-104kDa, 900 aminoácidos) e a mais altamente conservada, atingindo cerca de 70% de identidade na sequência entre os quatro sorotipos do DENV (Mandl et al., 1989; Bartholomeusz & Wright, 1993; Lindenbach et al., 2007). A NS5 é uma proteína básica, não apresentando alongamento hidrofóbico, e atua como polimerase do RNA viral, além de gerar a terminação N por clivagem

no citoplasma, o que sugere sua localização no citoplasma apesar de estar associada à membrana (Chambers et al., 1990).

### **1.5 – Ciclo de replicação do DENV no hospedeiro vertebrado**

Em seu principal ciclo de manutenção, o DENV infecta hospedeiros vertebrados através de artrópodes vetores infectados durante o repasto sanguíneo.

O DENV penetra na célula-alvo por endocitose mediada pela ligação aos receptores na superfície da célula, levando à captação desse vírus para o interior dos endossomos (Bressanelli et al., 2004; Modis et al., 2004; van der Schaar et al., 2008; Rey, 2013). Dentro dos endossomos, pela redução do pH, o meio ácido viabiliza a dissociação dimérica da glicoproteína E (envelope) e a exposição do loop de fusão dessa proteína que se insere na membrana celular das organelas, o endossomo (Rey, 2013). Esse processo desencadeia um grande rearranjo conformacional em sua estrutura, induzindo a fusão da membrana do vírus com a membrana endossomal do hospedeiro (Bressanelli et al., 2004; Modis et al., 2004; van der Schaar et al., 2008; Rey, 2013).

A glicoproteína E é responsável tanto pela ligação dos receptores quanto pela indução da fusão da membrana no endossomo, de forma a liberar o RNA viral no citoplasma, configurando a principal etapa no processo de entrada dos flavivírus (Cockburn et al., 2012; Rey, 2013). Além disso, a glicoproteína E, que consiste em dímeros de proteína na superfície do vírus, é o principal antígeno alvo dos anticorpos neutralizantes contra o DENV (Rey, 2013).

Por conseguinte, anticorpos contra a proteína E podem bloquear a infecção interferindo na ligação do receptor ou na mudança conformacional (Rey, 2013). Todavia, a situação complica-se em função de uma outra glicoproteína, a prM, que se associa à proteína E durante a síntese viral (Rey, 2013). A prM é clivada durante o processo de maturação viral, contudo uma quantidade significativa da proteína ainda é encontrada em partículas virais que circulam no hospedeiro infectado, induzindo anticorpos não-neutralizantes e contribuindo para o agravamento da infecção mediado por anticorpos (Dejnirattisai et al., 2010).

O RNA liberado codifica um precursor de poliproteína formado por aproximadamente 3400 aminoácidos (Fernandez-Garcia et al., 2009). O polipeptídeo é processado de forma *co* e *pós* traducional por enzimas sinalizadoras da célula do hospedeiro; e a protease NS2B/NS3, codificada pelo vírus, dá origem a três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS) (Fernandez-Garcia et al., 2009).

As proteínas estruturais do núcleo (proteína C; do inglês *core*), prM e E constituem a partícula viral, enquanto as proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação do RNA

viral, na montagem do vírus e na modulação da resposta das células do hospedeiro (Lindenbach et al., 2007).

Após a tradução do RNA genômico, a NS5 RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) faz uma cópia complementar da fita senso negativo do genoma do RNA, o qual é utilizado como molde para a síntese da nova fita de RNA senso positivo (Brinton, 2002). A replicação, induzida pelo vírus, ocorre nas membranas celulares do hospedeiro (Fernandez-Garcia et al., 2009). Tais estruturas podem servir como um suporte para a ancoragem dos complexos da replicação viral, que consistem no RNA viral, proteínas virais e possivelmente fatores celulares do hospedeiro (Mackenzie et al., 1999; Mackenzie, 2005). A montagem de vírus imaturos e, portanto, não infecciosos, acontece no retículo endoplasmático (RE), onde o RNA viral é complexado com a proteína C, e é empacotado em uma bicamada lipídica derivada do RE contendo heterodímeros das proteínas prM e E (Mackenzie & Westaway, 2001; Lorenz et al., 2003). A proteína prM age como um suporte que previne a fusão prematura do vírus durante o transporte até sair da célula (Li et al., 2008; Yu et al., 2008). Depois de ser transportado pela via secretória do hospedeiro, o vírion sofre a maturação que ocorre na rede trans-Golgi por meio da clivagem, mediada por furina, da proteína prM em M (Stadler et al., 1997; Li et al., 2008; Yu et al., 2008). A clivagem pelas furinas ou outras proteases elimina a metade N-terminal da prM (o domínio “pr”) (Cockburn et al., 2012). Partículas infecciosas maduras são então liberadas por exocitose no meio extracelular (Fernandez-Garcia et al., 2009).

Esta etapa da maturação, na maioria das vezes, é incompleta, resultando numa fração significativa de vírions parcialmente maduros, que são liberados das células infectadas (Junjhon et al., 2010). Esses vírions são infecciosos, e no mesmo vírion são viabilizadas uma porção semelhante à partícula madura e outra semelhante à partícula imatura (Plevka et al., 2011), exibindo características antigênicas de ambos os tipos (Nelson et al., 2008). Nas partículas maduras de vírus, o loop de fusão da glicoproteína E permanece escondido na sua interface dimérica (Rey, 2013). Infecções pelos vírions do dengue derivam de ativação proteolítica de partículas imaturas não infecciosas, cuja superfície é composta por heterodímeros das glicoproteínas virais prM e E (Lindenbach et al., 2007).

Após a associação do RNA viral à proteína do capsídeo, seguida pelo brotamento no retículo endoplasmático para adquirir a membrana lipídica revestida pelas proteínas da membrana (prM/M) e do E, o vírion é liberado pela via secretória do hospedeiro (Figura 1.3).

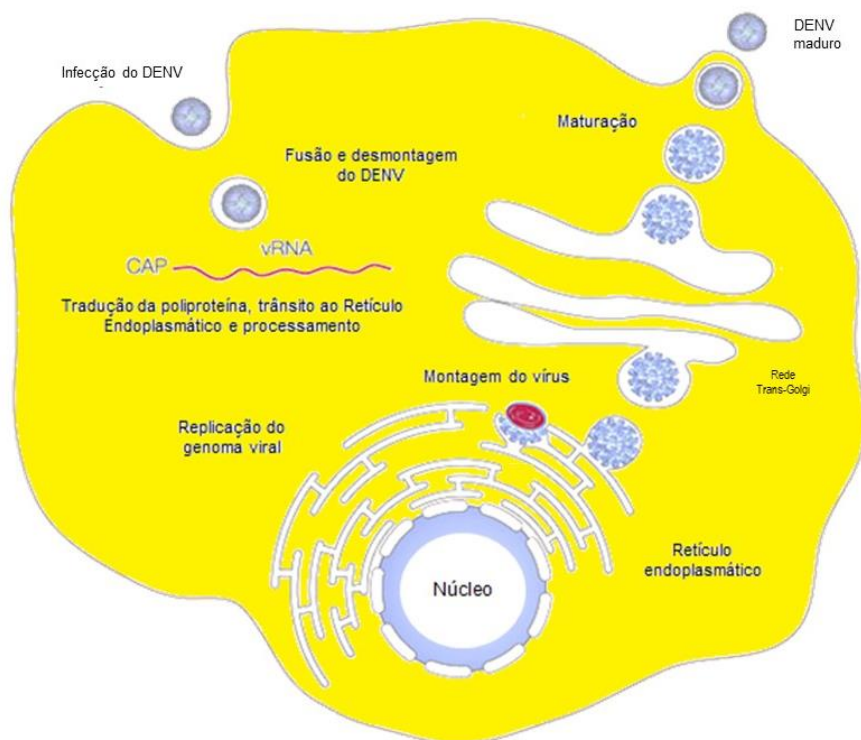


Figura 1.3-Ciclo de replicação do DENV no hospedeiro vertebrado. Adaptado de Mukhopadhyay e colaboradores (2005).

Durante a maturação dos vírus, a clivagem da prM/M dos vírions durante sua liberação da célula é necessária para a geração de vírions maduros, os quais apresentam uma superfície lisa, enquanto os vírions imaturos ou parcialmente maduros dispõem de uma superfície espiculada (Pierson & Diamond, 2012). Em função da exposição diferenciada e da conformação das proteínas E e prM/M na superfície de vírions maduros versus imaturos, o estado de maturação dos flavivírus modula tanto os tipos celulares que são infectivos (devido aos receptores específicos expressos) quanto à interação do vírion com anticorpos particulares (Pierson & Diamond, 2012; Austin et al., 2012).

### 1.6 – Vetores e ciclo de transmissão do DENV

Mosquitos do gênero *Aedes* (família *Culicidae*) e subgênero *Stegomyia* (especialmente *Ae.aegypti*, *Ae.albopictus* e *Ae.polynesiensis*) são os mosquitos vetores do DENV (Rodhain & Rosen, 1997). O *Ae. aegypti* ocupa o lugar de principal vetor do DENV, seguido em importância pelo *Ae. albopictus* (Rezza, 2014).

Os arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes), como é o caso do DENV, replicam-se tanto no hospedeiro vertebrado quanto no vetor artrópode e, portanto, ficam expostos ao sistema

imune do hospedeiro e do vetor (McFarlane et al., 2014). Durante o repasto sanguíneo, o mosquito vetor ingere sangue de um hospedeiro vertebrado virêmico. No vetor, o DENV infecta e se replica nas células epiteliais do trato intestinal (McFarlane et al., 2014). A replicação nos tecidos do vetor pode levar de 8 a 12 dias para atingir uma carga viral suficiente para a transmissão do vírus no próximo repasto sanguíneo. Esse tempo é conhecido como período de incubação extrínseco (Gubler & Rosen, 1976; Gubler, 1988; Service, 1992). Após esse período, o mosquito permanece apto a transmitir o vírus durante sua vida, que pode variar de alguns dias até algumas semanas. A replicação bem-sucedida e a passagem do vírus através do intestino do mosquito permitem que o vírus se dissemine e infecte outros tecidos, como a traqueia, a gordura corporal e as glândulas salivares do mosquito (McFarlane et al., 2014). Uma vez que o vírus é detectado na saliva, o mosquito torna-se competente para a transmissão ao próximo hospedeiro vertebrado (Black et al., 2002; Bennett et al., 2005). O trato genital também é infectado e o vírus pode infectar ovos completamente desenvolvidos no momento da oviposição (Rosen, 1987).

Os culicídeos, como os vetores do DENV, desenvolvem-se em estágios de embrião, larva, pupa e adulto, que apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas consideráveis (Harker et al., 2013). Estes estágios também ocupam nichos diferentes, que vão desde o ambiente aquático ao terrestre (Harker et al., 2013).

Cada um dos quatro sorotipos do DENV é mantido em dois ciclos de transmissão diferentes quanto à sua ecologia e evolução. O ciclo silvestre, presente em florestas tropicais da África Ocidental e da Ásia, envolve primatas não-humanos e mosquitos *Aedes acrodendrofílicos*, isto é, que apresentam maior atividade na copa das árvores (Gubler, 1988). Evidências sugerem que o vírus não se desloca com regularidade das florestas para as áreas urbanas (Rico-Hesse, 1990).

Já o ciclo da doença no ser humano envolve principalmente o mosquito doméstico *Ae.aegypti*, subespécie *aegypti* (Mattingly, 1957), além do mosquito peridoméstico *Ae.albopictus* e outras espécies de *Aedes*, como vetores secundários. Estes vetores são encontrados em uma grande diversidade de ambientes dos trópicos e subtropicais (Gubler & Trent, 1993). O *Ae.aegypti* adaptou-se ao ambiente doméstico, o que permite sua rápida proliferação nas cidades e sua disseminação para outras áreas, por meio de transporte passivo também. O *Ae.aegypti*, por ser antropofílico, isto é, fazer hematofagia preferencialmente em humanos, e apresentar discordância gonotrófica, ou seja, poder fazer repasto sanguíneo em diferentes hospedeiros antes da oviposição, apresenta grande competência vetorial (Dye, 1992).

Em grande parte dos trópicos e subtropicais, a dengue é endêmica, ocorrendo anualmente e durante estações do ano de chuva, período ótimo para a formação de criadouros de *Aedes*,

umentando assim a população do mosquito. Segundo Gubler (1998), do ponto de vista da saúde pública, o ciclo de transmissão mais importante é o endêmico/epidêmico em grandes centros urbanos dos trópicos. O autor explica que os vírus são mantidos em um ciclo *Ae. aegypti* – ser humano – *Ae.aegypti* com epidemias periódicas. Frequentemente, vários sorotipos co-circulam na mesma cidade (hiperendemicidade). *Ae.aegypti*, o vetor principal, é um mosquito tropical altamente domesticado que prefere depositar seus ovos em reservatórios artificiais, comumente encontrados nos arredores das casas (Gubler, 1998).

A persistência do DENV depende da alta viremia nos humanos para garantir a transmissão em mosquitos (McBride & Bielefeldt-Ohmannb, 2000). Essa relação vírus/vetor pode ser o principal fator na seleção e propagação de cepas patogênicas de DENV em ambientes urbanos (Gubler, 1988).

Dessa forma, o ambiente desenvolvido pelo crescimento dos centros urbanos e a manutenção de estratégias de combate que precisam ser aprimoradas proporcionam a dispersão e o aumento da densidade populacional do *Ae.aegypti*. Além da proliferação do *Ae.aegypti*, mudanças demográficas, urbanização intensa, crescimento desorganizado nas cidades e condições sanitárias básicas inadequadas são fatores que têm dificultado o controle da doença (Tauil, 2001; Laughlin et al., 2012). Esses são alguns fatores que explicam como a circulação do vírus estabeleceu-se e expandiu-se nos centros urbanos de várias regiões do mundo de maneira epidêmica e hiperendêmica tornando a dengue um grave problema de saúde pública mundial (Teixeira et al., 1999).

## **1.7 – Resposta imune**

O DENV replica-se em células alvo iniciais localizadas na pele, como células de Langerhans, células da derme, células dendríticas intersticiais (Palucka, 2000; Wu et al., 2000; Navarro-Sanchez et al., 2005), que são dez vezes mais permissivas para infecções por DENV do que monócitos ou macrófagos (Wu et al., 2000).

A resposta imune inata ativa o sistema complemento, que ajuda os anticorpos e células brancas a inativarem o vírus do organismo (Diamond, 2003). Os receptores de reconhecimento padrão, como os receptores Toll-like (TLRs), e os sensores intracelulares, são com frequência uma das primeiras linhas na defesa durante a resposta imune inata, que reconhece o RNA viral (Guzmán & Harris, 2015). O receptor humano TLR3 reconhece a infecção pelo DENV e induz uma resposta forte de interferon  $\alpha/\beta$  in vitro (Nasirudeen et al., 2011). O Interferon  $\alpha/\beta$  consiste em um poderoso inibidor da infecção pelo DENV (Guzmán & Harris, 2015).



A resposta imune adaptativa pode ser celular e humoral. As células dendríticas infectadas amadurecem e migram para linfonodos regionais ou locais onde apresentam antígenos virais às células T, iniciando a resposta imune celular e humoral (Palucka, 2000; Guzmán et al., 2010a). Monócitos e macrófagos infectados, circulando pelo sistema linfático, disseminam o DENV pelo organismo, ocorrendo replicação abundante do DENV nas células do parênquima hepático, nos linfonodos, medula óssea, fígado e baço e em outros monócitos circulantes, presentes no sangue periférico (Jessie et al., 2004). A disseminação e o aumento da concentração do DENV na corrente sanguínea caracterizam a condição de viremia. As células infectadas produzem e liberam pequenas proteínas, os *interferons*, que interferem na replicação viral e ativam tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (Diamond, 2003).

Durante a resposta imune adaptativa, os linfócitos B produzem as imunoglobulinas IgM e IgG que são liberadas na corrente sanguínea e na linfa, direcionadas primeiramente contra as proteínas do envelope do vírus (Figura 1.4) (Martina et al., 2009).

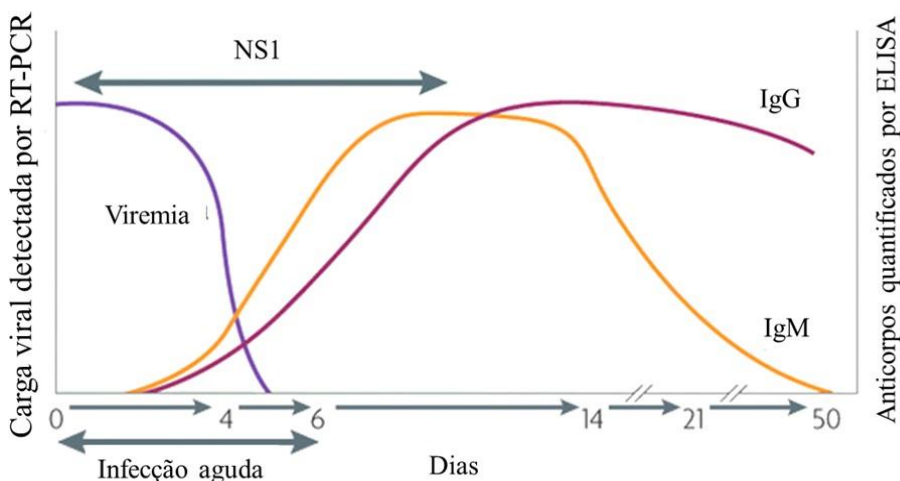


Figura 1.4-Resposta imune à infecção pelo DENV. Adaptado de Guzmán e colaboradores (2010a).

A resposta imune varia de acordo com o tipo de infecção: primária (primeira infecção por DENV) ou secundária (outra infecção de um indivíduo previamente infectado por um sorotipo heterólogo do DENV ou por outros flavivírus) (Vorndam & Kuno, 1997). Em geral, o diagnóstico sorológico da dengue depende do estágio da infecção (Buchy et al., 2007).

Uma infecção primária causada por um dos sorotipos do DENV é caracterizada por uma resposta de anticorpos lenta e com títulos baixos (Guzmán et al., 2010a). O anticorpo IgM é o

primeiro isotipo de imunoglobulina a aparecer, em torno de 4 a 5 dias depois do início da febre, sendo detectável até 3 meses aproximadamente, quando seus níveis caem e mantêm-se baixos (Nogueira et al., 1992). Anticorpos IgG anti-DENV a uma titulação baixa são detectados no final da primeira semana da doença, aumentando vagarosamente a partir de então.

Já durante uma infecção secundária, os títulos dos anticorpos aumentam muito rapidamente e os anticorpos reagem amplamente com muitos flavivírus (Innis et al., 1989). Altos níveis de IgG são detectáveis até mesmo durante a fase aguda e aumentam muito ao longo das duas semanas seguintes. A cinética da resposta da IgM varia um pouco mais. Uma vez que os níveis de IgM são significativamente mais baixos durante a infecção secundária, alguns resultados falso-negativos surgem em testes de detecção de IgM anti-DENV. O anticorpo IgM é detectável no 5º dia da doença em 80% dos casos, e entre o 6º e o 10º dia de doença, em 93 a 99% dos casos, podendo permanecer detectável durante mais de 90 dias (PAHO, 1994).

A infecção por um sorotipo gera imunidade por toda a vida quanto ao sorotipo homólogo, e apenas imunidade passageira quanto aos demais sorotipos heterólogos. Dessa forma, indivíduos vivendo em área endêmica podem infectar-se até quatro vezes ao longo de sua vida (Figura 1.5).

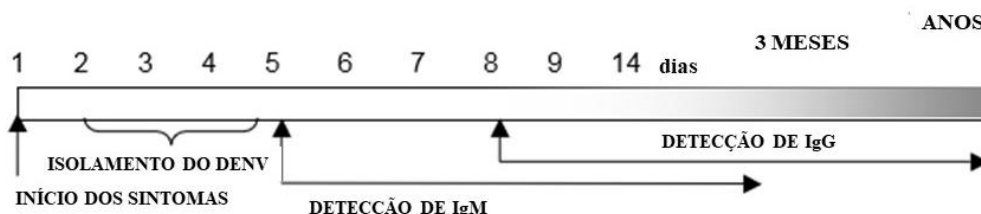


Figura 1.5-Linha do tempo geral de uma infecção primária por DENV a partir do início dos sinais e sintomas da dengue e do isolamento viral até a detecção de IgM e IgG. Adaptado de Buchy e colaboradores (2007).

A resposta imune humoral do ser humano ao DENV é dominada por anticorpos que reagem cruzadamente, muitos dos quais não são neutralizantes e têm a prM como alvo (Oliphant et al., 2007; Lai et al., 2008; Crill et al., 2009; Dejnirattisai et al., 2010).

## 1.8 – Manifestações clínicas da infecção pelo DENV

A infecção pelo DENV apresenta um amplo espectro de manifestações, incluindo a forma assintomática e a forma sintomática: dengue (forma não-grave), formas graves, com manifestações hemorrágicas e choque em indivíduos afetados.

Apesar das teorias que buscam explicar a ocorrência de casos graves de dengue, os fatores que levam algumas infecções a se apresentarem brandas e outras graves ainda não estão esclarecidos.

A forma não-grave da dengue, ou dengue sem sinais de alerta, é considerada uma doença de jovens e adultos, autolimitante e raramente fatal (Gubler, 1998). A fase aguda costuma durar de 3 a 7 dias, mas a fase convalescente pode ser prolongada por semanas, e não há registros de sequelas associadas à infecção. É caracterizada pelo início súbito de febre e por uma série de sinais e sintomas inespecíficos, como dor de cabeça, dor retro-orbitária, mialgia, náusea e vômito, dores articulares, fraqueza, inapetência e erupções cutâneas (Hayes & Gubler, 1992).

As manifestações clínicas da dengue grave incluem o extravasamento plasmático, derrame cavitário com dificuldade respiratória, hemorragia grave, comprometimento de órgãos, especialmente do fígado, e o envolvimento do sistema nervoso central (SNC), podendo levar à perda da consciência (WHO/TDR, 2009). O extravasamento plasmático é causado pelo aumento difuso na permeabilidade vascular e apresenta-se como uma combinação da hemoconcentração com efusão pleural ou ascite (Kalayanarooj et al., 1997). O extravasamento plasmático torna-se evidente entre o 3º e o 7º dia de doença, correspondendo ao tempo que os pacientes com dengue não-grave levariam até a recuperação (Nimmannitya, 1987). O volume de sangue circulante é reduzido, o que pode resultar em choque. A tendência à hemorragia está relacionada à fragilidade capilar e à trombocitopenia. As manifestações hemorrágicas variam, desde um teste de torniquete positivo a hemorragias gastrointestinais com risco de vida (Rothman & Ennis, 1999). O comprometimento hepático dá-se pela hepatomegalia e pelos níveis elevados de transaminases no soro. O padrão dessas manifestações clínicas e os achados patológicos correspondentes sugerem que os fatores do hospedeiro desempenham um papel primordial na patogênese da dengue grave (Rothman & Ennis, 1999).

Outros fatores foram postulados como importantes na patogênese da dengue grave com manifestações hemorrágicas. Entre eles: 1) existência de genótipos virulentos específicos que se replicam em níveis elevados resultando em aumento da resposta imune e aumento da doença; 2) predisposição genética à doença grave em certas populações; e 3) outros fatores de risco, como idade, sexo e nutrição (Halstead et al., 1970; Rosen, 1977; Guzmán et al., 1984; Bravo et al., 1985; Thisyakorn & Nimmannitya, 1993; Rico-Hesse et al., 1997; Leitmeyer et al., 1999).

Evidentemente, os mecanismos que causam a dengue grave não atuam isoladamente, haja vista a importância atribuída às diferenças entre cepas virais na determinação da incidência da forma grave da doença, além de fatores de risco individuais do hospedeiro e de fatores epidemiológicos (Kouri et al., 1987; Rico-Hesse et al., 1997).

## 1.9 – Patogenia da dengue

Depois de um período de incubação de quatro a oito dias, a infecção por qualquer um dos quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) pode produzir um amplo espectro de sinais clínicos e sintomas, desde uma doença febril leve, classificada como dengue sem sinais de alerta, até a doença com manifestações hemorrágicas graves e choque, classificada como dengue grave, sendo a maioria das infecções assintomáticas ou subclínicas (WHO, 1997; Guzmán & Harris, 2015).

A doença tem início súbito seguido por três fases: febre, fase crítica e recuperação (Guzmán & Harris, 2015). O período crítico ocorre em torno da defervescência, quando dá-se um aumento na permeabilidade capilar acompanhada pelo aumento no hematócrito, podendo levar ao choque hipovolêmico, que pode resultar em falência dos órgãos, acidose metabólica, coagulação intravascular disseminada e hemorragia grave (Guzmán & Harris, 2015). Além disso, a dengue grave pode desenvolver hepatite, desordens neurológicas, miocardite ou sangramento grave sem extravasamento plasmático ou choque (Guzmán & Harris, 2015). Se não tratada, a forma grave da dengue pode levar cerca de 20% dos pacientes a óbito, enquanto o manejo clínico adequado e a reidratação intravenosa podem reduzir a mortalidade a menos de 1,9% (WHO/TDR, 2009).

A maioria dos pacientes recupera-se sem complicações após o período virêmico em que o quadro clínico se manifesta, enquanto, em um pequeno número de pacientes, a doença evolui para a dengue grave, caracterizada por extravasamento plasmático com ou sem sangramento (Guzmán & Harris, 2015).

O primeiro indício de uma possível relação entre fatores imunológicos do indivíduo para o acometimento da forma grave da dengue deu-se em 1960. Em um estudo realizado na Tailândia, foi observado que 85% das crianças com dengue grave apresentavam altos títulos de anticorpos para mais de um sorotipo de DENV, sugerindo infecções secundárias (Halstead et al., 1970). Esse fato levantou a hipótese de que a forma grave da dengue seria mais comum em infecções secundárias pelo DENV do que em infecções primárias. Vários estudos na época corroboraram essa hipótese (Sangkawibha et al., 1984; Burke et al., 1988; Thein et al., 1997).

Estudos epidemiológicos mostram que a dengue grave está fortemente associada não só à infecção secundária, causada por um sorotipo heterólogo, como também à infecção primária de bebês com baixas concentrações de anticorpos maternos anti-DENV presentes no soro (Halstead, 1988; Kliks et al., 1988).

Algumas teorias, que não são mutuamente exclusivas, buscam explicar a ocorrência da forma grave da dengue. Entre elas, a Teoria de Halstead é conhecida como a hipótese da infecção secundária ou ADE (*Antibody Dependent Enhancement*). Esta teoria relaciona a forma grave da

doença a infecções sequenciais por diferentes sorotipos, com intervalos de três meses a cinco anos, e atribui a gravidade da dengue à ocorrência da resposta imunológica exacerbada durante a infecção secundária (Halstead, 1988). Segundo essa teoria, os pacientes que experimentam uma segunda infecção por um sorotipo de vírus da dengue heterólogo têm um risco significativamente maior de desenvolver dengue grave (Halstead, 1988). Os anticorpos heterólogos pré-existentes reconhecem o vírus infectante e formam um complexo antígeno-anticorpo, que é então ligado e internalizado por receptores Fc da imunoglobulina na membrana celular de leucócitos, especialmente macrófagos. Como o anticorpo é heterólogo, o vírus não é neutralizado, permanecendo livre para replicar dentro dos macrófagos. Acredita-se que essas células produzem e secretam mediadores vasoativos em resposta à infecção por DENV, o que provoca maior permeabilidade vascular, levando à hipovolemia e ao choque (Gubler, 1998).

A participação dos linfócitos T de memória ativados em uma infecção secundária com sorotipos heterólogos pode contribuir para o desenvolvimento da dengue grave com manifestações hemorrágicas em um modelo conhecido como teoria do pecado original de células T (*Original Antigenic Sin*) (Inouye et al., 1984). Durante uma infecção secundária, as células T entram em contato com macrófagos infectados e tornam-se ativadas. Os linfócitos T ativados apresentam uma resposta imune inapropriada para um sorotipo heterólogo, devido à expansão clonal de células T de memória de reatividade cruzada. Estas células possuem baixa afinidade para o sorotipo do vírus causador da infecção, produção alterada de citocinas e, conseqüentemente, tornam-se ineficientes para eliminar o vírus, aumentando assim a viremia e contribuindo para o desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue (FHD). A ativação imune excessiva cria uma cascata de produção de citocinas (produção excessiva ou perfil distorcido de liberação de citocinas) resultando em aumento da permeabilidade vascular: uma "tempestade de citocinas" (Rothman, 2011; Rathakrishnan et al., 2012). Foi demonstrado que, em muitos pacientes com infecção secundária heteróloga aguda pelo DENV, os linfócitos T CD8+ gerados ligam-se fracamente ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), os quais apresentam epítomos do vírus causador da infecção. Ao contrário, estes linfócitos ligam-se mais fortemente aos epítomos do vírus causador da primeira infecção, além de apresentarem um fenótipo apoptótico que parece destinar estas células à morte celular programada antes de exercerem sua função antiviral e controlarem a infecção (Clyde et al., 2006; Chaturvedi et al., 2006; Nielsen, 2009). Uma das conseqüências da infecção secundária e ativação de células T é a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Stephenson, 2005). A participação de linfócitos T, juntamente com a produção de citocinas e mediadores químicos, apresenta efeito sinérgico, o qual aumenta a permeabilidade vascular, a indução de

trombocitopenia e a ocorrência de hemorragia, contribuindo para o desenvolvimento da dengue grave (Martina et al., 2009).

A Teoria de Rosen ressalta o fato de existirem algumas cepas de vírus com maior potencial epidêmico, e pressupõe que o DENV, como todos os vírus que infectam animais, varia e se altera geneticamente como resultado de pressões de seleção enquanto se replica em seres humanos e/ou mosquitos (Rosen, 1977; Rico-Hesse, 1997). A expressão fenotípica de alterações genéticas no genoma do vírus pode incluir aumento da replicação do vírus e da viremia, gravidade da doença (virulência) e potencial epidêmico (Gubler, 1998).

Uma terceira teoria, a Teoria Integral de Multicausalidade, proposta por Kouri e colaboradores (1987), propõe que nenhuma das duas teorias anteriores, em conjunto ou isoladamente, pode explicar todas as situações ou casos de dengue grave, uma vez que os autores acreditam que é necessário haver a interação de fatores epidemiológicos, individuais e virais. Alguns fatores de risco individuais, como raça, sexo, idade e doenças crônicas, são fatores predisponentes que tornam a doença mais frequente em determinada faixa etária ou raça. Os autores acreditam que a pré-existência de anticorpos é o fator de risco individual principal, porém não o único, para a ocorrência da doença. Fatores de risco individuais determinam o surgimento da doença em um indivíduo particular e em uma determinada população. A presença ou ausência desses fatores de risco individuais, em meio aos fatores virais e epidemiológicos, determina se o indivíduo com infecção secundária vai desenvolver dengue grave (Kouri et al., 1987).

Dessa forma, a interação de vários fatores de risco, como fatores imunológicos do hospedeiro, a vários fatores virais, como infecções sequenciais e a virulência da cepa infectante, estão envolvidos na patogênese da forma grave da dengue (Gubler, 1998).

### **1.9.1 – Biomarcadores de gravidade da dengue**

Estudos acerca da patogenia da forma grave da dengue podem proporcionar novos alvos para a prevenção e o controle da doença. A identificação precoce da dengue grave em pacientes sem sinais de alerta que possam desenvolver a forma grave é muito importante. Esses pacientes precisam ter o melhor atendimento de apoio, uma vez que não existe terapia antiviral contra a infecção pelo DENV, e que a vacina comercial *Dengvaxia*, ainda não foi licenciada para imunização em todos os países endêmicos (John et al., 2015; Hladish et al., 2016; Recker et al., 2016). Entretanto, o mecanismo pelo qual apenas alguns indivíduos evoluem para a forma grave da dengue ainda é pouco compreendido.

Sabe-se que a minoria dos pacientes desenvolve a forma grave da dengue, cuja característica principal é o extravasamento plasmático, que leva à perda de volume intravascular e à insuficiência circulatória (Srikiatkachorn & Green, 2010). Manifestações hemorrágicas são comuns tanto na forma não-grave da dengue quanto na forma grave, porém hemorragias graves, particularmente a hemorragia do trato gastrointestinal, são encontradas com maior frequência na dengue grave (Nimmannitya, 1993).

As manifestações clínicas são os primeiros marcadores na previsão da forma grave da dengue: sangramento de mucosa, náusea e vômito, dor abdominal intensa, erupções cutâneas e hepatoesplenomegalia (Zhang et al., 2014; John et al., 2015). De acordo com a classificação de 2009, os pacientes com dengue estão divididos em um grupo, com sinais de alerta, incluindo dor abdominal, hemorragia de mucosa e hepatomegalia, que justificam a admissão na UTI, e em outro grupo, sem esses sinais (WHO/TDR, 2009; Zhang et al., 2014).

Devido à ausência de um modelo animal que possa reproduzir a dengue em seres humanos, alguns estudos clínicos têm sido fundamentais para o entendimento da patogênese da doença (Srikiatkachorn & Green, 2010). Inúmeros estudos têm buscado a identificação de parâmetros biológicos em amostras clínicas de casos graves e não-graves de dengue (Srikiatkachorn & Green, 2010). Estudos que procuram marcadores biológicos podem apontar preditores que identifiquem os casos que eventualmente evoluirão para a forma grave da dengue, o que é crucial, já que não há parâmetros clínicos ou laboratoriais empregados na rotina de diagnóstico que possam prever o desenvolvimento da dengue grave no indivíduo (Srikiatkachorn & Green, 2010).

Um biomarcador ideal deveria ser capaz de identificar indivíduos que possam vir a desenvolver dengue grave (John et al., 2015). Considera-se que o fator principal responsável pela patogenia da dengue ainda é a resposta imune aumentada do hospedeiro (citocinas produzidas de forma exacerbada pelas células imunes do hospedeiro) (John et al., 2015). Observou-se em vários estudos que as infecções sequenciais ou secundárias do DENV são mais propensas a produzir doença grave (Sangkawibha et al., 1984; Burke et al., 1988). Acredita-se que um fator de risco na infecção secundária seja o processo que envolve extravasamento plasmático, choque e manifestações hemorrágicas, iniciado com a facilitação da infecção pelo DENV com a ajuda de anticorpos opsonizantes, resultando na resposta imune alterada que desencadeia a ativação de células T e a liberação de citocinas e mediadores químicos (Pang et al., 2007; Nielsen, 2009). Entretanto, nos indivíduos imunocomprometidos ou com infecção primária, alguns fatores ainda não definidos podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da forma grave da dengue (Perng & Chokeyhaibulkit, 2013). Um exemplo é o fato de pacientes com dengue apresentarem febre e os demais sinais da forma não-grave

durante o pico da viremia, enquanto os sinais de gravidade, como as manifestações hemorrágicas e o choque, surgirem quando o DENV não está mais na circulação, sugerindo que a forma grave está mais associada à imunopatologia (John et al., 2015).

Para a gravidade da dengue, vários estudos clínicos indicaram a existência de marcadores clínicos e biológicos (durante a fase aguda, durante a fase de defervescência e durante a fase tardia). Considerando os marcadores clínicos, a contagem de plaquetas ( $<100.000/\text{mm}^3$ ) não pode ser considerada um marcador precoce para a gravidade da dengue. Existe um progressivo declínio do número de plaquetas durante a fase febril, tanto nos casos graves quanto nos casos não-graves, atingindo o limiar mais baixo no momento da defervescência em ambas as formas de gravidade, e coincidindo com o extravasamento plasmático em pacientes com dengue grave (Srikiatkachorn & Green, 2010). O aumento observado na quantificação das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST) é considerado um marcador precoce da gravidade da dengue (Srikiatkachorn & Green, 2010).

Considerando os marcadores biológicos durante a fase febril aguda, a carga viral aumentada, assim como níveis do antígeno NS1, em amostras biológicas foram descritos como fatores de risco para a dengue grave e podem ser empregados como indicadores precoces da gravidade da doença (Srikiatkachorn & Green, 2010). O pico da viremia ocorre precocemente no curso da doença, seguido por uma queda significativa nos títulos virais durante a defervescência (Vaughn et al., 2000; Libraty et al., 2002). O antígeno NS1 ativa o sistema complemento, e sua atividade é facilitada pela presença de anticorpos anti-DENV específicos (Avirutnan et al., 2006).

Para John e colaboradores (2015), os seguintes biomarcadores devem ser ressaltados como preditores da forma grave da dengue: marcadores de ativação imunológica, como o número e o estado de ativação das células imunes, níveis aumentados de citocinas e quimiocinas, o sistema complemento, anticorpos e outros fatores solúveis, assim como marcadores de ativação endotelial, marcadores bioquímicos e marcadores genéticos do hospedeiro.

Resumidamente, de acordo com Pang e colaboradores (2017), os mecanismos envolvidos na patogênese da dengue grave incluem a glicoproteína NS1 e os anticorpos anti-NS1, a variação do genoma viral, o RNA de flavivírus subgenômico (sfRNA), o fenômeno ADE e a presença de células T de memória que reagem cruzadamente. A NS1 e seus anticorpos anti-NS1 contribuem para a patogênese da dengue grave pela ativação do sistema complemento e subsequente indução da produção de citocinas inflamatórias, induzindo autofagia na célula endotelial, facilitando a replicação do DENV, induzindo desordens autoimunes. A variação do



genoma do DENV evolui para maior virulência e o sfRNA induz o aumento da replicação viral. O fenômeno ADE, mediado por FcγR, pode aumentar a replicação viral e desencadear liberação de citocinas e quimiocinas; células T específicas para DENV e ativadas por reação cruzada promovem a liberação de citocinas e quimiocinas (Pang et al, 2017).

### **1.10 – Classificação dos casos de dengue**

A OMS desenvolveu um sistema de classificação dos casos de dengue em 1997, segundo o qual as apresentações clínicas de dengue foram agrupadas como febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque por dengue (SCD). A FHD é dividida em 4 graus. Os graus I e II são classificados como FHD, e os graus III e IV são considerados SCD.

No entanto, alguns estudos mostraram que a aplicação deste sistema de classificação é um desafio nas áreas de endemia de dengue. O aparecimento de diferentes manifestações, como a dengue com hemorragia, mas sem extravasamento plasmático, ou dengue com choque, mas sem cumprir os 4 critérios da FHD (febre de 2-7 dias, tendência a hemorragia mostrada pela prova do laço positivo ou sangramento espontâneo, trombocitopenia  $\leq 100.000$  plaquetas/mm<sup>3</sup> e evidência de extravasamento plasmático), coloca dificuldades aos clínicos na aplicação do esquema de classificação de casos. Os principais problemas identificados foram a rigidez das definições, baixa sensibilidade e dificuldade experimentada por alguns clínicos para diferenciar FHD de FD, uma vez que os parâmetros laboratoriais clínicos e básicos se sobrepõem em alguns casos (Phuong et al., 2004; Hadinegoro, 2012).

Em 2009, a OMS revisou a classificação da dengue e um novo esquema foi proposto. Os casos de dengue passaram a ser classificados em dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave (WHO/TDR, 2009). A orientação revisada busca aprimorar a triagem e o tratamento adequado, uma vez que a identificação precoce dos sinais de alerta para o manejo clínico efetivo visa ao bom prognóstico do paciente, além de permitir a triagem correta dos casos (WHO/TDR, 2009; Narvaez et al., 2011; Horstick et al., 2012; Tsai et al., 2013; Guzmán & Harris, 2015).

Muitos estudos apontam o aumento da sensibilidade para identificação de casos graves com a classificação revisada (Narvaez et al., 2011; Tsai et al., 2013). Não obstante, alguns autores acreditam que o novo sistema poderia reduzir a ênfase quanto à síndrome do extravasamento plasmático, além de contribuir para o aumento do número de casos em países endêmicos e com poucos recursos (Srikiatkachorn et al., 2011).

O Brasil adotou a nova classificação de casos de dengue, revisada pela OMS, em 2014 (Brasil, 2015). Segundo a OMS, um caso provável de dengue, classificado como dengue sem

sinais de alerta, é caracterizado quando o paciente é residente ou viaja para área endêmica de dengue e apresenta febre e mais dois dos seguintes sinais ou sintomas: náusea, vômito, rash cutâneo, dores, prova do laço positiva e leucopenia (WHO/TDR, 2009). Deve haver a confirmação laboratorial da dengue, principalmente quando há sinal de extravasamento do plasma.

Os casos classificados como dengue com sinais de alerta requerem observação e intervenção médica. São sinais de alerta: dor abdominal, vômito persistente, derrame cavitário, sangramento de mucosa, letargia, inquietação, fígado aumentado (hepatomegalia), hematócrito elevado com simultânea plaquetopenia (WHO/TDR, 2009).

Já os casos classificados como dengue grave são aqueles em que verificam-se: 1) extravasamento grave de plasma, ocasionando choque (síndrome do choque por dengue) e derrame cavitário com dificuldade respiratória; 2) hemorragia grave (de acordo com a avaliação médica); 3) envolvimento de órgãos, com alteração das enzimas hepáticas ALT e AST; 4) envolvimento do SNC com o comprometimento da consciência, prejuízo da atividade do coração e outros órgãos (WHO/TDR, 2009) (Figura 1.6).



Figura 1.6-Critérios da nova classificação clínica de casos de dengue. Adaptado de OMS (2009).

### 1.11 – Diagnóstico laboratorial

As características de um teste diagnóstico “ideal” dependem da finalidade para a qual o teste será empregado. A janela mais indicada para diagnosticar infecção pelo DENV dá-se do

início da febre até 10 dias pós-infecção (Peeling et al., 2010). Contudo, os autores alertam que um teste diagnóstico ideal deve ser sensível independentemente do estágio da infecção, haja vista que nem todos os pacientes são diagnosticados dentro deste intervalo.

A confirmação laboratorial de infecção por DENV depende do isolamento do vírus em cultura celular, da identificação do ácido nucleico viral ou de antígenos, ou ainda da identificação de anticorpos específicos para o vírus (Vorndam & Kuno, 1997). A detecção direta do vírus permite a identificação precoce, definitiva e sorotipo-específica de infecções por DENV durante a fase aguda da doença. O vírus ou componentes virais (RNA ou antígenos) podem ser detectados no soro, plasma, sangue total e tecidos infectados de 0 a 7 dias após o início dos sintomas, correspondendo, aproximadamente, à duração da febre (Vorndam & Kuno, 1997).

Os testes mais comumente utilizados para diagnosticar infecções pelo DENV são os sorológicos, uma vez que são mais fáceis quanto ao manejo quando comparados com técnicas como cultura celular ou detecção de ácido nucleico. Dependendo do tipo de infecção, se primária (primeira infecção pelo DENV) ou secundária (infecção subsequente), são observados padrões diferentes de resposta de anticorpos. Em infecções primárias, a imunoglobulina M (IgM) é detectada a partir do quinto dia após o início da doença na maioria dos indivíduos infectados; e a imunoglobulina G (IgG) é detectada de 10 a 15 dias após o início da dengue (Vaughn et al., 2000). Em infecções secundárias, IgM aparece mais cedo ou ao mesmo tempo, mas geralmente com títulos mais baixos do que na infecção primária. Uma vez que a IgG está presente desde a infecção anterior, o título aumenta rapidamente. Na infecção primária, os títulos de anticorpos na inibição da hemaglutinação (HI) atingem um pico de 640, sendo que títulos a partir de 1280 são comuns em infecções secundárias (Vaughn et al., 2000).

Com o advento do aumento da incidência de dengue nos últimos anos, tornam-se ainda mais importantes as técnicas de diagnóstico rápido e de grande sensibilidade, bem como a detecção precoce das formas graves da dengue e o manejo clínico eficiente, principalmente onde a dengue é endêmica. Com os avanços recentes nas técnicas moleculares, uma vasta gama de testes diagnósticos está comercialmente disponível para melhorar tanto o manejo do caso, como também ajudar nos esforços para o controle da doença.

### 1.11.1 – Diagnóstico molecular

#### 1.11.1.a – Transcrição reversa e reação da cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A reação de transcrição reversa seguida da amplificação de segmentos de DNA pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) consiste em uma tecnologia relativamente simples, prática, rápida, sensível e específica.

Na transcrição reversa, o RNA é utilizado como molde pela enzima transcriptase reversa para a síntese de DNA complementar. A transcriptase reversa é uma enzima codificada a partir do material genético de retrovírus, que catalisa a transcrição de RNA (ácido ribonucleico) do retrovírus em DNA (ácido desoxirribonucleico). É uma polimerase de DNA dependente de RNA. Esta transcrição catalisada é o processo reverso da transcrição celular normal de DNA em RNA. A transcriptase reversa é central para a natureza infecciosa dos retrovírus, vários dos quais causam doenças em seres humanos, como o DENV. Todo vírus RNA deve ser submetido à ação da transcriptase reversa após purificação do RNA, antes da PCR.

Na reação em cadeia da polimerase em tempo real, o DNA complementar sintetizado será amplificado. A qRT-PCR permite a detecção de fragmentos de ácido nucleico em um grande número de amostras de fontes variadas (Bustin, 2000; Kubista et al., 2006; Bustin et al., 2009).

O emprego de uma sonda fluorescente permite a detecção dos produtos da reação em tempo real sem necessidade de eletroforese. Muitos ensaios de qRT-PCR têm sido desenvolvidos como *singleplex* (detecta um sorotipo por reação) ou *multiplex*. Os ensaios *multiplex* têm a vantagem de uma única reação ser utilizada para determinar todos os quatro sorotipos sem o potencial para introdução de contaminantes durante a manipulação da amostra, além de economizar tempo e recursos financeiros no diagnóstico laboratorial (Mackay et al., 2002; Johnson et al., 2005; Chien et al., 2006; Espy et al., 2006; Pang et al., 2014). A qRT-PCR é um dos métodos mais confiáveis para detectar e quantificar a carga viral em uma dada amostra (Vaughn et al., 2000; Santiago et al., 2013). Estudos de quantificação viral para DENV, realizados por alguns autores, evidenciaram uma correlação direta entre quantidade de partículas virais e gravidade da doença (Wang et al., 2003).

O monitoramento em tempo real do produto amplificado (*amplicon*) acumulado é possível pela marcação de sondas, iniciadores ou *amplicons* com moléculas fluorogênicas. Assim, o tempo mais curto para a realização da qRT-PCR dá-se em função do número reduzido de ciclos, da eliminação de procedimentos de detecção posteriores à PCR, da utilização de marcadores fluorogênicos e de métodos sensíveis de detecção das emissões de fluorescência (Wittwer et al., 1990; Mackay et al., 2002; Wittwer et al., 2013).

Os insumos (par de iniciadores, sondas e reagentes) são adicionados em um único tubo, ou seja, uma única mistura de reação, o que otimiza o tempo para ter o resultado. Além disso, economiza materiais e minimiza a possibilidade de contaminação, pelo fato de não ser necessário abrir o tubo para preparar o produto da PCR para a etapa seguinte, como acontece na RT-PCR convencional, quando da preparação para a *nested* (Nazarenko et al., 1997).

Além de ser mais sensível e específica, a qRT-PCR também é mais rápida (de Araújo et al., 2009), não apenas no formato *multiplex*, mas também no *singleplex*, de forma que os resultados são obtidos em até duas horas. Já a *nested* leva em torno de 10 horas ou mais para gerar resultados, uma vez que, após as etapas no termociclador, ainda é necessário realizar eletroforese no gel de agarose para visualização das bandas referentes ao produto da PCR (Johnson et al., 2005).

O diagnóstico precoce da dengue é obtido de forma mais eficiente somente durante a fase aguda da doença, ou seja, quando os níveis de viremia estão altos (0-5 dias após o início dos sintomas) e o RNA viral ou os antígenos solúveis (NS1, por exemplo) podem ser detectados (Lanciotti, 2003; Johnson et al., 2005; WHO/TDR, 2009; Low et al., 2011; Tricou et al., 2011). No entanto, vários ensaios de RT-PCR utilizando os sistemas em tempo real têm sido desenvolvidos para detecção precoce de DENV e identificação do sorotipo com alto nível de sensibilidade e especificidade (Johnson et al., 2005; Kong et al., 2006; Santiago et al., 2013; Ferraz et al., 2013).

### **1.11.2 – Diagnóstico sorológico**

As técnicas sorológicas são consideradas mais simples e de custo mais baixo quando comparadas à cultura *in vitro* e técnicas moleculares. Além disso, a sorologia permite o diagnóstico da dengue desde a fase aguda até a fase convalescente, e por esses motivos são os métodos de diagnóstico laboratorial frequentemente utilizados para detectar infecção por DENV (Guzmán et al., 2010a).

#### **1.11.2.a – Ensaio imunoenzimático para captura da imunoglobulina G (IgG)**

O padrão-ouro para confirmação sorológica de uma infecção por DENV é a soroconversão de anticorpos IgM e IgG (Guzmán et al., 2010a). A presença de IgM ou de altos níveis de IgG em soro de infecção aguda de um caso suspeito de dengue sugere provável infecção por DENV (PAHO, 1994; WHO/TDR, 2009). Ensaios de IgG dengue-específicos podem ser utilizados para a detecção de infecções anteriores e infecções em curso, se o soro for coletado dentro do intervalo correto que permita a demonstração da soroconversão entre

amostras de soro agudas e convalescentes (Peeling et al., 2010). Ensaios são geralmente realizados utilizando múltiplas diluições de cada soro testado para determinar um ponto de corte na titulação (Peeling et al., 2010). Ensaios de avidéz de IgG podem ser empregados para determinar se a infecção é primária ou secundária, baseando-se no princípio segundo o qual a avidéz de IgG é baixa após o primeiro desafio antigênico, porém aumenta vagarosamente dentro de semanas e meses após a infecção. Esses ensaios podem ser mais úteis do que a inibição da hemaglutinação para este propósito (Matheus et al., 2005; Peeling et al., 2010).

O ELISA para IgG clássico utilizado para detecção de infecção anterior de DENV utiliza antígenos específicos para DENV dos quatro sorotipos (DENV 1–4) para a captura de anticorpos anti-DENV IgG-específicos nas amostras de soro. A maioria dos antígenos utilizados neste ensaio são derivados das proteínas do envelope do vírus (Peeling et al., 2010). Uma limitação importante desse teste consiste na especificidade, haja vista a frequência significativa de reações cruzadas com outros flavivírus circulantes, especialmente quando os anticorpos são formados devido a uma infecção secundária, em que reagem cruzadamente com os outros sorotipos de DENV, ou outros flavivírus (Innis et al., 1989).

Este ensaio é comumente realizado com diluições múltiplas do soro testado para determinar um ponto de corte na diluição, correlacionando-se com o ensaio de hemaglutinação, muito utilizado previamente (Miagostovich et al., 1999). Quanto mais alta a diluição do ponto de corte, mais robusta é a resposta obtida depois da infecção.

#### **1.11.2.b – Ensaio imunoenzimático para pesquisa do antígeno NS1**

A detecção de antígenos virais na corrente sanguínea é um método simplificado para o diagnóstico da dengue durante a fase aguda da infecção, em comparação com o isolamento viral ou a detecção de ácidos nucleicos (Peeling et al., 2010). Avanços na pesquisa de ensaio imunoenzimático e ensaios imunocromatográficos, tendo como alvo a NS1, têm mostrado que altas concentrações de NS1 podem ser detectadas logo no primeiro dia depois do início da febre em pacientes com infecção primária ou secundária. A antigenemia começa a diminuir depois do quinto ou sexto dia, podendo ser detectada até nove dias após o início dos sintomas (Dussart et al., 2006).

Apesar da detecção de antígenos na fase aguda de infecções secundárias estar possivelmente comprometida pela pré-existência de imunocomplexos vírus-IgG, muitos estudos têm investigado a utilidade da detecção da sNS1 como uma ferramenta de diagnóstico durante a fase aguda da infecção por DENV (Peeling et al., 2010; Fry et al., 2011; Felix et al., 2012; Shen et al., 2017). Altos níveis de sNS1 foram encontrados no soro de pacientes

infectados por DENV durante infecções agudas (Libraty et al., 2002; Avirutnan et al., 2006; Hang et al., 2009). A literatura sugere que altos níveis de NS1 presentes no plasma poderiam ajudar a identificar pacientes com risco de extravasamento plasmático, uma vez que vários estudos apontam a correlação da sNS1 com o nível da viremia e a gravidade da dengue (Young et al., 2000; Libraty et al., 2002; Avirutnan et al., 2006). Entretanto, a importância da detecção de NS1 na predição da dengue grave ainda precisa ser avaliada (Thomas et al., 2010). Até o momento, ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual o antígeno sNS1 contribui para a patogênese (Watanabe et al., 2012).

### **1.11.2.c – Ensaio imunoenzimático para quantificação do antígeno NS1**

São muitos os desafios na busca de uma ferramenta de diagnóstico laboratorial ideal para a dengue. Os testes sorológicos são rotineiramente utilizados para confirmar infecções suspeitas de DENV, ainda que sejam menos específicos (Peeling et al., 2010). No entanto, a resposta imune produz imunoglobulinas apenas nos estágios mais tardios da infecção (Kao et al., 2005). Sendo assim, acredita-se que um teste diagnóstico com tecnologia que utilize um marcador biológico com capacidade para detecção sensível do DENV na fase aguda da doença, e de forma altamente específica, possa contribuir sobremaneira para o diagnóstico precoce da dengue (Antunes et al., 2015). Um dos marcadores biológicos conhecidos e bem estabelecidos é a NS1 liberada na circulação sanguínea em altas concentrações durante a replicação viral (Alcon et al., 2002). Os níveis de NS1 circulante em indivíduos infectados pelo DENV podem variar de acordo com a gravidade da doença, com o status imunológico (se a infecção é primária ou secundária) e de acordo com o sorotipo (Antunes et al., 2015).

Em função de tantos desafios, vários grupos de pesquisa têm proposto tecnologias bem sensíveis a partir de bio-sensores para a quantificação da NS1 (Linares et al., 2013; Hu et al., 2013; Silva et al., 2015; Figueiredo et al., 2015). No entanto, elas requerem estratégias de ensaio *multi-step* e não podem ser facilmente utilizadas para a detecção simultânea de múltiplos biomarcadores (Antunes et al., 2015).

Os ensaios imunocromatográficos são imunoenaios ditos rápidos (15–20 min), desenhados para proporcionar uma leitura não-quantitativa (Tricou et al., 2010). A literatura aponta que o sorotipo viral e o status da infecção dos pacientes podem limitar a sensibilidade e a confiabilidade destes testes (Duong et al., 2011). Além disso, a confirmação laboratorial precisa ser requerida com frequência (Hang et al., 2009). No entanto, outros estudos demonstraram que tão somente o tratamento térmico do soro é capaz de superar esses pontos

críticos (Lima et al., 2014). A associação dos atributos dos ensaios imunoenzimáticos com a capacidade de quantificar a NS1 em soros agudos parece vir ao encontro das demandas de populações endêmicas.

### **1.12 – Prevenção e controle**

Ainda não foi estabelecida uma vacina que proteja o indivíduo da infecção pelos 4 sorotipos do DENV de modo eficaz. O desenvolvimento de uma vacina tetravalente, suficiente para estimular resposta imune aos quatro sorotipos do DENV, tem sido dificultado por obstáculos na indução de uma resposta imune equilibrada (Guzmán & Harris, 2015). Além disso, inexistente medicação específica para tratar a infecção pelo DENV, bem como as medidas de controle vetorial têm falhado em reduzir a ocorrência de epidemias de dengue (WHO, 2012). Dessa forma, as medidas de prevenção mais eficientes são aquelas que evitam a picada do mosquito, principalmente em populações de áreas endêmicas.

Para a prevenção e o controle da dengue, a vigilância é um componente indispensável. Através da vigilância, é possível obter as informações necessárias para a avaliação de risco e orientação de um programa de controle da dengue, incluindo a resposta às epidemias e a avaliação desse programa (WHO, 2012).

Da mesma forma, para reduzir ou prevenir a transmissão do DENV é fundamental a atenção ao controle vetorial. Ainda que a maioria dos países endêmicos desenvolva essa prática em seus programas de controle e prevenção da dengue, o controle vetorial, através do manejo ambiental e do controle químico, costuma ser insuficiente com frequência (WHO/TDR, 2009; Guzmán et al., 2010a).

Uma iniciativa adotada pelos países das Américas, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), juntamente com a OMS, teve como objetivo a implementação do Programa Regional de Dengue nos países membros, através da Estratégia de Manejo Integrado para Prevenção e Controle da dengue nestes países (PAHO/WHO, 2014). O Programa Regional da Dengue visa reforçar a vigilância epidemiológica da dengue, fortalecer as redes de laboratórios na gestão de práticas eficazes no diagnóstico da doença, bem como realizar o monitoramento do vetor e da resistência a inseticidas. Além disso, o programa propõe o controle integrado de vetores, aprimoramento do manejo clínico dos pacientes, e por fim fortalecer a comunicação social para impactar comportamentos das populações que enfrentam o problema da dengue (PAHO/WHO, 2014).

O Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu, em 2009, diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. A iniciativa foi veiculada através de: 1) assistência aos pacientes suspeitos da doença, uma vez que a qualidade da assistência prestada



e da organização da rede de serviços de saúde são fundamentais para evitar a maioria dos óbitos por dengue; 2) vigilância epidemiológica; 3) controle vetorial, com a implementação de uma política que visa à intersectorialidade, cooptando e responsabilizando os gestores e a sociedade; e 4) comunicação por meio do desenvolvimento das práticas educativas no SUS, objetivando fomentar a mobilização da sociedade organizada consciente e voluntariamente.

### **1.12.1 – Vacinas em desenvolvimento contra o DENV**

As dificuldades no desenvolvimento de uma vacina anti-DENV decorrem da interação entre os quatro sorotipos que causam infecções (Rey, 2013). A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos induz imunidade a este sorotipo infectante e não aos demais (Rey, 2013). Ainda que alguns dos anticorpos produzidos durante esta resposta cruzem sorologicamente e possam neutralizar os outros sorotipos a um certo ponto, eles não medeiam proteção cruzada a longo prazo (Rey, 2013).

Para ser bem-sucedida, é necessário o desenvolvimento de uma vacina que proteja contra todos os sorotipos simultaneamente e que haja a indução de resposta imune balanceada (Rey, 2013; Guzmán & Harris, 2015). Para isso, é preciso conhecer, em nível estrutural, os epítomos antigênicos do vírus, os quais são alvo de anticorpos protetores (Rey, 2013). A identificação dos epítomos na proteína E parece ser fundamental para o desenvolvimento da vacina contra o DENV, haja vista que esses epítomos são alvo de anticorpos potentes e amplamente neutralizantes, capazes de neutralizar os quatro sorotipos simultaneamente (Cockburn et al., 2012).

A vacina pioneira desenvolvida pela Sanofi Pasteur, Dengvaxia<sup>®</sup>, mostrou ser eficaz em casos sintomáticos e confirmados de dengue durante a fase de vigilância ativa (até 25 meses após a primeira dose) de dois estudos de fase III em 10 países distribuídos na Ásia (Indonésia, Malásia, Filipinas, Tailândia, Vietnã) e na América Latina (Brasil, Colômbia, Honduras, México e Porto Rico) (Capeding et al., 2014; Villar et al., 2015). Caracteriza-se por ser uma vacina quimérica constituída por uma partícula infecciosa não-viva de DENV, atenuada, tetravalente, baseada na vacina 17D licenciada da febre amarela com genes estruturais de cada sorotipo de DENV (CYD-TDV) (Chambers et al., 1999). México, Brasil, Filipinas, El Salvador e Costa Rica aprovaram o uso da CYD-TDV para indivíduos de 9 a 45 anos que vivem em áreas endêmicas, uma vez que houve redução de metade das hospitalizações por infecção pelo DENV entre indivíduos vacinados, com 9 anos de idade ou mais, no terceiro ano após a primeira dose. Contudo, na avaliação da Fase III, Dengvaxia apresentou baixa eficácia em indivíduos que nunca tiveram contato com DENV, além de ter sido observado aumento da gravidade em 58%

nos indivíduos com menos de 9 anos de idade (Coudeville et al., 2016; Khetarpal & Khanna, 2016; Sanofi Pasteur Media Release, 2016).

Houve também uma candidata a princípio promissora, composta por quatro vacinas, cada uma tendo um sorotipo diferente como alvo, que foi avaliada por um grande estudo vacinal, foi considerada segura e conferiu proteção contra os sorotipos 1, 3 e 4 (Balsitis et al., 2010). No entanto, a vacina em teste não foi capaz de proteger contra o sorotipo 2, mesmo induzindo anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos (Sabchareon et al., 2012). Contudo, há que se considerar que o ensaio de neutralização utilizado como método imunológico neste estudo pode não ter sido suficientemente preditivo acerca da ocorrência da infecção pelo DENV, já que os títulos aumentados de anticorpos neutralizantes podem ter sido insuficientes para proteger contra a cepa epidêmica de DENV-2 em particular (Guzmán & Harris, 2015).

Outras vacinas de vírus atenuado e vírus inativado, de proteínas recombinantes e vacinas de DNA estão em desenvolvimento.

Dessa forma, evidencia-se a complexidade para o desenvolvimento de uma vacina capaz de induzir a produção de anticorpos que gerem proteção duradoura, ao mesmo tempo em que é imprescindível evitar um estado pós-vacinal com potencial para estimular o sistema imune a ponto de levar ao agravamento da infecção (Rey, 2013).

### **1.12.2 – Controle vetorial**

O mosquito *Aedes* é uma preocupação crescente em saúde pública e seu controle ou erradicação é urgente (Reis et al., 2017). Os métodos de controle disponíveis ou em desenvolvimento podem ser divididos em cinco categorias: 1) controle dos locais de reprodução ambiental; 2) armadilhas mecânicas; 3) técnica de redução da fertilidade dos insetos; 4) inseticidas; e 5) inseto transgênico (Baldacchino et al., 2015).

A redução de locais de reprodução de vetores no meio ambiente tem como objetivo o controle do local de reprodução em água parada. As ações permanentes diminuem o foco de reprodução. A educação e a participação da população são necessárias. Para combater o vetor em estágios iniciais, medidas preventivas contínuas e visitas a todos os pontos de risco são fundamentais (COSEMS/SP, 2012).

Existem diferentes tipos de armadilhas mecânicas, que podem aprisionar tanto os insetos, quanto os ovos ou as larvas.

Para a redução da fertilidade dos insetos, podem ser utilizadas duas estratégias biológicas de controle vetorial: a técnica relacionada com a *Wolbachia* e a produção de insetos

estéreis pela radiação (Reis et al., 2017). Quando os mosquitos *Aedes* são infectados pela *Wolbachia*, a replicação viral e a disseminação do DENV são inibidas. O bloqueio completo da transmissão do DENV acontece no 14º dia de infecção (Bian et al., 2010). Na segunda estratégia, os machos produzidos em laboratório são expostos a baixa radiação e esterilizados, mantendo a capacidade de copulação. O inseto feito com fertilidade prejudicada é lançado no ambiente para acasalar com insetos selvagens e produzir ovos estéreis, eliminando então a próxima geração (Atyame et al., 2016).

O uso de inseticidas, com diferentes métodos de aplicação de pesticidas, objetiva a eliminação do vetor alado ou das larvas.

Os insetos transgênicos possuem um alelo letal dominante capaz de matar gerações subsequentes de *Aedes* (Hoang et al., 2016). Os mosquitos designados OX513A são machos e receberam dois genes. O primeiro gene funciona como um sistema de ativação construído a partir de um DNA sintético de *Escherichia coli* e vírus do herpes. Esse gene tem como objetivo encurtar a vida do inseto e levar à extinção dessa espécie em uma região. Isso ocorre quando os machos modificados se acasalam com fêmeas selvagens do ambiente, produzindo descendentes que não sobreviverão até o estágio adulto devido ao gene letal. O segundo é um gene de coral marinho de *Discosoma*, que funciona como um marcador fluorescente, de modo que os mosquitos têm uma luminosidade diferente em comparação com os selvagens, possibilitando a detecção de sua presença por exposição especial à luz (Wentzel, 2015).

Um dos temas discutidos na reunião da OMS sobre os desafios apresentados por esta doença emergente foi que "não há provas de que quaisquer intervenções recentes de controle de vetores, incluindo pulverização maciça de inseticidas, tenham tido algum efeito significativo na transmissão da dengue" (Haug et al., 2016).

Atualmente, a maioria das estratégias disponíveis são baseadas na participação intensiva da população (Carvalho et al., 2017). Um estudo de metanálise mostrou que o controle do *Ae. aegypti* está significativamente associado com o tipo de estratégia empregada (Lima et al., 2015). Além disso, o método de controle mais efetivo para o estudo foi a abordagem integrada, considerando os determinantes eco-bio-sociais na cadeia epidemiológica vírus-vetor-ser humano, e o envolvimento da comunidade, a partir do empoderamento dos membros da comunidade como agentes ativos para o controle vetorial (Lima et al., 2015). Enquanto nenhuma outra medida efetiva estiver disponível (seja uma vacina para proteger as pessoas ou a liberação de algum mosquito modificado), a participação da comunidade é extremamente importante para o controle das populações de *Ae. aegypti* (Carvalho et al., 2017).

## 2 – JUSTIFICATIVA

Muitos estudos têm explorado os fatores de risco que podem predizer a evolução da dengue para a forma grave (Vaughn et al., 2000; Wichmann et al., 2004; Endy et al., 2004; Hammond et al., 2005).

Inúmeros fatores de risco individuais têm sido implicados como potenciais marcadores para a gravidade da dengue, como a idade, o sexo, a resposta imune do indivíduo relacionada à infecção anterior por sorotipo heterólogo do DENV, comorbidades, a genética da população infectada, carga viral, e níveis de NS1 circulantes, além de vários fatores virais, como diferentes sorotipos e as citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta ao vírus.

A maior parte da literatura atual remete-se aos casos de dengue ocorridos no sudeste da Ásia, onde DENV tem circulado há mais tempo do que no Brasil (Rocha et al., 2017). Os diferentes cenários epidemiológicos relacionados à circulação do DENV e à condição imunológica da população em muitas regiões endêmicas propiciam uma grande oportunidade para o desenvolvimento de estudos no continente americano, especialmente neste país.

Além disso, o diagnóstico clínico durante a fase aguda não é preciso, considerando que a dengue apresenta características similares a outras doenças febris e, dessa forma, o diagnóstico laboratorial tem sido uma ferramenta importante para a vigilância epidemiológica e para o manejo clínico do paciente.

A inexistência de um tratamento antiviral específico contra o DENV e de uma vacina disponibilizada para uso universal, aliada à grave situação epidemiológica no Brasil, com a ocorrência de epidemias de grande magnitude, como a de 2015 e de 2016, com cerca de 1.688.688 e 1.500.535 notificações respectivamente, reforçam a necessidade e a urgência na busca por marcadores de gravidade da dengue. A co-circulação dos quatro sorotipos de DENV, bem como de genótipos mais virulentos, levam à ocorrência de formas graves e fatais no Brasil, ratificando a importância da busca por marcadores que viabilizem a identificação precoce de pacientes que podem evoluir para a forma grave da doença, bem como o tratamento imediato de suporte para a prevenção da evolução para esse quadro clínico.

### **3 – OBJETIVOS**

**3.1 – OBJETIVO GERAL:** Buscar um marcador precoce de gravidade em casos de dengue no estado do Rio de Janeiro de 1986 a 2012.

#### **3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- (1) Classificar a resposta imune dos casos de dengue no Rio de Janeiro de 1986 a 2012 em infecções primárias e secundárias;
- (2) Realizar a quantificação da antigenemia da NS1 em amostras de soros de casos de dengue;
- (3) Realizar a quantificação da viremia em amostras agudas dos casos de dengue;
- (4) Associar as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, viremia, antigenemia da NS1, sorotipo infectante e dias de doença à apresentação clínica da dengue “sem sinais de alerta” e “com sinais de alerta/dengue grave”;
- (5) Associar as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, viremia, sorotipo infectante e dias de doença aos níveis da NS1 circulante nos pacientes;
- (6) Associar as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, antigenemia da NS1, sorotipo infectante e dias de doença aos níveis de viremia nos pacientes;
- (7) Associar as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença à apresentação clínica da dengue “sem sinais de alerta” e “com sinais de alerta/dengue grave”, e à viremia, em pacientes infectados pela linhagem I ou II do DENV-2.

#### **4 – CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

As amostras de soro utilizadas neste estudo foram provenientes da demanda espontânea do Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência Regional para Dengue e Febre Amarela, armazenados a -70°C, sem qualquer procedimento adicional para o paciente. O estudo encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 274/05) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, de acordo com a resolução CSN 466/12.

## **5 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 – DESENHO DO ESTUDO**

Trata-se de um estudo retrospectivo observacional avaliando fatores virais, imunológicos e demográficos, e a relação com a dinâmica da doença durante a fase aguda, em uma população exposta aos quatro sorotipos (DENV-1-4) ao longo de 27 anos de epidemias no estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre abril de 1986 e dezembro de 2012. O presente trabalho foi dividido em 3 estudos.

O estudo 1 compreende a análise de possíveis associações entre os desfechos apresentação clínica dos pacientes infectados pelo DENV, antigenemia da glicoproteína NS1 e viremia, e as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença, sorotipo, antigenemia da NS1 e viremia em 262 amostras únicas dos pacientes.

O estudo 2 compreende a análise supracitada avaliando o comportamento de cada um dos quatro sorotipos do DENV, sendo 64 amostras de DENV-1, 63 amostras de DENV-2, 68 amostras de DENV-3 e 67 amostras de DENV-4.

E o estudo 3 compara o comportamento da linhagem I (63 amostras analisadas nos estudos 1 e 2) e da linhagem II (66 amostras) do DENV-2 diante da apresentação clínica dos pacientes e da viremia em relação às variáveis sexo, faixa etária, resposta imune e número de dias de doença. Entre 2007 e 2009, houve um deslocamento da faixa etária dos casos graves para menores de 15 anos, que ocorreu com a emergência do DENV-2 e coincidiu com a detecção da linhagem II do DENV-2. A introdução da linhagem II do DENV-2 teve um grande impacto epidemiológico, com uma epidemia de grande magnitude, muitos casos de dengue grave, levando ao óbito um número elevado de crianças, além de ser o único sorotipo a apresentar intervalos bem definidos de circulação das suas linhagens ao longo do período do estudo.

O termo “resposta imune” utilizado no presente trabalho se refere ao tipo de infecção: se primária (primeira infecção do paciente por um flavivírus) ou se secundária (nova infecção, paciente já teve infecção prévia por flavivírus).

## 5.2 – AMOSTRAGEM

### 5.2.1 – Origem das amostras dos pacientes e das fichas epidemiológicas

As amostras dos pacientes e respectivas fichas epidemiológicas foram recebidas pelo Laboratório de Flavivírus sob demanda espontânea. O presente trabalho foi realizado com amostras de conveniência.

A figura 5.1 explica a procedência dos casos estudados.

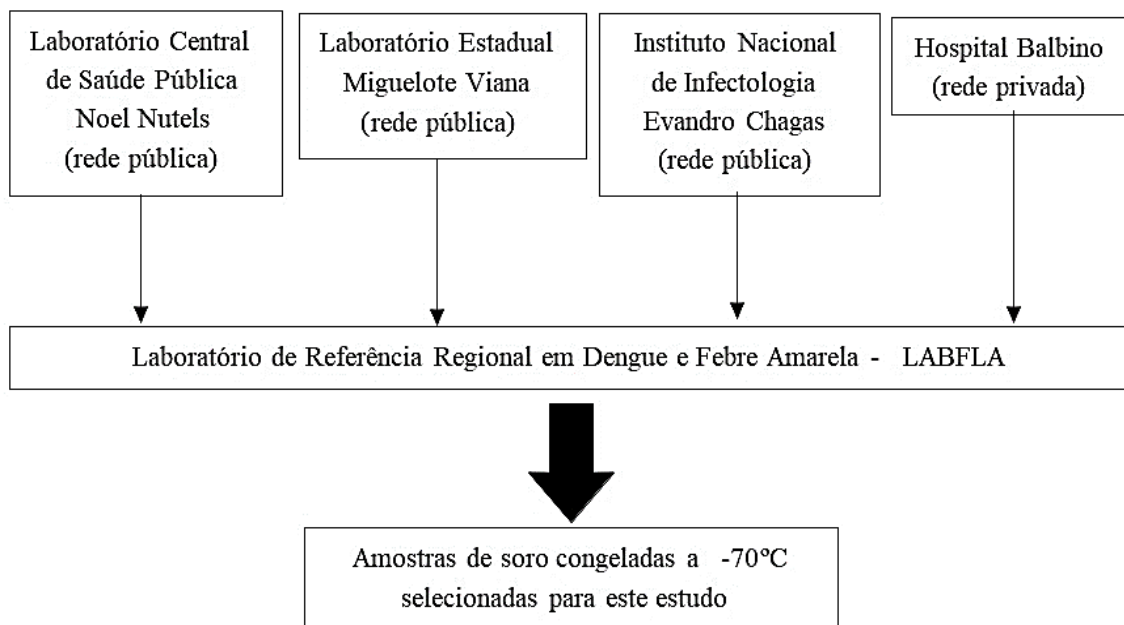


Figura 5.1-Fluxo de recebimento das amostras de soro e respectivas fichas epidemiológicas dos pacientes selecionados para este estudo.

Realizou-se uma primeira busca no banco de dados do Laboratório de Flavivírus, utilizando como critério: 1) a localidade (pacientes viviam no estado do Rio de Janeiro, e não tinham histórico de viagem imediatamente anterior à manifestação dos sinais e sintomas da dengue); 2) número de dias de doença anotado na ficha epidemiológica (0 a 5 dias de doença); e 3) amostras confirmadas previamente por isolamento viral e/ou RT-PCR convencional. A partir dessa primeira triagem, foram selecionadas 2.651 amostras, sendo 1250 amostras de DENV-1, 276 amostras de DENV-2 linhagem I, 363 amostras de DENV-2 linhagem II, 367 amostras de DENV-3 e 395 amostras de DENV-4.

Procedeu-se a busca pelas amostras dos respectivos pacientes nos freezers a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Foram encontradas 678 amostras com volume suficiente, sendo 244 amostras de DENV-1, 204 amostras de DENV-2 linhagem I, 120 amostras de DENV-3 e 110 amostras de DENV-4. A informação



quanto ao número de amostras de DENV-2 linhagem II encontradas nos freezers e com volume suficiente não foi obtida.

Em seguida, procedeu-se à busca pelas fichas epidemiológicas dos respectivos pacientes. Quanto à infecção pelo DENV-1, do total de 244 pacientes, 27 não apresentavam ficha epidemiológica; seis pacientes apresentavam ficha epidemiológica, porém sem anotação de sinais e sintomas; e 211 pacientes apresentavam ficha epidemiológica com informação sobre sinais e sintomas.

Em relação à infecção pelo DENV-2 linhagem I, do total de 204 pacientes, quatro não apresentavam ficha epidemiológica; cinco pacientes apresentavam ficha epidemiológica, porém sem anotação de sinais e sintomas; e 195 pacientes apresentavam ficha epidemiológica com informação sobre sinais e sintomas.

A partir de 2000, foi possível fazer a busca pelas informações quanto a sinais e sintomas através do banco de dados do laboratório, sem a necessidade de recorrer às fichas epidemiológicas originais do setor de arquivo, em um primeiro momento. Sendo assim, não foram obtidas as informações quanto ao número de pacientes sem ficha epidemiológica e quanto ao número de pacientes com ficha epidemiológica, porém sem anotação referente a sinais e sintomas.

Em relação à infecção pelo DENV-3, do total de 120 pacientes, 85 apresentavam ficha epidemiológica com informação sobre sinais e sintomas.

Quanto à infecção pelo DENV-2 linhagem II, o número de fichas epidemiológicas com informação quanto a sinais e sintomas não foi obtida.

No que se refere à infecção pelo DENV-4, do total de 110 pacientes, 67 pacientes apresentavam ficha epidemiológica com informação sobre sinais e sintomas.

As fichas epidemiológicas originais de todos os pacientes foram analisadas para confirmação dos dados informados.

A etapa seguinte foi a análise dos dados quanto aos sinais e sintomas descritos nas fichas epidemiológicas, com o assessoramento de um médico clínico para a triagem dos pacientes nos grupos DSSA e DCSA/DG. Após mais esta triagem, foram selecionados 64 pacientes com DENV-1, 63 pacientes com DENV-2 linhagem I, 66 pacientes com DENV-2 linhagem II, 68 pacientes com DENV-3 e 67 pacientes com DENV-4, totalizando 328 amostras (Figura 5.2).

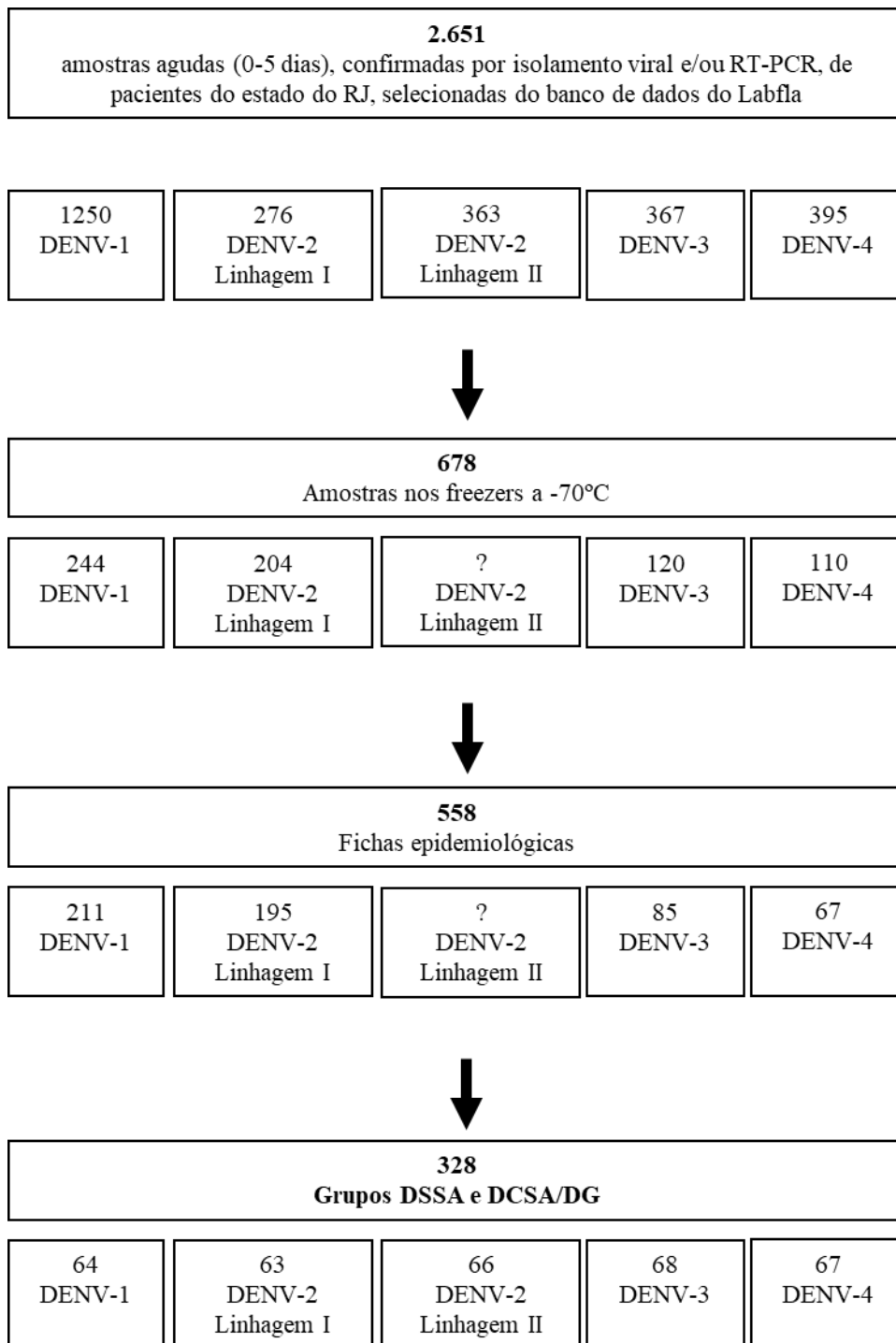


Figura 5.2-Número de amostras selecionadas e perdidas ao longo das triagens do estudo

Os dados clínico-epidemiológicos para análise foram obtidos através das fichas epidemiológicas. Uma vez que um dos alvos de pesquisa do nosso estudo é o período de introdução e circulação de cada um dos 4 sorotipos no estado do Rio de Janeiro, bem como das linhagens I e II de DENV-2, priorizaram-se as amostras coletadas no ano de introdução, e no ano seguinte, de cada sorotipo e da linhagem II do DENV-2. Contudo, foi necessário estender por mais alguns anos o período em que as amostras foram coletadas devido à quantidade insuficiente

de amostras elegíveis e fichas epidemiológicas correlatas no período de interesse para os estudos. No total, o estudo 1 compreendeu a análise de 262 amostras, referentes a 262 pacientes infectados por DENV (Quadro A).

	<b>Ano de coleta de sangue</b>	<b>Número de pacientes</b>
<b>Estudo 1</b>	1986	1
	1987	51
	1990	48
	1991	8
	1996	4
	2000	2
	2001	46
	2002	23
	2003	12
	2011	8
	2012	59
<b>Total</b>		<b>262</b>

Quadro A-Ano de coleta das amostras do estudo 1 e respectivo número de pacientes por ano de coleta.

O estudo 2 compreendeu a análise das mesmas 262 amostras do estudo 1, referentes aos mesmos 262 pacientes. Contudo, no estudo 2, observou-se a particularização das amostras por sorotipo de DENV, sendo 64 amostras de DENV-1, 63 amostras de DENV-2, 67 amostras de DENV-3 e 68 amostras de DENV-4 (Quadro B).

	<b>Sorotipo infectante</b>	<b>Ano de coleta de sangue</b>	<b>Número de pacientes</b>	
<b>Estudo 2</b>	<b>DENV-1</b>	1986	1	
		1987	51	
		1990	8	
		1996	4	
		<b>Total</b>		<b>64</b>
	<b>DENV-2</b>	1990	40	
		1991	8	
		2000	1	
		2001	14	
		<b>Total</b>		<b>63</b>
	<b>DENV-3</b>	2000	1	
		2001	32	
		2002	23	
		2003	12	
<b>Total</b>			<b>68</b>	
<b>DENV-4</b>	2011	8		
	2012	59		
	<b>Total</b>		<b>67</b>	
<b>Total</b>			<b>262</b>	

Quadro B- Ano de coleta das amostras do estudo 2 e respectivo número de pacientes por ano de coleta.

Paralelamente, 66 amostras da linhagem II do DENV-2 foram selecionadas objetivando estudar o comportamento das linhagens I e II do DENV-2 quanto à gravidade e à viremia. Todas as amostras de DENV-2 utilizadas no presente trabalho foram previamente sequenciadas por Nunes e colaboradores (2016).

Entre 2007 e 2009, houve um deslocamento da faixa etária dos casos graves para menores de 15 anos, que ocorreu com a emergência do DENV-2 e coincidiu com a detecção da linhagem II do DENV-2. A introdução da linhagem II do DENV-2 teve um grande impacto epidemiológico, com uma epidemia de grande magnitude, muitos casos de dengue grave, levando ao óbito um número elevado de crianças, além de ser o único sorotipo a apresentar intervalos bem definidos de circulação das suas linhagens ao longo do período do estudo, compreendido entre 1986 e 2012.

O estudo 3 compreendeu 63 amostras de pacientes infectados pela linhagem I do DENV-2, analisadas nos estudos 1 e 2, e 66 pacientes infectados pela linhagem II do DENV-2 (Quadro C).

	<b>Sorotipo infectante</b>	<b>Ano de coleta de sangue</b>	<b>Número de pacientes</b>
<b>Estudo 3</b>	<b>DENV-2 linhagem I</b>	1990	40
		1991	8
		2000	1
		2001	14
		<b>Total</b>	<b>63</b>
	<b>DENV-2 linhagem II</b>	2007	2
		2008	5
		2009	1
		2010	38
		2011	20
	<b>Total</b>	<b>66</b>	
<b>Total</b>		<b>129</b>	

Quadro C- Ano de coleta das amostras do estudo 3 e respectivo número de pacientes por ano de coleta.

**Critérios de elegibilidade:** pacientes com 0 a 5 dias de doença, infectados no estado do Rio de Janeiro, por DENV-1 (a partir de 1986), pela linhagem I do DENV-2 (a partir de 1990), pela linhagem II do DENV-2 (a partir de 2007), por DENV-3 (a partir de 2000) ou por DENV-4 (a partir de 2011), com diagnóstico confirmado como dengue por RT-PCR e/ou isolamento viral, cujas amostras estivessem em volume suficiente para realização das técnicas laboratoriais do estudo e armazenadas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , incluídos os casos fatais.

**Critérios de exclusão:** (i) fichas epidemiológicas incompletas (sem nome, ou sem sinais ou sintomas que possibilitassem a classificação em um dos dois grupos do estudo), (ii) pacientes com histórico de viagem imediatamente anterior à manifestação de sinais ou sintomas de dengue.

### **5.2.2 – Estratificação da idade dos pacientes por faixa etária**

Para os estudos 1, 2 e 3, a idade dos pacientes foi estratificada em cinco faixas: pacientes com idade menor ou igual a 12 anos (crianças), de 13 a 19 anos (jovens), de 20 a 59 anos (adultos) e com idade igual ou superior a 60 anos (idosos). Essa estratificação tentou distribuir o número de pacientes uniformemente e, ao mesmo tempo, seguiu o padrão de estratificação etária encontrada em outros estudos epidemiológicos. A faixa de 20 a 59 anos concentrou maior número de pacientes que as demais faixas etárias. No entanto, após termos realizado análises com grupos de 20 a 29 anos, 30 a 39 anos, 40 a 49 anos e 50 a 59 anos, observamos que não havia diferença significativa quanto a mudanças no perfil epidemiológico da doença ou para as variáveis estudadas. Por este motivo, a população foi agrupada em crianças, jovens, adultos e idosos conforme descrito em estudos anteriores (Rodrigues et al., 2005; Oliveira et al., 2009; Vicente et al., 2016).

### **5.2.3 – Estratificação do número de dias de doença**

Nos estudos 1, 2 e 3, o número de dias de doença variou de 0 a 5, sendo 0 o dia em que a febre teve início. A variação de dias de doença foi distribuída nos estratos 0-1, 2-3 e 4-5, visando ter um número amostral significativo em cada categoria.

### **5.2.4 – Nova classificação dos casos de dengue quanto à gravidade**

A classificação clínica dos pacientes baseou-se nos critérios da OMS (2009), que visa direcionar o manejo do tratamento do paciente de acordo com uma escala de gravidade. Sendo assim, tomando por base a classificação de casos de dengue pela OMS e as informações contidas nas fichas epidemiológicas que acompanhavam as amostras, dividiram-se os casos previamente confirmados como dengue por isolamento viral e/ou RT-PCR em: (a) dengue sem sinais de alerta e (b) dengue com sinais de alerta/dengue grave.

Os pacientes classificados como casos de dengue sem sinais de alerta (DSSA) apresentavam febre e dois ou mais dos seguintes sinais e/ou sintomas: dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, prostração, náusea, vômito, erupção cutânea, diarreia, anorexia e prurido. Os pacientes classificados como casos de dengue com sinais de alerta/dengue grave (DCSA/DG) apresentavam um ou mais dos seguintes sinais e/ou sintomas: choque, dor abdominal, hemorragia grave, comprometimento grave de órgãos, sangramento de mucosa (nariz, boca, gengiva, laringe, traqueia, brônquios, pulmões, orofaringe).

Os casos de DCSA e DG foram agrupados em uma mesma categoria no presente trabalho. Dado que não foi possível acompanhar a evolução da doença nos pacientes estudados, ou ter acesso a essa informação, por tratar-se de um estudo retrospectivo ao longo de 27 anos, é possível que pacientes inicialmente classificados como DCSA tenham evoluído para DG.

### 5.3 – SOROLOGIA

#### 5.3.1 – Teste imunoenzimático para pesquisa de IgG

Considerando que o tipo de resposta pode influenciar no desfecho da manifestação clínica, os casos de dengue estudados foram classificados em resposta imune primária e secundária.

Para tal, o ensaio imunoenzimático “*in house*” foi utilizado para detecção de anticorpos da classe IgG anti-DENV (IgG-ELISA), conforme descrito por Miagostovich e colaboradores (1999). A técnica supracitada foi selecionada, uma vez que os títulos de IgG ELISA podem ser associados, de forma confiável, a infecções primárias ou secundárias, quando analisados por dias após o início dos sintomas, além de já estar implementada na rotina de diagnóstico do Laboratório de Flavivírus.

Para a classificação da resposta imune, considera-se que títulos de IgG menores que 160 em amostras com menos de 5 dias de doença, títulos de IgG menores que 10240 em amostras com 6 a 9 dias de doença, e títulos de IgG menores que 40960 em amostras com mais de 10 dias de doença indicam resposta imune primária. Enquanto títulos de IgG maiores ou iguais a 160 em amostras com menos de 5 dias de doença, títulos de IgG maiores ou iguais a 10240 em amostras com 6 a 9 dias de doença, e títulos de IgG maiores que 40960 em amostras com mais de 10 dias de doença indicam resposta imune secundária (Tabela 5.1).

Tabela 5.1-Títulos de IgG e número de dias após o início dos sintomas para classificação da resposta imune

	Nº dias após o início dos sintomas			Resposta imune
	< 5 dias	6-9 dias	> 10 dias	
Títulos de IgG	< 160	< 10240	< 40960	Primária
	≥ 160	≥ 10240	> 40960	Secundária

Fonte: Miagostovich e colaboradores (1999).

No presente trabalho, títulos de IgG menores que 160 indicaram resposta imune primária, enquanto títulos de IgG maiores ou iguais a 160 indicaram resposta imune secundária, uma vez que as amostras variaram de 0 a 5 dias de doença.

### **5.3.2 – Pesquisa do antígeno NS1**

O teste imunoenzimático Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) foi utilizado para detecção do antígeno NS1, em função de ser um ensaio de ELISA de captura de antígeno para detecção da glicoproteína NS1 da dengue que permite um diagnóstico precoce de infecções agudas, primárias e secundárias, com alta especificidade.

A realização do teste foi precedida pelo tratamento térmico das amostras de DENV-4 para dissociação de imunocomplexos antígeno NS1-anticorpo e, a posteriori, a quantificação dos títulos de NS1 presentes nas amostras (antigenemia) teve início.

#### **5.3.2.1 – Dissociação do imunocomplexo antígeno NS1- anticorpo (Ag-Ac)**

Devido à possibilidade de resultados falso negativos pela produção de imunocomplexos formados pelo antígeno NS1 e os anticorpos anti-NS1 descritos na literatura em casos de infecção por DENV-4, todas as amostras de DENV-4 do presente trabalho foram submetidas a tratamento térmico de forma a promover a dissociação do imunocomplexo (Lima et al., 2014).

Brevemente, 50µl do soro foram adicionados a 100µl de água livre de RNA/DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); os tubos foram imersos em água fervente (100°C) por 5 minutos. O método utilizado foi descrito anteriormente por Schüpbach e colaboradores (1996), e modificado por Lima e colaboradores (2014).

#### **5.3.2.2 – Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France)**

O teste Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA consiste em um imunoensaio enzimático de microplaca *one-step* formato sanduíche para detecção qualitativa e semiquantitativa do antígeno NS1 no soro ou plasma humanos. Foi utilizado de acordo com o ensaio imunoenzimático de microplaca para detectar o antígeno NS1 do DENV em soro humano. Os poços da microplaca são revestidos com anticorpos monoclonais anti-NS1 purificados de camundongo (MAb) para captura e revelação.

Brevemente, reagentes e amostras foram deixados em temperatura ambiente para aquecer. Foram distribuídos 50µl de diluente de amostra em todos os orifícios da placa já sensibilizada com anticorpos anti-NS1 não-específicos e purificados de camundongo. Em seguida, 50µl dos controles e das amostras foram adicionados em cada orifício respectivo, respeitando o protocolo. Após a adição de 100µl de conjugado em cada orifício, a placa foi

coberta e incubada por 90 minutos a 37°C. Utilizando o tampão de lavagem fornecido com o kit, a placa foi lavada seis vezes, recebendo, em seguida, 160µl de substrato em cada orifício. Coberta e protegida da luz, a placa foi incubada em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente. Se o antígeno NS1 estivesse presente na amostra, o imunocomplexo MAb-NS1-MAb/peroxidase se formaria. A presença de imunocomplexos foi demonstrada pelo desenvolvimento de coloração azulada pela reação utilizando 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina como substrato. A reação com o desenvolvimento de cor foi parada pela adição de 100µl de NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

A densidade ótica (DO) foi determinada através da leitura por meio de um espectrofotômetro com um filtro de comprimento de onda de 450 a 620nm. Os controles negativo e positivo, e o calibrador, fornecidos com o kit, foram utilizados em todas as placas para validação do ensaio. O título de NS1 referente à quantidade da proteína não-estrutural 1 presente em cada amostra foi determinado por meio da comparação da DO da amostra com a DO do ponto de corte dos soros controles. O valor do ponto de corte correspondeu à média do valor das DO dos calibradores em duplicata. O resultado de cada amostra foi expresso pela razão entre a DO obtida na amostra e o valor do ponto de corte, sendo considerado positivo quando essa razão era igual ou superior a 1,0, negativa quando inferior a 0,5, e inconclusiva quando igual ou superior a 0,5 e inferior a 1,0. Para a reação ter sido válida, o ponto de corte deveria ser maior que 0,2, a razão entre a DO do controle negativo e o ponto de corte deveria ser menor que 0,4, e a razão entre a DO do controle positivo e o ponto de corte deveria ser maior que 1,5.

### **5.3.3 – Antigenemia da NS1**

Modificações no teste comercial Platelia™ foram realizadas para a determinação da antigenemia da NS1. As placas utilizadas foram fornecidas com o kit e, portanto, todos os orifícios estavam sensibilizados com anticorpos anti-NS1 não-específicos e purificados de camundongo. As amostras agudas de soro foram descongeladas em temperatura ambiente do laboratório (21–22°C). Em seguida, 80µl do diluente, que vem com o kit, foram adicionados a todos os poços. Os poços A2 até A12 receberam 20µl do soro. Os poços A1, B1, C1 e D1 receberam, respectivamente, 20µl do controle negativo, calibradores em duplicata e controle positivo. Diluições seriadas de base 5 (1:5 até 1:78125) foram feitas nas amostras de soro, transferindo e homogeneizando 20µl, a partir da linha A, e desprezando os 20µl finais homogeneizados após a última linha da diluição. Seguindo as orientações do fabricante, 100µl do conjugado diluído foram adicionados e a placa foi incubada em câmara úmida por 90



minutos a 37°C. Após a placa ter sido lavada seis vezes com tampão de lavagem (fornecido com o kit), 160µl do substrato foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos, protegida da luz, em temperatura ambiente.

A presença de imunocomplexos foi demonstrada pelo desenvolvimento de coloração azulada. A reação enzimática foi parada com a adição de 100 µl de NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A DO foi obtida através da leitura por meio de espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 a 620nm.

A quantidade de antígeno NS1 presente em uma amostra de soro individual foi determinada pela razão entre a DO da amostra e o ponto de corte, o qual é determinado pela média dos calibradores; os títulos de diluição foram positivos quando a razão entre a DO e o ponto de corte era igual ou superior a 1,0.

#### **5.4 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR)**

Para a quantificação da viremia, foi utilizada a qRT-PCR, uma vez que essa técnica detecta e quantifica o RNA viral de uma amostra de forma sensível e específica, permitindo o acompanhamento da amplificação em tempo real de até 96 amostras simultaneamente, além do sistema ser totalmente automatizado, o que evita a contaminação das amostras (de Araújo, 2009).

Os iniciadores e sondas utilizados eram do “*CDC DENV-1-4 Real-Time RT-PCR Assay for Detection and Serotype Identification of Dengue Virus*”, desenvolvido pelo *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, com o equipamento *LineGene 9600* (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd, BIOER, Binjiang District, China).

O RNA das amostras de soro mantido nos freezers a 70°C negativos foram extraídos utilizando-se *QIAmp Viral Kit* (Qiagen, INc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, para a realização da qRT-PCR.

A curva-padrão foi construída a partir do cultivo em células VERO de DENV-1, 2, 3 e 4, com título de 10<sup>6,41</sup> PFU/ml, 10<sup>5,7</sup> PFU/ml, 10<sup>6,25</sup> PFU/ml e 10<sup>8,04</sup> PFU/ml, respectivamente. O cultivo celular foi realizado no Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LATHEMA), IOC/FIOCRUZ. Foram utilizados 140 µl para extração do RNA. Os vírus foram titulados por ensaio de placa, e gentilmente cedidos para o desenvolvimento do presente trabalho. Diluições seriadas de base 10 foram realizadas a partir do RNA viral dos vírus em cultivo celular. Foram utilizados cinco pontos de diluição para a construção da curva-padrão. As amostras do estudo foram testadas em duplicata.

Para obtenção da carga viral utilizada na reação final, alguns cálculos foram aplicados. A partir da carga viral em PFU/ml dos vírus empregados na curva-padrão (por exemplo DENV-

1,  $10^{6,41}$  PFU/ml), foram calculados a quantidade de RNA, em PFU, em 140 $\mu$ l ( $1,4 \times 10^{5,41}$  PFU/140 $\mu$ l), e o volume utilizado para a extração de RNA e que foi eluído em 60 $\mu$ l ao final do processo de extração. Com o volume de RNA da amostra que foi empregado na reação (2,5 $\mu$ l) e a quantidade de RNA, em PFU, presente nos 60 $\mu$ l eluídos ( $1,4 \times 10^{5,41}$  PFU/60 $\mu$ l), foi calculada a quantidade de PFU por reação ( $5,8333 \times 10^{3,41}$  PFU/reação).

Foram utilizados o *Reaction Mix* e a enzima *Super Script III RT/ Platinum Taq Mix* do kit *Super Script® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* do fabricante Invitrogen (EUA) para a quantificação do RNA viral das 328 amostras estudadas (64 DENV-1, 63 DENV-2 linhagem I, 66 linhagem II do DENV-2, 68 DENV-3 e 67 DENV-4) e da curva-padrão. Os volumes do RNA das amostras e da curva-padrão, bem como os volumes dos reagentes (6,25 $\mu$ l de Reaction Mix 2X, 2,77 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 0,23 $\mu$ l da sonda a 1nM, 0,25 $\mu$ l de cada iniciador a 5nM e 0,25 $\mu$ l da enzima *Super Script III RT/ Platinum Taq Mix*) foram reduzidos em relação ao protocolo recomendado pelo fabricante após a realização de testes de padronização, sendo empregados 2,5 $\mu$ l de RNA viral e 10 $\mu$ l da mistura final dos reagentes.

Foram utilizados os iniciadores e sondas do *CDC DENV 1-4 Real-Time RT-PCR Assay* (CDC, Dengue Branch, San Juan, Puerto Rico) para a quantificação da carga viral das amostras do estudo e das amostras da curva-padrão de cada reação. O ensaio empregou iniciadores e sondas de hidrólise duplamente marcadas (TaqMan®). As sondas para DENV-1,2, 3 e 4 eram marcadas, respectivamente, com os fluoróforos 3'FAM, 3'HEX, 3'TexRed e 3'Cy5. Os parâmetros de termociclagem obedeceram às orientações do fabricante: um ciclo de 30 minutos a 50°C para transcrição do RNA, um ciclo de 2 minutos a 95°C para ativação da enzima, 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C para anelamento e extensão respectivamente.

As reações de qRT-PCR ocorreram no equipamento *LineGene 9600* (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd, Pequim, China). As reações foram absolutas e quantitativas. A quantidade em PFU presente em cada uma das cinco diluições de DENV 1-4 na curva-padrão foi informada ao software do equipamento, delimitando a carga viral mínima e máxima do vírus padrão para a obtenção da carga viral de cada amostra do estudo. Os resultados foram obtidos utilizando o *threshold* automático, estabelecido pelo equipamento. As curvas-padrão de cada reação obtiveram eficiência de 80% a 100%.

Os resultados foram expressos em log de cópias por mililitro (log cópias/ml). Os níveis de viremia foram expressos em Log10 no software estatístico SPSS 21.0, de forma a tornar os valores mais próximos de uma distribuição Gaussiana.

## 6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os softwares estatísticos R e SPSS Statistics 21.0, e o software de planilha eletrônica Excel (Pacote Office 2016), foram empregados para o processamento e análise de dados.

A relação entre a variável desfecho gravidade da dengue e as demais variáveis explicativas (sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença, sorotipo, antigenemia da NS1 e viremia) foi testada por meio do teste Qui-quadrado, com significância em  $p < 0,05$  e/ou teste exato de Fisher (caselas com menos de 5 casos). As relações significativas com  $p < 0,2$  foram selecionadas para construção de modelos de regressão logística univariada com obtenção da estimativa do risco (odds ratio, OR). Os modelos univariados cujo p-valor  $< 0,05$  foram selecionados para entrar no processo de modelagem multivariada. O modelo final foi obtido para aquelas variáveis com  $p < 0,05$  e a OR obtida para cada uma.

A relação entre as variáveis antigenemia da NS1 e viremia, ambas como desfecho, e as demais variáveis explicativas (sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença e sorotipo) foi testada por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com significância em  $p < 0,05$ . E a relação entre a variável antigenemia da NS1 e a variável viremia foi testada pela correlação de Spearman, por tratarem-se de variáveis contínuas não normais.

## **7 – RESULTADOS**

### **7.1 – ESTUDO 1**

O estudo 1 teve como objetivo analisar possíveis associações existentes entre os desfechos apresentação clínica dos pacientes infectados por DENV, antigenemia da NS1 e viremia, e as variáveis relacionadas ao hospedeiro (sexo, faixa etária e resposta imune) e ao vírus (número de dias de doença, sorotipo infectante, antigenemia da NS1 e viremia).

Os dados sócio-demográficos dos pacientes do estudo e os sinais e sintomas estão decritos nas tabelas 7.1 e 7.2 respectivamente.

A tabela 7.3 mostra que as variáveis faixa etária, número de dias de doença e sorotipo apresentaram associação com a apresentação clínica dos pacientes infectados por DENV ( $p \leq 0,05$ ), enquanto as variáveis sexo, resposta imune e sorotipo apresentaram associação com a antigenemia da NS1 ( $p \leq 0,05$ ).

As variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença e sorotipo evidenciaram associação com a viremia produzida pelo DENV ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 7.1- Características sócio-demográficas dos pacientes e parâmetros clínicos

<b>Variáveis</b>	<b>N=262 (%)</b>		
<b>Demográficas</b>	<b>DSSA</b>	<b>DCSA/DG</b>	<b>Total</b>
<i>Sexo</i>			
Masculino	72 (43,9)	41 (41,8)	<b>113 (43,1)</b>
Feminino	92 (56,1)	57 (58,2)	<b>149 (56,9)</b>
Total	164 (100,0)	98 (100,0)	<b>262 (100,0)</b>
<i>Faixa etária</i>			
Crianças ( $\leq$ 12 anos)	10 (6,5)	10 (10,6)	<b>20 (8,1)</b>
Jovens (13-19 anos)	8 (5,2)	14 (15,0)	<b>22 (8,9)</b>
Adultos (20-59 anos)	123 (79,9)	68 (72,3)	<b>191 (77,0)</b>
Idosos ( $\geq$ 60 anos)	13 (8,4)	2 (2,1)	<b>15 (6,0)</b>
Ausentes			<b>14</b>
Total	154 (100,0)	94 (100,0)	<b>248 (100,0)</b>
<b>Clínicas</b>			
<i>Resposta imune</i>			
Primárias	103 (62,8)	60 (61,2)	<b>163 (62,2)</b>
Secundárias	61 (37,2)	38 (38,8)	<b>99 (37,8)</b>
Total	164 (100,0)	98 (100,0)	<b>262 (100,0)</b>
<i>N. dias de doença</i>			
0-1	49 (29,9)	21 (21,4)	<b>70 (26,7)</b>
2-3	84 (51,2)	45 (45,9)	<b>129 (49,2)</b>
4-5	31 (18,9)	32 (32,7)	<b>63 (24,0)</b>
<b>Total</b>	<b>164 (100,0)</b>	<b>98 (100,0)</b>	<b>262 (100,0)</b>

Tabela 7.2-Sinais e sintomas observados nos pacientes com dengue

<i>Sinais/sintomas</i>	<b>N=262</b>		<b>Total</b>
	<b>DSSA</b>	<b>DCSA/DG</b>	
Alteração SNC	0	3	<b>3</b>
Anorexia	61	68	<b>129</b>
Artralgia	73	69	<b>142</b>
Astenia	70	55	<b>125</b>
Cefaleia	130	106	<b>236</b>
Choque	0	9	<b>9</b>
Diarreia	22	43	<b>65</b>
Dor abdominal	5	31	<b>36</b>
Dor retro-orbitária	78	84	<b>162</b>
Epistaxe	0	16	<b>16</b>
Exantema	16	24	<b>40</b>
Febre	113	96	<b>209</b>
Hematêmese	0	2	<b>2</b>
Hemorragia	0	9	<b>9</b>
Hipotensão	1	5	<b>6</b>
Lombalgia	41	40	<b>81</b>
Mialgia	111	93	<b>204</b>
Náusea	66	68	<b>134</b>
Náusea/ vômito	7	13	<b>20</b>
Óbito	0	3	<b>3</b>
Parestesia	7	8	<b>15</b>
Petéquias	4	5	<b>9</b>
Prostração	99	92	<b>191</b>
Prova do laço negativa	4	2	<b>6</b>
Prova do laço positiva	7	2	<b>9</b>
Sangramento	0	34	<b>34</b>
Vômito	39	57	<b>96</b>

Tabela 7.3-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV

Variáveis	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DENV							ANTIGENEMIA DENV				VIREMIA DENV			
	DSSA	%	DCSA/DG	%	Total	%	p-valor	OR (IC)	OR <sub>AJ</sub>	Total	%	p-valor	Total	%	p-valor
<b>Sexo</b>							0,786					<b>0,019</b>			<b>0,027</b>
Feminino	92	56,1	57	58,2	149	56,9				118	56,2		137	57,8	
Masculino	72	43,9	41	41,8	113	43,1				92	43,8		100	42,2	
Total	164	100,0	98	100,0	262	100,0				210	100,0		237	100	
<b>Faixa etária*#</b>							<b>&lt;0,001</b>					0,429			<b>0,002</b>
≤ 12	10	6,5	10	10,6	20	8,1		1	1	15	7,5		19	8,5	
13-19	8	5,2	14	14,9	22	8,9		1,75 (0,5-6,01)	1,68(0,46-6,05)	19	9,5		20	9,0	
20-59	123	79,9	68	72,3	191	77,0		0,55 (0,21-1,39)	0,49(0,18-1,31)	152	76,4		172	77,1	
≥60	13	8,4	2	2,1	15	6,0		<b>0,15 (0,02-0,86)</b>	<b>0,10(0,01-0,64)</b>	13	6,5		12	5,4	
Total	154	100,0	94	100,0	248	100,0				199	100,0		223	100,0	
<b>Resposta imune</b>							0,827					<b>0,001</b>			<b>&lt;0,0001</b>
Inf. Primária	103	62,8	60	61,2	163	62,2				154	73,3		146	61,6	
InF. Secundária	61	37,2	38	38,8	99	37,8				56	26,7		91	38,4	
Total	164	100,0	98	100,0	262	100,0				210	100,0		237	100,0	
<b>Número de dias de doença</b>							<b>0,033</b>					0,086			<b>0,001</b>
0-1	49	29,9	21	21,4	70	26,7		1	1	54	25,7		68	28,7	
2-3	84	51,2	45	45,9	129	49,2		1,25(0,66-2,33)	1,30(0,66-2,55)	105	50,0		115	48,5	
4-5	31	18,9	32	32,7	63	24,0		<b>2,40(1,18-4,90)</b>	<b>2,97(1,35-6,56)</b>	51	24,3		54	22,8	
Total	164	100,0	98	100,0	262	100,0				210	100,0		237	100,0	
<b>Sorotipo</b>							<b>0,025</b>					<b>&lt;0,0001</b>			<b>&lt;0,0001</b>
DENV-1	46	28,0	18	18,4	64	24,4		1	1	64	30,5		51	21,5	
DENV-2	45	27,4	18	18,4	63	24,0		1,02 (0,47-2,21)	1,22(0,54-2,73)	33	15,7		55	23,2	
DENV-3	34	20,7	34	34,7	68	26,0		<b>2,55 (1,24-5,26)</b>	<b>2,73(1,24-6,01)</b>	62	29,5		66	27,8	
DENV-4	39	23,8	28	28,6	67	25,6		1,83 (0,88-3,80)	<b>2,27(1,04-4,94)</b>	51	24,3		65	27,4	
Total	164	100,0	98	100,0	262	100,0				210	100,0		237	100,0	
<b>Antigenemia da NS1**</b>							0,101					NA			0,627
Total	133	100,0	77	100,0	210	100,0				NA	NA		188	100,0	
<b>Viremia***</b>							0,752					0,627			NA
Total	146	100	91	100	237	100				188	100,0		NA	NA	

\*Constam apenas os pacientes com informação quanto à idade nas fichas epidemiológicas. # A idade dos pacientes variou de 2 a 81 anos, com média igual a 33,4 anos.\*\*Constam apenas as amostras positivas para o teste Platelia.\*\*\*Constam apenas as amostras que formaram curva de amplificação.

### 7.1.1 – Apresentação clínica do Estudo 1

A variável desfecho apresentação clínica foi analisada em comparação com as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença, sorotipo, antigenemia da NS1 e viremia. Entre estas, apenas as variáveis faixa etária (p-valor <0,001), número de dias de doença (p-valor=0,033) e sorotipo (p-valor=0,025) foram estatisticamente significativas (p<0,05), como mostrado na tabela 7.3.

Em relação à variável faixa etária, é importante destacar que a idade dos pacientes (2-81 anos) foi estratificada nas seguintes categorias:  $\leq 12$ , 13-19, 20-59 e  $\geq 60$  anos. Não havia informação quanto à idade em 14 fichas epidemiológicas. Pelo modelo univariado, ainda que a associação estatística não tenha sido significativa, os pacientes com 13 a 19 anos apresentaram chance 75% maior (OR=1,75; IC:0,5-6,01) de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com idade igual ou inferior a 12 anos. E os pacientes entre 20 e 59 anos apresentaram chance 45% menor (OR=0,55; IC:0,21-1,39) de desenvolver sinais de alerta em relação àqueles com idade igual ou inferior a 12 anos (associação estatística não significativa). Os pacientes com idade igual ou superior a 60 anos apresentaram chance significativa 85% menor (OR=0,15; IC:0,02-0,86) de desenvolver sinais de alerta em relação àqueles com idade igual ou inferior a 12 anos.

No que se refere à variável número de dias de doença, foi observada uma relação ordinal entre esta variável e o desfecho apresentação clínica, mostrando que o maior número de dias de doença aumenta a chance de os sinais de alerta serem observados. Pelo modelo univariado, a presença de sinais de alerta/dengue grave foi 2,4 vezes mais frequentemente observada (OR=2,40; IC:1,18-4,90) nos pacientes com 4 a 5 dias de doença em relação àqueles com 0 a 1 de doença. Ainda que a associação não tenha sido significativa, os pacientes com 2 a 3 dias de doença apresentaram chance 25% maior (OR=1,25; IC:0,66-2,33) de apresentar sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com 0 a 1 dia de doença.

No que concerne aos sorotipos, pelo modelo univariado, os pacientes infectados pelo DENV-3 apresentaram chance significativa 2,5 vezes maior (OR=2,55; IC:1,24-5,26) de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com DENV-1. Ainda que a associação estatística não tenha sido significativa, não houve aumento da chance de desenvolver sinais de alerta para pacientes com DENV-2 (OR=1,02; IC:0,47-2,21) em relação àqueles com DENV-1; e os pacientes com DENV-4 apresentaram chance 83% maior (OR=1,83; IC:0,88-3,80) de desenvolver dengue com sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com DENV-1 (sem significância estatística).



Com relação à variável antigenemia da NS1, não foi observada associação com a apresentação clínica (p-valor=0,101). Contudo, houve uma tendência de antigenemia mais alta nos pacientes sem sinais de alerta em relação aos pacientes com sinais de alerta. O grupo DSSA (n=133) apresentou níveis de NS1 que variaram de 5 a 78125, com mediana igual a 3125 (IQR:625-78125). O grupo DCSA/DG (n=77) apresentou níveis de NS1 que variaram de 5 a 78125, com mediana igual a 3125, mas com IQR compreendido entre 125 e 15625 (Figura 7.1.).

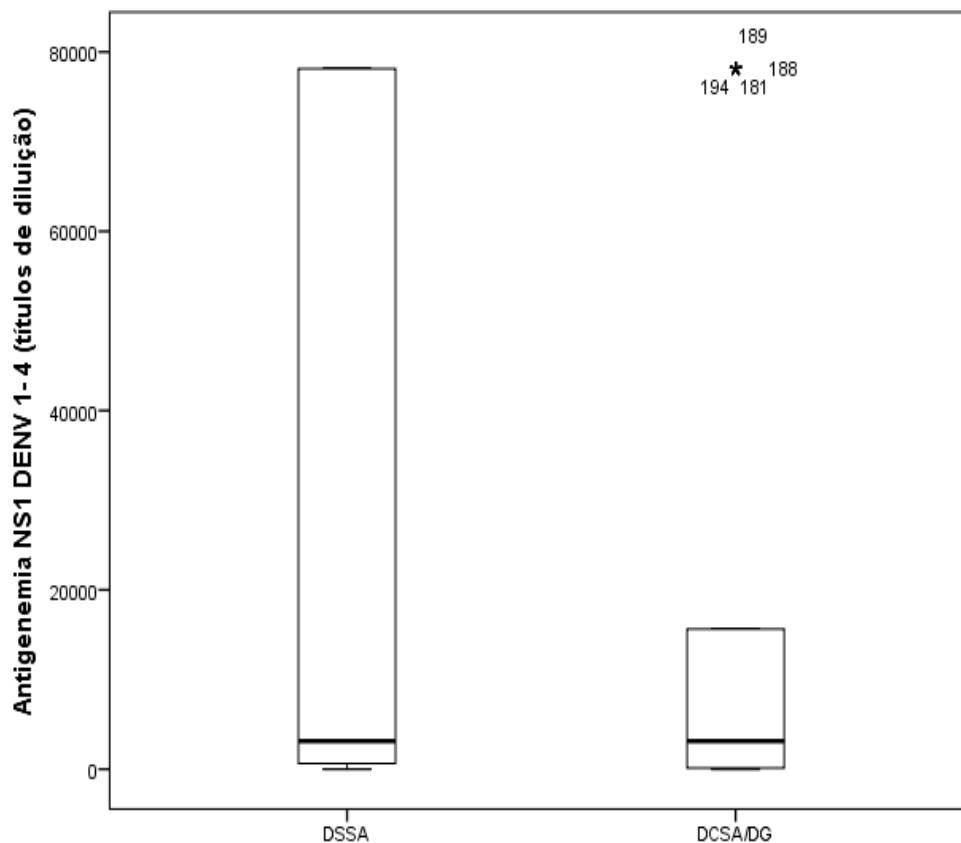


Figura 7.1-Níveis circulantes de NS1 em pacientes apresentando DSSA [n=133, mediana=3125 (IQR:625-78125)] e DCSA/DG [n=77, mediana=3125 (IQR:125-15625)] (p-valor=0,101). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança. p<0,05 foi considerado significativo.

No que se refere à variável viremia, apesar de não ter sido observada relação estatística significativa com o desfecho apresentação clínica (p-valor=0,752), viremia discretamente mais alta foi observada nos pacientes sem sinais de alerta [n=146, mediana=2,03 log cópias/ml (IQR:0,11-3,16 log cópias/ml)] em relação aos pacientes com sinais de alerta/dengue grave [n=91, mediana=1,67 log cópias/ml (IQR:0,50-2,43 log cópias/ml)] (Figura 7.2).

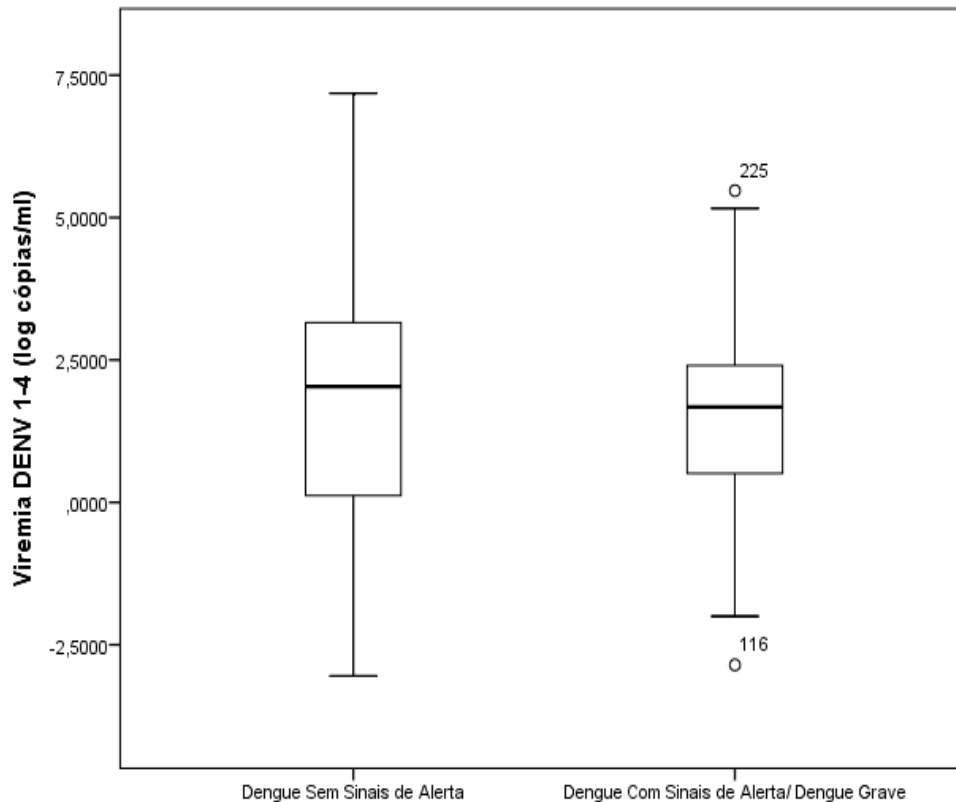


Figura 7.2-Carga viral em pacientes apresentando DSSA [n=146, mediana=2,03 log cópias/ml (IQR:0,11-3,16 log cópias/ml)] e DCSA/DG [n=91, mediana=1,67 log cópias/ml (IQR:0,50-2,43 log cópias/ml)] (p-valor=0,752). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartílico (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

O ajustamento pelo modelo multivariado mostrou que as variáveis significantes nos modelos univariados mantiveram a significância e, portanto, permaneceram no modelo final. O modelo final explicando a gravidade da dengue foi composto por faixa etária, número de dias de doença e sorotipo.

Pelo modelo multivariado, pode-se afirmar que o fator de risco para dengue grave foi aumentando à medida que a idade diminuía: pacientes com idade igual ou superior a 60 anos apresentaram chance significativa 90% menor (OR=0,10; IC:0,01-0,64) de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com idade igual ou inferior a 12 anos. Ainda que sem significância estatística, os pacientes de 20 a 59 anos apresentaram chance 51% menor (OR=0,49; IC:0,18-1,31) de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com idade igual ou inferior a 12 anos; e os pacientes de 13 a 19 anos apresentaram chance 68%

maior (OR=1,68; IC:0,46-6,05) de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com idade igual ou inferior a 12 anos (sem significância estatística).

Foi estabelecida uma relação ordinal entre o número de dias de doença e a apresentação clínica da dengue, mostrando claramente que o maior número de dias de doença aumenta a chance de observarmos os sinais de alerta/dengue grave nos pacientes. Ainda que sem significância estatística, os sinais de alerta/dengue grave tiveram chance 30 % maior de serem observados nos pacientes com 2 a 3 dias de doença, enquanto os sinais de alerta/dengue grave tiveram chance significativa 2,9 vezes maior de serem observados nos pacientes com 4 a 5 dias de doença (2-3 dias, OR=1,30; IC:0,66-2,55 e 4-5 dias, OR=2,97; IC:1,35-6,56).

Os sorotipos 3 e 4 (OR=2,27; IC:1,04-4,94) permaneceram significativamente associados ao desenvolvimento de sinais de alerta/dengue grave, com ênfase na OR observada para DENV-3 (2,73, IC:1,24-6,01), aumentada em relação ao modelo univariado, segundo a qual os pacientes infectados pelo sorotipo 3 apresentaram chance 2,7 vezes maior de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles infectados pelo sorotipo 1.

### **7.1.2 – Antigenemia da NS1**

A variável desfecho antigenemia da NS1 foi analisada em comparação com as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença, sorotipo e viremia. Entre estas, apenas as variáveis sexo (p-valor=0,019), resposta imune (p-valor=0,001) e sorotipo (p-valor<0,0001) foram significativas, como mostrado na tabela 7.3.

Em relação à variável sexo, os homens [n=92, mediana=3125 (IQR:625-62500)] apresentaram níveis de NS1 discretamente mais altos que as mulheres [n=118, mediana=3125 (IQR:100-15625)] (p-valor=0,019) (Figura 7.3).

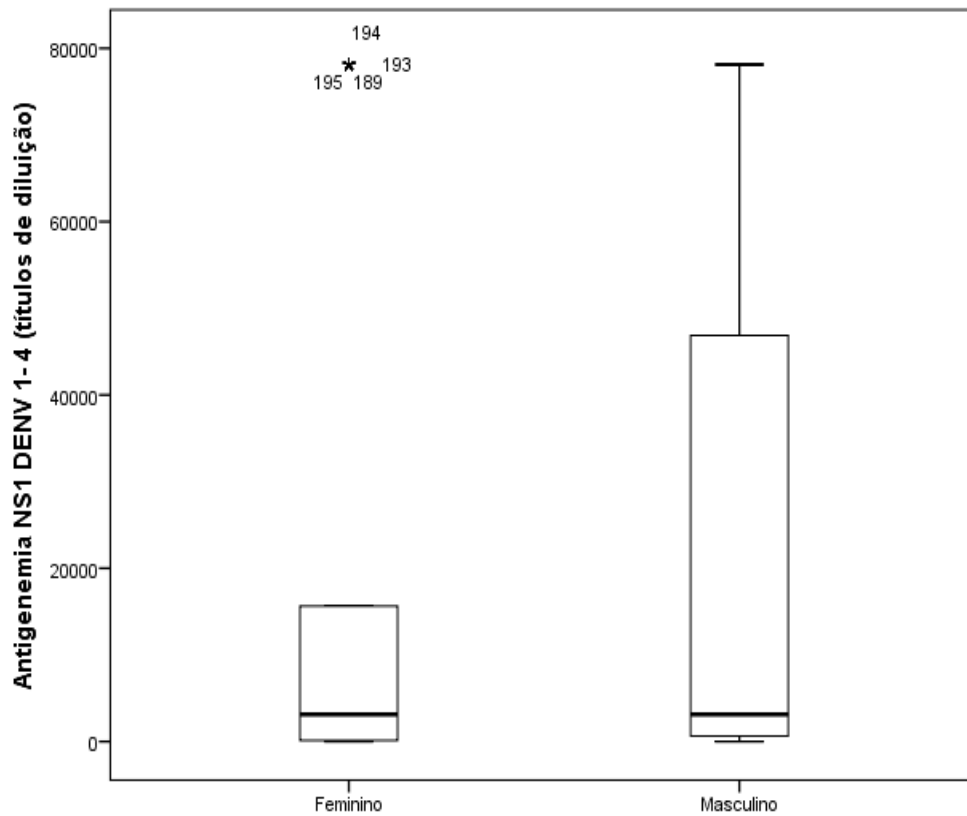


Figura 7.3-Níveis circulantes de NS1 em pacientes do sexo feminino [n=118, mediana=3125 (IQR:100-15625)] e masculino [n=92, mediana=3125 (IQR:625-62500)] (p-valor=0,019). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

No que se refere à variável resposta imune, os pacientes com infecção primária [n=154, mediana=3125 (IQR:625-15625)] apresentaram níveis mais altos de NS1 circulante em relação aos pacientes com infecção secundária [n=56, mediana=625 (IQR:25-62500)] (p-valor=0,001) (Figura 7.4).

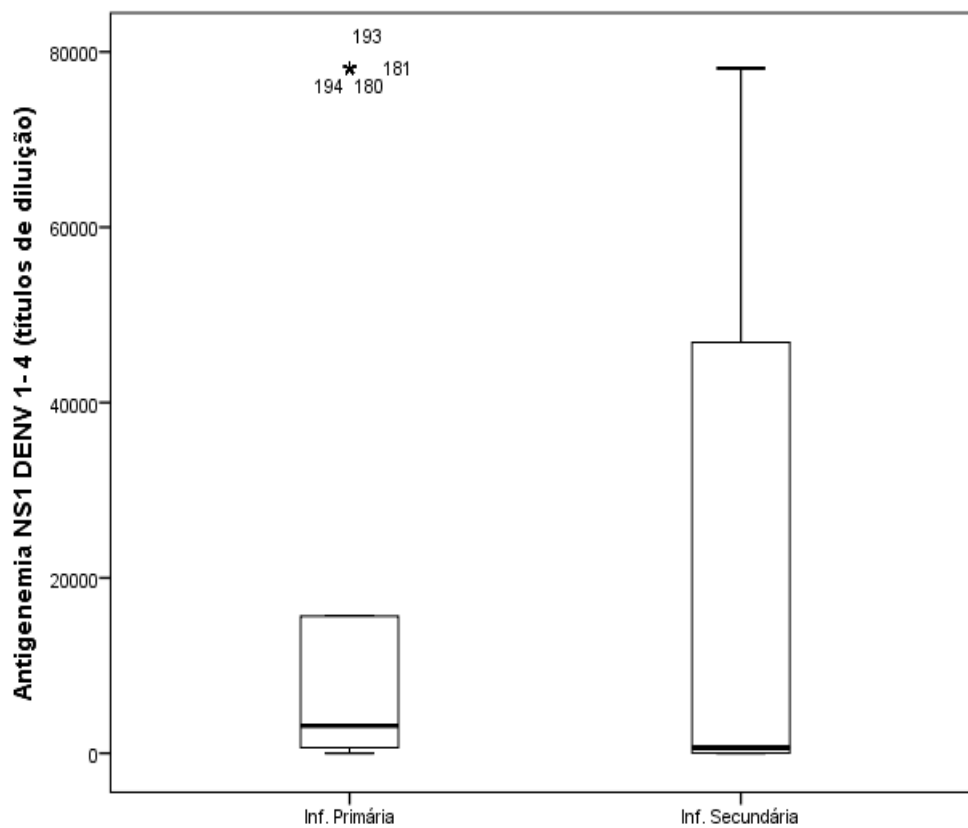


Figura 7.4-Níveis circulantes de NS1 em pacientes com infecção primária [n=154, mediana=3125 (IQR:625-15625)] e secundária [n=56, mediana=625 (IQR:25-62500)] (p-valor=0,001). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

No que concerne aos sorotipos, níveis de NS1 circulantes mais elevados foram observados nos pacientes infectados por DENV-3 [n=62, mediana=15625 (IQR:3125-78125)], seguido por DENV-1 [n=64, mediana=3125 (IQR:625-15625)], DENV-2 [n=33, mediana=3125 (IQR:625-78125)] ou DENV-4 [n=51, mediana=25 (IQR:5-125)] (p-valor<0,0001) (Figura 7.5).

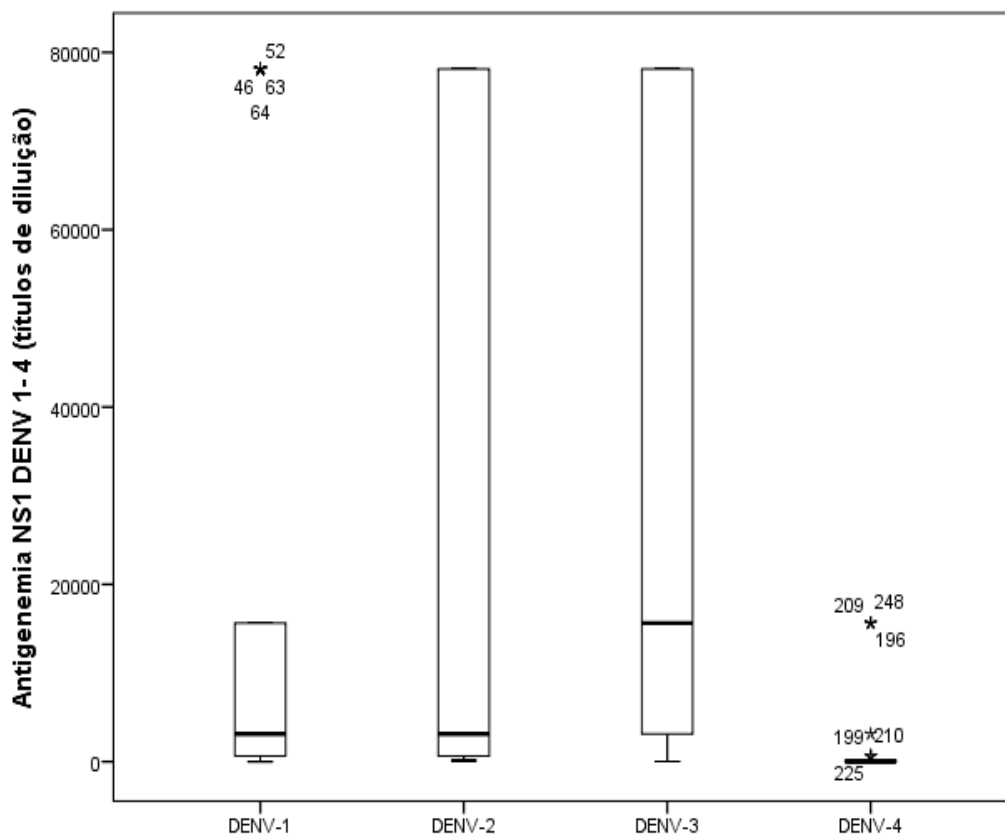


Figura 7.5-Níveis circulantes de NS1 em pacientes com infecção por DENV-1 [n=64, mediana=3125 (IQR:625-15625)], DENV-2 [n=33, mediana=3125 (IQR:625-78125)], DENV-3 [n=62, mediana=15625 (IQR:3125-78125)] ou DENV-4 [n=51, mediana=25 (IQR:5-125)] (p-valor<0,0001). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança. p<0,05 foi considerado significativo.

### 7.1.3 – Viremia

O desfecho viremia foi analisado em comparação com as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença e sorotipo. Entre estas, com exceção da variável antigenemia da NS1, houve evidência de associação com todas as demais variáveis: sexo (p-valor=0,027), faixa etária (p-valor=0,002), resposta imune (p-valor<0,0001), número de dias de doença (p-valor=0,001) e sorotipos (p-valor<0,0001), como mostrado na tabela 7.3.

Em relação à variável sexo, é importante destacar que as mulheres apresentaram viremia discretamente mais alta [n=137, mediana=1,97 log cópias/ml (IQR:0,50-3,08 log cópias/ml)] em relação aos homens [n=100, mediana=1,67 log cópias/ml (IQR:0,09-2,67 log cópias/ml)] (p-valor=0,027) (Figura 7.6).

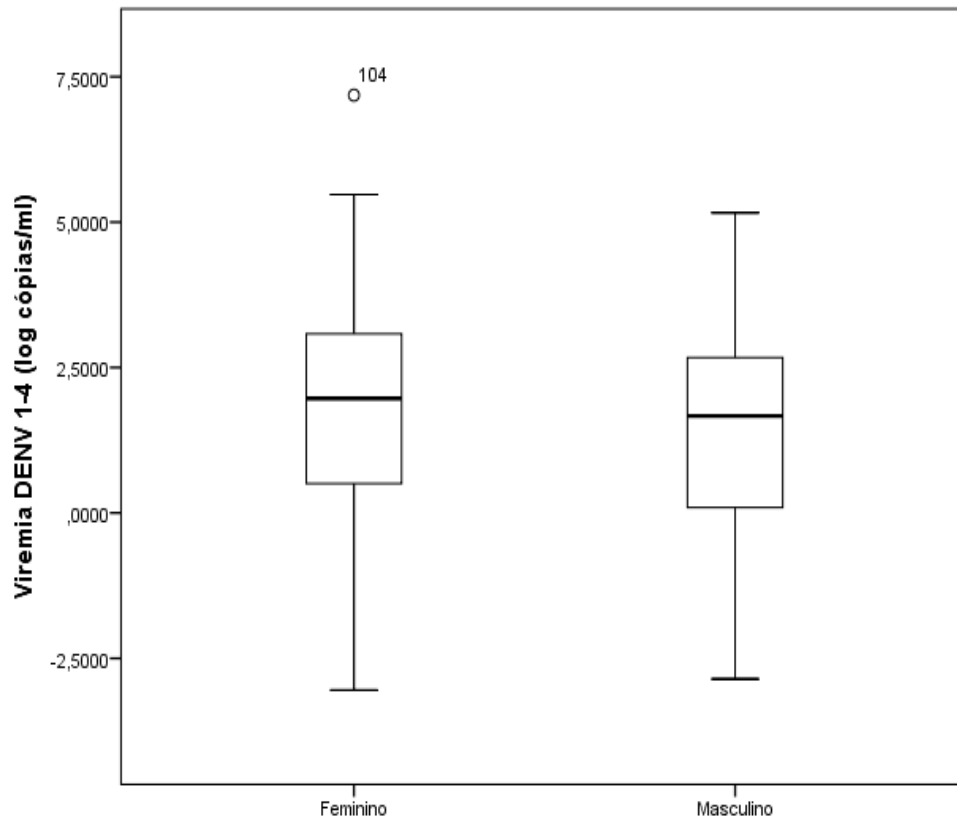


Figura 7.6-Carga viral em pacientes do sexo feminino [n=137, mediana=1,97 log cópias/ml (IQR:0,50-3,08 log cópias/ml)] e masculino [n=100, mediana=1,67 log cópias/ml (IQR:0,09-2,67 log cópias/ml)] (p-valor=0,027). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

No que se refere à faixa etária, os pacientes com idade igual ou superior a 60 anos apresentaram valores de viremia discretamente mais altos [n=12, mediana=2,73 log cópias/ml (IQR:1,45-4,36 log cópias/ml)] em relação aos pacientes de 20 a 59 anos [n=172, mediana=2,01 log cópias/ml (IQR:0,31-3,05 log cópias/ml)], 13 a 19 anos [n=20, mediana=1,39 log cópias/ml (IQR:0,34-3,18 log cópias/ml)] e pacientes com idade igual ou inferior a 12 anos [n=19, mediana=0,73 log cópias/ml (IQR:-1,05-2,21 log cópias/ml)] (p-valor=0,002) (Figura 7.7). Houve 14 pacientes sem registro de idade na ficha epidemiológica.

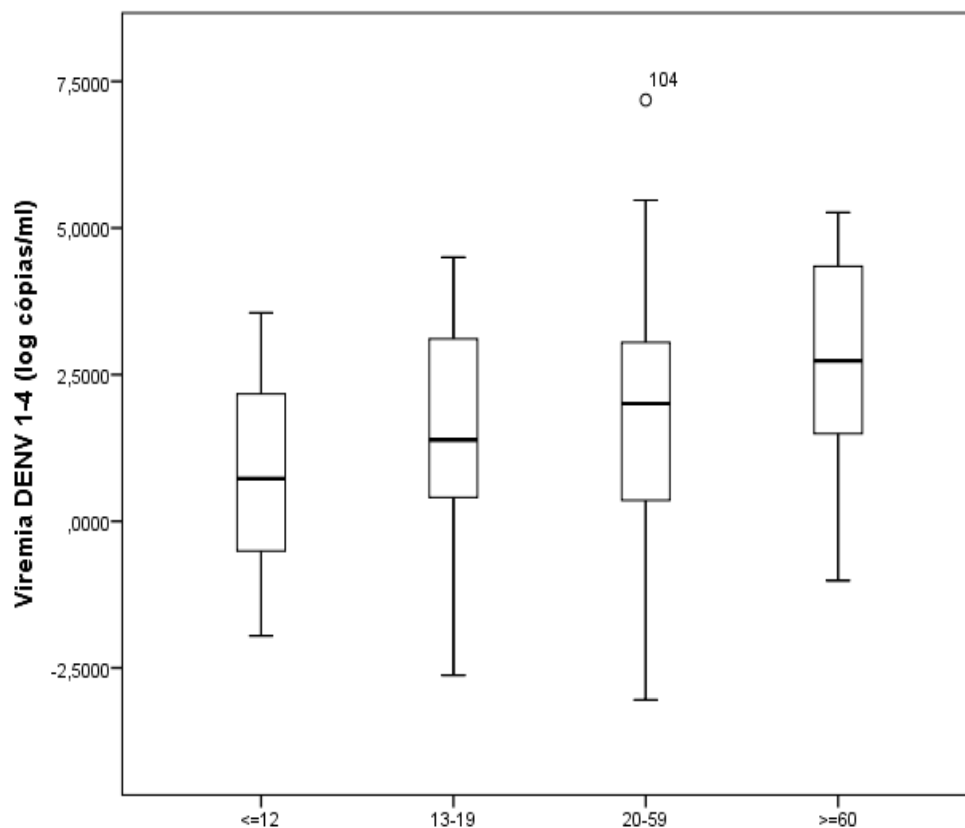


Figura 7.7-Carga viral em pacientes com idade  $\leq 12$  anos [n=19, mediana=0,73 log cópias/ml (IQR:-1,05-2,21 log cópias/ml)], de 13-19 anos [n=20, mediana=1,39 log cópias/ml (IQR:0,34-3,18 log cópias/ml)], de 20-59 anos [n=172, mediana=2,01 log cópias/ml (IQR:0,31-3,05 log cópias/ml)] ou com idade  $\geq 60$  anos [n=12, mediana=2,73 log cópias/ml (IQR:1,45-4,36 log cópias/ml)] (p-valor=0,002). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartílico (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança. p<0,05 foi considerado significativo.

No que se refere ao tipo de resposta imune, os pacientes com infecção primária [n=146, mediana=2,22 log cópias/ml (IQR:1,40-3,18 log cópias/ml)] apresentaram carga viral maior que pacientes com infecção secundária [n=91, mediana=0,18 log cópias/ml (IQR:-1,04-2,25 log cópias/ml)] (p-valor<0,0001) (Figura 7.8).



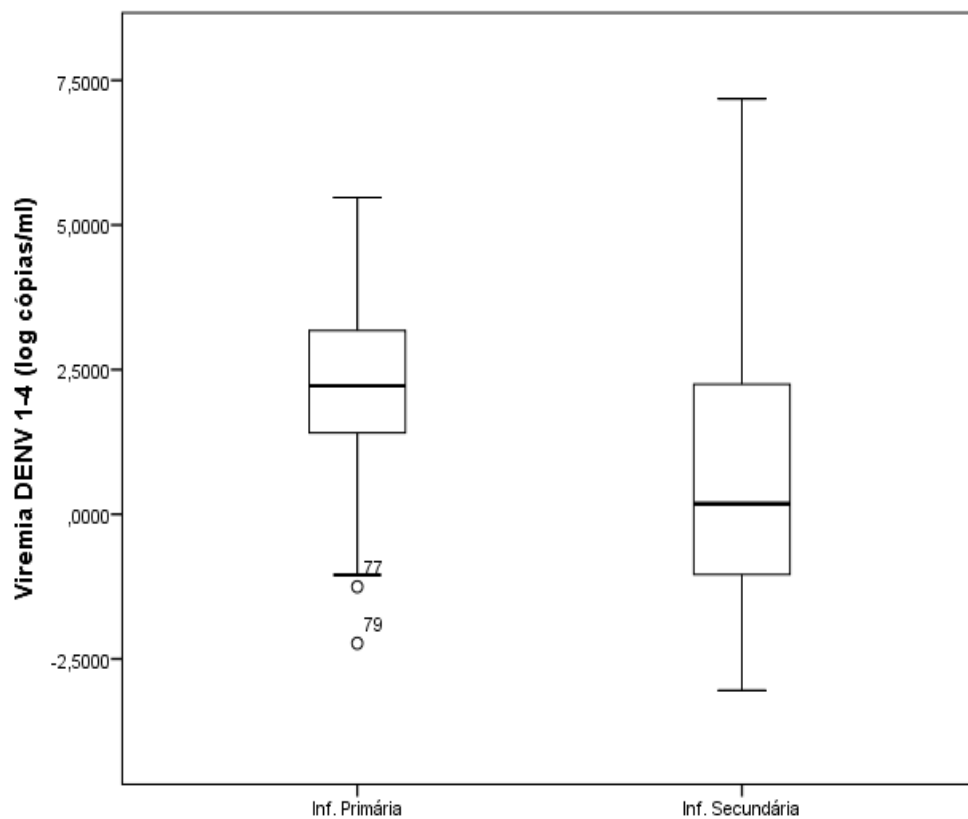


Figura 7.8-Carga viral em pacientes com infecção primária [n=146, mediana=2,22 log cópias/ml (IQR:1,40-3,18 log cópias/ml)] ou com infecção secundária [n=91 mediana=0,18 log cópias/ml (IQR:-1,04-2,25 log cópias/ml)] (p-valor<0,0001). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartílico (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança. p<0,05 foi considerado significativo.

No que se refere ao número de dias de doença, foi observada uma relação inversa e significativa com a viremia (p=0,001), porém muito fraca (-0,20): à medida que o número de dias de doença aumentava, a carga viral diminuía [0-1 dias, mediana=2,25 log cópias/ml (IQR: 0,59-3,22 log cópias/ml); 2-3 dias, mediana=2,01 log cópias/ml (IQR:0,26-3,13 log cópias/ml); 4-5 dias, mediana=1,34 log cópias/ml (IQR:-0,42-2,48 log cópias/ml)] (p-valor=0,001) (Figura 7.9).

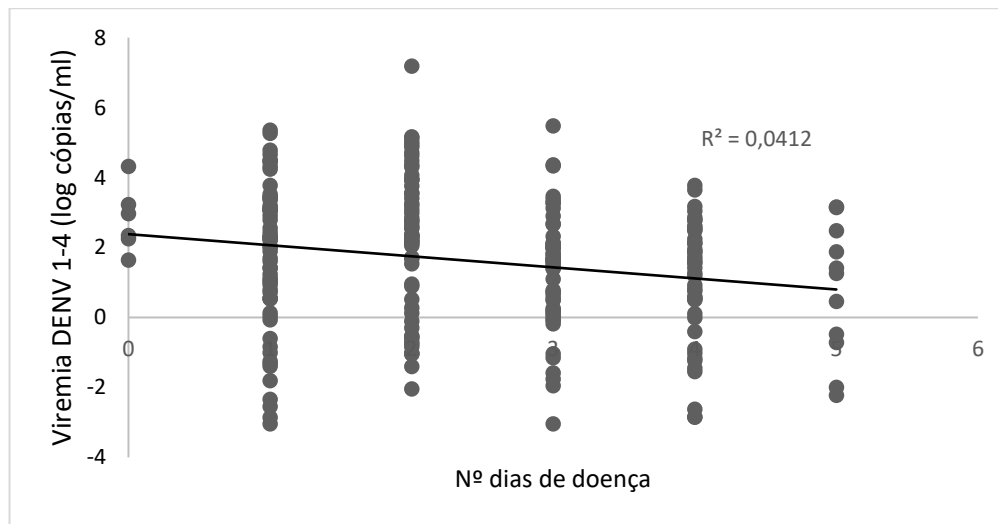


Figura 7.9-Carga viral em pacientes com 0-1 dia de doença [n=68, mediana=2,25 log cópias/ml (IQR: 0,59-3,22 log cópias/ml)], 2-3 dias de doença [n=115, mediana=2,01 log cópias/ml (IQR:0,26-3,13 log cópias/ml)] ou 4-5 dias de doença [n=54, mediana=1,34 log cópias/ml (IQR:-0,42-2,48 log cópias/ml)] (p-valor=0,001).  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Quanto aos sorotipos, o DENV-4 apresentou níveis discretamente mais altos de viremia [n=65, mediana=2,76 log cópias/ml (IQR:1,33-3,50 log cópias/ml)] em relação ao DENV-1 [n=51, mediana=2,21 log cópias/ml (IQR:1,82-2,77 log cópias/ml)], ao DENV-3 [n=66, mediana=2,15 log cópias/ml (IQR:0,70-3,15 log cópias/ml)] e ao DENV-2 [n=55, mediana= -0,84 log cópias/ml (IQR:-1,77-0,26 log cópias/ml)] (p-valor<0,0001) (Figura 7.10).

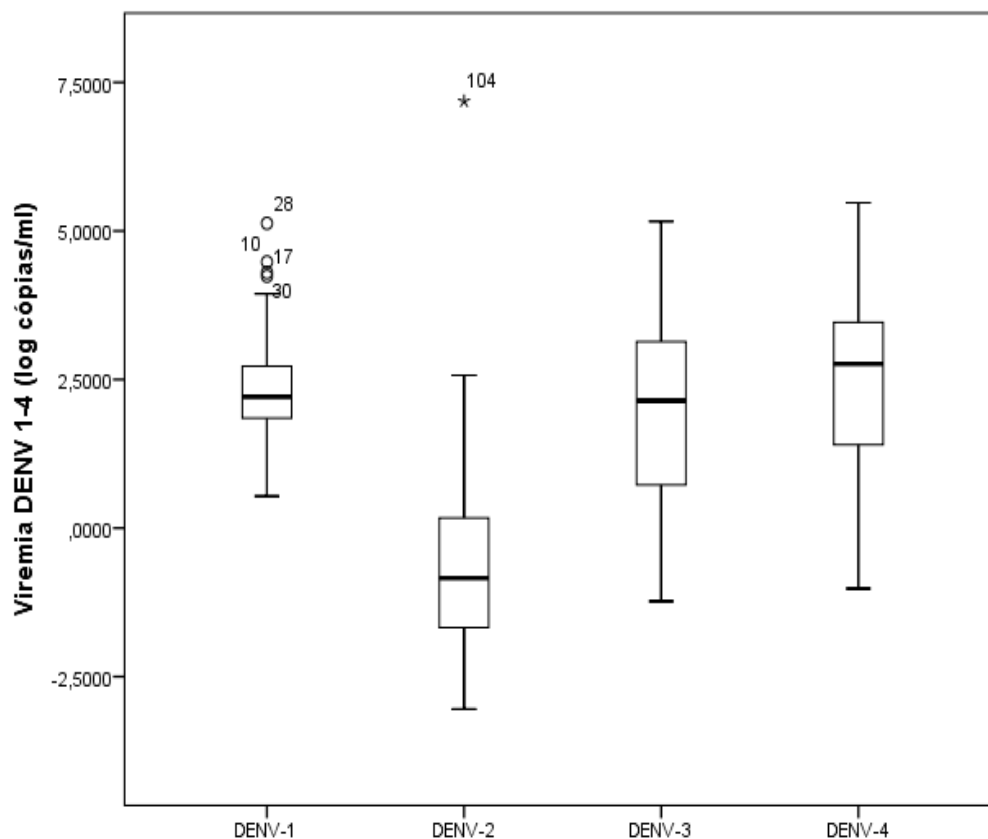


Figura 7.10-Carga viral em pacientes com infecção por DENV-1 [n=51, mediana=2,21 log cópias/ml (IQR:1,82-2,77 log cópias/ml)], DENV-2 [n=55, mediana= -0,84 log cópias/ml (IQR:-1,77-0,26 log cópias/ml)], DENV-3 [n=66, mediana=2,15 log cópias/ml (IQR:0,70-3,15 log cópias/ml)] ou DENV-4 [n=65, mediana=2,76 log cópias/ml (IQR:1,33-3,50 log cópias/ml)] (p-valor<0,0001). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartílico (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança. p<0,05 foi considerado significativo.

## 7.2 – ESTUDO 2

O estudo 2 teve como objetivo analisar possíveis associações existentes entre os desfechos apresentação clínica dos pacientes infectados por DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4, antigenemia da NS1 e viremia produzidas por cada sorotipo, e as variáveis relacionadas ao hospedeiro (sexo, faixa etária e resposta imune) e ao vírus (número de dias de doença, sorotipo infectante, antigenemia da NS1 e viremia).

Os dados sócio-demográficos dos pacientes do estudo relacionadas aos sorotipos infectantes de DENV e os sinais e sintomas estão decritos nas tabelas 7.4 e 7.5 respectivamente.

A tabela 7.6 mostra que a variável antigenemia da NS1 teve associação com a apresentação clínica dos pacientes infectados por DENV-1 ( $p \leq 0,05$ ). A tabela 7.7 mostra que a variável resposta imune apresentou associação com a viremia do DENV-2. A tabela 7.8 mostra que as variáveis resposta imune e número de dias de doença apresentaram associação com a antigenemia da NS1 para DENV-3, assim como as variáveis faixa etária e número de dias de doença apresentaram associação com a viremia produzida pelo sorotipo 3. A tabela 7.9 mostra que apenas a variável número de dias de doença apresentou associação com a viremia do DENV-4.

Tabela 7.4- Características sócio-demográficas dos pacientes relacionadas aos sorotipos infectantes de DENV e parâmetros clínicos

Variáveis	DENV-1 N=64 (%)			DENV-2 N=63 (%)			DENV-3 N=68 (%)			DENV-4 N=67 (%)			Total N=262 (%)		
	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total
<b>Demográficas</b>															
<i>Sexo</i>															
Masculino	26 (56,5)	9 (50,0)	35 (54,7)	20 (44,4)	12 (66,7)	32 (50,8)	16 (47,1)	15 (44,1)	31 (45,6)	10 (25,6)	5 (17,9)	15 (22,4)	72 (43,9)	41 (41,8)	113 (43,1)
Feminino	20 (43,5)	9 (50,0)	29 (45,3)	25 (55,6)	6 (33,3)	31 (49,2)	18 (52,9)	19 (55,9)	37 (54,4)	29 (74,4)	23 (82,1)	52 (77,6)	92 (56,1)	57 (58,2)	149 (56,9)
Total	46 (100,0)	18 (100,0)	64 (100,0)	45 (100,0)	18 (100,0)	63 (100,0)	34 (100,0)	34 (100,0)	68 (100,0)	39 (100,0)	28 (100,0)	67 (100,0)	164 (100,0)	98 (100,0)	262 (100,0)
<i>Faixa etária</i>															
Crianças (≤ 12 anos)	2 (4,4)	2 (11,1)	4 (6,3)	5 (11,6)	0	5 (8,2)	1 (3,4)	5 (16,7)	6 (10,2)	2 (5,4)	3 (10,7)	5 (7,7)	10 (6,5)	10 (10,6)	20 (8,1)
Jovens (13-19 anos)	1 (2,2)	3 (16,7)	4 (6,3)	2 (4,7)	1 (5,6)	3 (4,9)	2 (6,9)	5 (16,7)	7 (11,9)	3 (8,1)	5 (17,9)	8 (12,3)	8 (5,2)	14 (15,0)	22 (8,9)
Adultos (20-59 anos)	40 (89,0)	13 (72,2)	53 (84,1)	33 (76,7)	17 (94,4)	50 (82,0)	22 (75,9)	19 (63,3)	41 (69,5)	28 (75,7)	19 (67,8)	47 (72,3)	123 (79,9)	68 (72,3)	191 (77,0)
Idosos (≥60 anos)	2 (4,4)	0	2 (3,2)	3 (7,0)	0	3 (4,9)	4 (13,8)	1 (3,3)	5 (8,5)	4 (10,8)	1 (3,6)	5 (7,7)	13 (8,4)	2 (2,1)	15 (6,0)
Ausentes			1			2			9			2			14
Total	45 (100,0)	18 (100,0)	63 (100,0)	43 (100,0)	18 (100,0)	61 (100,0)	29 (100,0)	30 (100,0)	59 (100,0)	37 (100,0)	28 (100,0)	65 (100,0)	154 (100,0)	94 (100,0)	248 (100,0)
<b>Clínicas</b>															
<i>Resposta imune</i>															
Primárias	46 (100,0)	18 (100,0)	64 (100)	12 (26,7)	3 (16,7)	15 (23,8)	27 (79,4)	23 (67,6)	50 (73,5)	18 (46,2)	16 (57,1)	34 (50,7)	103 (62,8)	60 (61,2)	163 (62,2)
Secundárias	0	0	0 (0)	33 (73,3)	15 (83,3)	48 (76,2)	7 (20,6)	11 (32,4)	18 (26,5)	21 (53,8)	12 (42,9)	33 (49,3)	61 (37,2)	38 (38,8)	99 (37,8)
Total	46 (100,0)	18 (100,0)	64 (100,0)	45 (100,0)	18 (100,0)	63 (100,0)	34 (100,0)	34 (100,0)	68 (100,0)	39 (100,0)	38 (100,0)	67 (100,0)	164 (100,0)	98 (100,0)	262 (100,0)
<i>N. dias de doença</i>															
0-1	13 (28,3)	4 (22,2)	17 (26,6)	14 (31,1)	5 (27,8)	19 (30,2)	4 (11,8)	5 (14,7)	9 (13,2)	18 (46,2)	7 (25,0)	25 (37,3)	49 (29,9)	21 (21,4)	70 (26,7)
2-3	20 (43,4)	6 (33,3)	26 (40,6)	24 (53,3)	9 (50,0)	33 (52,4)	22 (64,7)	16 (47,1)	38 (55,9)	18 (46,2)	14 (50,0)	32 (47,8)	84 (51,2)	45 (45,9)	129 (49,2)
4-5	13 (28,3)	8 (44,5)	21 (32,8)	7 (15,6)	4 (22,2)	11 (17,5)	8 (23,5)	13 (38,2)	21 (30,9)	3 (7,6)	7 (25,0)	10 (14,9)	31 (18,9)	32 (32,7)	63 (24,0)
Total	46 (100,0)	18 (100,0)	64 (100,0)	45 (100,0)	18 (100,0)	63 (100,0)	34 (100,0)	34 (100,0)	68 (100,0)	39 (100,0)	28 (100,0)	67 (100,0)	164 (100,0)	98 (100,0)	262 (100,0)

Tabela 7.5-Sinais e sintomas observados nos pacientes com dengue em relação aos sorotipos de DENV

<i>Sinais/sintomas</i>	DENV-1 N=64 (%)			DENV-2 N=63 (%)			DENV-3 N=68 (%)			DENV-4 N=67 (%)			Total N=262 (%)		
	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total
Alteração SNC	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	2	<b>2</b>	0	1	<b>1</b>	0	3	<b>3</b>
Anorexia	24	23	<b>47</b>	18	16	<b>34</b>	15	21	<b>36</b>	4	8	<b>12</b>	61	68	<b>129</b>
Artralgia	25	25	<b>50</b>	17	17	<b>34</b>	20	18	<b>38</b>	11	9	<b>20</b>	73	69	<b>142</b>
Astenia	27	25	<b>52</b>	21	11	<b>32</b>	14	9	<b>23</b>	8	10	<b>18</b>	70	55	<b>125</b>
Cefaleia	34	27	<b>61</b>	36	22	<b>58</b>	27	29	<b>56</b>	33	28	<b>61</b>	130	106	<b>236</b>
Choque	0	0	<b>0</b>	0	7	<b>7</b>	0	2	<b>2</b>	0	0	<b>0</b>	0	9	<b>9</b>
Diarreia	6	13	<b>19</b>	5	8	<b>13</b>	8	13	<b>21</b>	3	9	<b>12</b>	22	43	<b>65</b>
Dor abdominal	0	0	<b>0</b>	2	2	<b>4</b>	2	3	<b>5</b>	1	26	<b>27</b>	5	31	<b>36</b>
Dor retro-orbitária	27	26	<b>53</b>	19	17	<b>36</b>	17	21	<b>38</b>	15	20	<b>35</b>	78	84	<b>162</b>
Epistaxe	0	5	<b>5</b>	0	1	<b>1</b>	0	10	<b>10</b>	0	0	<b>0</b>	0	16	<b>16</b>
Exantema	5	6	<b>11</b>	3	9	<b>12</b>	6	6	<b>12</b>	2	3	<b>5</b>	16	24	<b>40</b>
Febre	16	17	<b>33</b>	30	20	<b>50</b>	32	31	<b>63</b>	35	28	<b>63</b>	113	96	<b>209</b>
Hematêmese	0	1	<b>1</b>	0	1	<b>1</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	2	<b>2</b>
Hemorragia	0	1	<b>1</b>	0	1	<b>1</b>	0	7	<b>7</b>	0	0	<b>0</b>	0	9	<b>9</b>
Hipotensão	0	1	<b>1</b>	0	0	<b>0</b>	1	1	<b>2</b>	0	3	<b>3</b>	1	5	<b>6</b>
Lombalgia	22	18	<b>40</b>	6	8	<b>14</b>	8	5	<b>13</b>	5	9	<b>14</b>	41	40	<b>81</b>
Mialgia	29	25	<b>54</b>	31	22	<b>53</b>	29	28	<b>57</b>	22	18	<b>40</b>	111	93	<b>204</b>
Náusea	24	23	<b>47</b>	17	4	<b>21</b>	14	19	<b>33</b>	11	22	<b>33</b>	66	68	<b>134</b>
Náusea/ vômito	0	0	<b>0</b>	0	11	<b>11</b>	7	2	<b>9</b>	0	0	<b>0</b>	7	13	<b>20</b>
óbito	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	3	<b>3</b>	0	0	<b>0</b>	0	3	<b>3</b>
Parestesia	2	2	<b>4</b>	2	1	<b>3</b>	3	4	<b>7</b>	0	1	<b>1</b>	7	8	<b>15</b>
Petéquiias	0	0	<b>0</b>	2	2	<b>4</b>	2	2	<b>4</b>	0	1	<b>1</b>	4	5	<b>9</b>
Prostração	24	25	<b>49</b>	27	19	<b>46</b>	27	25	<b>52</b>	21	23	<b>44</b>	99	92	<b>191</b>
Prova do laço negativa	0	0	<b>0</b>	4	1	<b>5</b>	0	0	<b>0</b>	0	1	<b>1</b>	4	2	<b>6</b>
Prova do laço positiva	0	0	<b>0</b>	6	0	<b>6</b>	0	1	<b>1</b>	1	1	<b>2</b>	7	2	<b>9</b>
Sangramento	0	14	<b>14</b>	0	5	<b>5</b>	0	13	<b>13</b>	0	2	<b>2</b>	0	50	<b>50</b>
Vômito	15	22	<b>37</b>	8	4	<b>12</b>	7	18	<b>25</b>	9	13	<b>22</b>	39	57	<b>96</b>

Tabela 7.6-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV-1

Variáveis	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DENV-1						ANTIGENEMIA DENV-1			VIREMIA DENV-1					
	DSSA	%	DCSA/DG	%	Total	%	p-valor	OR (IC)	OR <sub>AJ</sub>	n	%	p-valor	n	%	p-valor
<b>Sexo</b>							0,689					0,508			0,370
Feminino	20	43,5	9	50,0	29	45,3				29	45,3		23	45,1	
Masculino	26	56,5	9	50,0	35	54,7				35	54,7		28	54,9	
Total	46	100,0	18	100,0	64	100,0				64	100,0		51	100	
<b>Faixa etária*#</b>							0,101					0,052			0,355
≤ 12	2	4,4	2	11,1	4	6,3				4	6,3		4	8,0	
13-19	1	2,2	3	16,7	4	6,3				4	6,3		4	8,0	
20-59	40	88,9	13	72,2	53	84,1				53	84,1		41	82,0	
≥60	2	4,4	0	0,0	2	3,2				2	3,2		1	2,0	
Total	45	100,0	18	100,0	63	100,0				63	100,0		50	100,0	
<b>Resposta imune</b>							NA					NA			NA
Infecção primária	46	100,0	18	100,0	64	100,0				64	100,0		51	100,0	
Infecção secundária	0	0,0	0	0,0	0	0,0				0	0,0		0	0,0	
Total	46	100,0	18	100,0	64	100,0				64	100,0		51	100,0	
<b>Número de dias de doença</b>							0,463					0,602			0,506
0-1	13	28,3	4	22,2	17	26,6				17	26,6		16	31,4	
2-3	20	43,5	6	33,3	26	40,6				26	40,6		23	45,1	
4-5	13	28,3	8	44,4	21	32,8				21	32,8		12	23,5	
Total	46	100,0	18	100,0	64	100,0				64	100,0		51	100,0	
<b>Antigenemia da NS1**</b>							0,030					NA			0,487
Total	46	100,0	18	100,0	64	100,0				NA	NA		51	100,0	
<b>Viremia***</b>							0,477					0,487			NA
Total	35	100,0	16	100,0	51	100,0				51	100,0		NA	NA	

NA-Não se aplica. \*Constam apenas os pacientes com informação quanto à idade nas fichas epidemiológicas. # A idade dos pacientes variou de 2 a 62 anos, com média igual a 31 anos.\*\*Constam apenas as amostras positivas para o teste Platelia. \*\*\*Constam apenas as amostras que formaram curva de amplificação.

Tabela 7.7-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV-2

Variáveis	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DENV-2							ANTIGENEMIA DENV-2				VIREMIA DENV-2			
	DSSA	%	DCSA/DG	%	Total	%	p-valor	OR (IC)	OR <sub>AJ</sub>	n	%	p-valor	n	%	p-valor
<b>Sexo</b>							0,111					0,823			0,648
Feminino	25	55,6	6	33,3	31	49,2		1,0		15	45,5		28	50,9	
Masculino	20	44,4	12	66,7	32	50,8		2,5 (0,79-7,83)		18	54,5		27	49,1	
Total	45	100,0	18	100,0	63	100,0				33	100,0		55	100,0	
<b>Faixa etária*#</b>							0,278					0,632			0,367
≤ 12	5	11,6	0	0,0	5	8,2				4	12,1		4	7,5	
13-19	2	4,7	1	5,6	3	4,9				0	0,0		3	5,7	
20-59	33	76,7	17	94,4	50	82,0				26	78,8		44	83,0	
≥60	3	7,0	0	0,0	3	4,9				3	9,1		2	3,8	
Total	43	100,0	18	100,0	61	100,0				33	100,0		53	100,0	
<b>Resposta imune</b>							0,400					0,463			<b>0,015</b>
Infecção primária	12	26,7	3	16,7	15	23,8				14	42,4		12	21,8	
Infecção secundária	33	73,3	15	83,3	48	76,2				19	57,6		43	78,2	
Total	45	100,0	18	100,0	63	100,0				33	100,0		55	100,0	
<b>Número de dias de doença</b>							0,818					0,539			0,342
0-1	14	31,1	5	27,8	19	30,2				10	30,3		18	32,7	
2-3	24	53,3	9	50,0	33	52,4				17	51,5		26	47,3	
4-5	7	15,6	4	22,2	11	17,5				6	18,2		11	20,0	
Total	45	100,0	18	100,0	63	100,0				33	100,0		55	100,0	
<b>Antigenemia da NS1**</b>							0,447					NA			0,602
Total	26	100,0	7,00	10,00	33	100,0				NA	NA		27	100,0	
<b>Viremia***</b>							0,362					0,602			NA
Total	40	100,0	15	100,0	55	100,0				27	100,0		NA	NA	

NA-Não se aplica.\*Constam apenas os pacientes com informação quanto à idade nas fichas epidemiológicas. # A idade dos pacientes variou de 7 a 81 anos, com média igual a 34,3 anos. \*\*Constam apenas as amostras positivas para o teste Platelia. \*\*\*Constam apenas as amostras que formaram curva de amplificação.



Tabela 7.8-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV-3

Variáveis	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DENV-3						ANTIGENEMIA DENV-3				VIREMIA DENV-3				
	DSSA	%	DCSA/DG	%	Total	%	p-valor	OR (IC)	OR <sub>AJ</sub>	n	%	p-valor	n	%	p-valor
<b>Sexo</b>							0,808					0,237			0,435
Feminino	18	52,9	19	55,9	37	54,4				35	56,5		35	53,0	
Masculino	16	47,1	15	44,1	31	45,6				27	43,5		31	47,0	
Total	34	100,0	34	100,0	68	100,0				62	100,0		66	100	
<b>Faixa etária*#</b>							0,114					0,898			<b>0,001</b>
≤ 12	1	3,4	5	16,7	6	10,2		1,0		4	7,4		6	10,5	
13-19	2	6,9	5	16,7	7	11,9		0,50 (0,03-7,45)		7	13,0		6	10,5	
20-59	22	75,9	19	63,3	41	69,5		0,17 (0,01-1,61)		38	70,4		41	71,9	
≥60	4	13,8	1	3,3	5	8,5		0,05 (0,00-1,07)		5	9,3		4	7,0	
Total	29	100,0	30	100,0	59	100,0				54	100,0		57	100,0	
<b>Resposta imune</b>							0,272					<b>0,012</b>			0,113
Infecção primária	27	79,4	23	67,6	50	73,5				47	75,8		50	75,8	
Infecção secundária	7	20,6	11	32,4	18	26,5				15	24,2		16	24,2	
Total	34	100,0	34	100,0	68	100,0				62	100,0		66	100,0	
<b>Número de dias de doença</b>							0,325					<b>0,035</b>			<b>0,013</b>
0-1	4	11,8	5	14,7	9	13,2				8	12,9		9	13,6	
2-3	22	64,7	16	47,1	38	55,9				37	59,7		36	54,5	
4-5	8	23,5	13	38,2	21	30,9				17	27,4		21	31,8	
Total	34	100,0	34	100,0	68	100,0				62	100,0		66	100,0	
<b>Antigenemia da NS1**</b>							0,648					NA			0,093
Total	33	100,0	29	100,0	62	100,0				NA	NA		60	100,0	
<b>Viremia***</b>							0,442					0,093			NA
Total	33	100,0	33	100,0	66	100,0				60	100,0		NA	NA	

NA-Não se aplica. \*Constam apenas os pacientes com informação quanto à idade nas fichas epidemiológicas. # A idade dos pacientes variou de 2 a 74 anos, com média igual a 33,9 anos. \*\*Constam apenas as amostras positivas para o teste Platelia. \*\*\*Constam apenas as amostras que formaram curva de amplificação.

Tabela 7.9-Associações entre os desfechos apresentação clínica, antigenemia da NS1 e viremia e as variáveis do estudo para DENV-4

Variáveis	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DENV-4						ANTIGENEMIA DENV-4			VIREMIA DENV-4					
	DSSA	%	DCSA/DG	%	Total	%	p-valor	OR (IC)	OR <sub>AJ</sub>	n	%	p-valor	n	%	p-valor
<b>Sexo</b>							0,451					0,650			0,416
Feminino	29	74,4	23	82,1	52	77,6				39	76,5		51	78,5	
Masculino	10	25,6	5	17,9	15	22,4				12	23,5		14	21,5	
Total	39	100,0	28	100,0	67	100,0				51	100,0		65	100,0	
<b>Faixa etária*#</b>							0,386					0,650			0,407
≤ 12	2	5,4	3	10,7	5	7,7				3	6,1		5	7,9	
13-19	3	8,1	5	17,9	8	12,3				8	16,3		7	11,1	
20-59	28	75,7	19	67,9	47	72,3				35	71,4		46	73,0	
≥60	4	10,8	1	3,6	5	7,7				3	6,1		5	7,9	
Total	37	100,0	28	100,0	65	100,0				49	100,0		63	100,0	
<b>Resposta imune</b>							0,375					0,185			0,346
Infecção primária	18	46,2	16	57,1	34	50,7				29	56,9		33	50,8	
Infecção secundária	21	53,8	12	42,9	33	49,3				22	43,1		32	49,2	
Total	39	100,0	28	100,0	67	100,0				51	100,0		65	100,0	
<b>Número de dias de doença</b>							0,071					0,608			<0,0001
0-1	18	46,2	7	25,0	25	37,3		1		19	37,3		25	38,5	
2-3	18	46,2	14	50,0	32	47,8		2,0 (0,65-6,11)		25	49,0		30	46,2	
4-5	3	7,7	7	25,0	10	14,9		<b>6,0 (1,19-30,01)</b>		7	13,7		10	15,4	
Total	39	100,0	28	100,0	67	100,0				51	100,0		65	100,0	
<b>Antigenemia da NS1**</b>							0,410					NA			0,875
Total	28	100,0	23	100,0	51	100,0				NA	NA		50	100,0	
<b>Viremia***</b>							0,443					0,875			NA
Total	38	100,0	27	100,0	65	100,0				50	100,0		NA	NA	

NA-Não se aplica. \*Constam apenas os pacientes com informação quanto à idade nas fichas epidemiológicas. # A idade dos pacientes variou de 6 a 73 anos, com média igual a 34,4 anos.\*\*Constam apenas as amostras positivas para o teste Platelia. \*\*\*Constam apenas as amostras que formaram curva de amplificação

### 7.2.1 – Apresentação clínica do estudo 2

A variável desfecho apresentação clínica foi analisada em comparação com as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença, sorotipo, antigenemia da NS1 e viremia. Entre estas, apenas a variável antigenemia da NS1 foi significativa, para DENV-1, como mostrado nas tabelas 7.6, 7.7, 7.8 e 7.9.

Em relação ao sexo, apesar de não haver significância estatística ( $p$ -valor=0,111), o DENV-2 mostrou chance 2,5 vezes maior (OR=2,5; IC:0,79-7,83) dos homens desenvolverem sinais de alerta/dengue grave em relação às mulheres. Esse valor poderia indicar uma associação real, mas a redução brusca no número amostral pode ter retirado a possibilidade de significância estatística (de 262 casos nas análises com DENV no estudo 1 para 63 casos nas análises com DENV-2 no estudo 2).

Em relação à faixa etária, é importante destacar que não havia informação quanto à idade em: 1) uma ficha epidemiológica referente à infecção por DENV-1; 2) duas fichas epidemiológicas referentes à infecção por DENV-2; 3) nove fichas epidemiológicas referentes à infecção por DENV-3; e 4) duas fichas epidemiológicas referentes à infecção por DENV-4.

Quanto aos pacientes infectados pelo DENV-1, ainda que o  $p$ -valor tenha sido significativo para análise univariada ( $p$ -valor=0,101), a relação entre a gravidade da dengue e a faixa etária não foi confirmada pela regressão logística ( $p=1.0$  no intercepto do modelo). Esse valor pode indicar uma não associação real, mas a redução no número amostral pode ter retirado a possibilidade de significância estatística (de 262 casos na análise com DENV no estudo 1 para 64 casos na análise com DENV-1 no estudo 2). No que se refere ao DENV-3, os pacientes com idade igual ou inferior a 12 anos tiveram chance 50% maior (OR=0,50;IC:0,03-7,45) de apresentar sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles de 13 a 19 anos, 83% maior (OR=0,17;IC:0,01-1,61) em relação àqueles de 20 a 59 anos, e 95% maior (OR=0,05;IC:0,00-1,07) em relação àqueles com idade igual ou superior a 60 anos, ainda que nenhuma associação tenha tido significância estatística. Sendo assim, a redução da idade aumentou a chance de gravidade, porém sem significância. Contudo, apesar do  $p$ -valor ter sido significativo para a análise univariada, a estimativa do risco não teve significância estatística para nenhuma associação. Existe uma indicação de uma tendência que pode ser real. Talvez a significância pudesse ter sido encontrada caso o número amostral tivesse sido maior.

No que se refere à variável resposta imune nos pacientes infectados pelo DENV-1, nenhuma medida de associação foi calculada, haja vista que 100% das infecções por esse sorotipo são primárias.

Em relação à variável número de dias de doença quanto ao DENV-4 (p-valor=0,071), pela análise univariada, os pacientes com 4 a 5 dias de doença tiveram chance significativa 6 vezes maior (OR=6,0; IC:1,19-30,01) de apresentar sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com 0 a 1 dia de doença. Ainda que sem significância estatística, os pacientes com 2 a 3 dias de doença tiveram chance 2 vezes maior (OR=2,0; IC:0,65-6,11) de apresentar sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com 0 a 1 dia de doença. A relação parece ser evidenciada mesmo com a redução de quatro vezes, aproximadamente, do número amostral (de 262 casos no estudo 1 para 67 casos no estudo 2), o que poderia levar à perda de significância nas associações. Os dados mostram uma associação positiva forte entre o aumento do número de dias de doença com o aumento na gravidade, com significância estatística, o que faz com que essa associação seja possivelmente real dentro do estudo.

Em relação à variável antigenemia da NS1, é importante destacar que DENV-1 foi o único sorotipo que apresentou associação com a apresentação clínica (p-valor=0,030), mostrando títulos de NS1 mais altos nos pacientes sem sinais de alerta/dengue grave. O grupo DSSA com DENV-1 apresentou níveis de NS1 que variaram de 25 a 78125, com mediana igual a 3125 (IQR:625-31250). O grupo DCSA/DG apresentou níveis de NS1 que variaram de 5 a 78125, com mediana igual a 3125 (IQR:625-3125).

No que se refere ao DENV-2, não foi observada relação estatística significativa entre antigenemia da NS1 e apresentação clínica (p-valor=0,447). O grupo DSSA apresentou níveis de NS1 que variaram de 125 a 78125, com mediana igual a 3125 (IQR:625-78125). O grupo DCSA/DG apresentou níveis de NS1 que variaram de 625 a 78125, com mediana igual a 3125 (IQR:625-3125).

Quanto ao DENV-3, não foi observada relação estatística significativa entre antigenemia da NS1 e apresentação clínica (p-valor=0,648). O grupo DSSA apresentou níveis de NS1 que variaram de 25 a 78125, com mediana igual a 15625 (IQR:9375-78125). O grupo DCSA/DG apresentou níveis de NS1 que variaram de 125 a 78125, com mediana igual a 15625 (IQR:3125-78125).

Quanto ao DENV-4, não foi observada relação estatística significativa entre antigenemia da NS1 e apresentação clínica (p-valor=0,410). O grupo DSSA apresentou níveis de NS1 que variaram de 5 a 15625, com mediana igual a 25 (IQR:5-125). O grupo DCSA/DG apresentou níveis de NS1 que variaram de 5 a 15625, com mediana igual a 25 (IQR:25-125) (Figura 7.11).

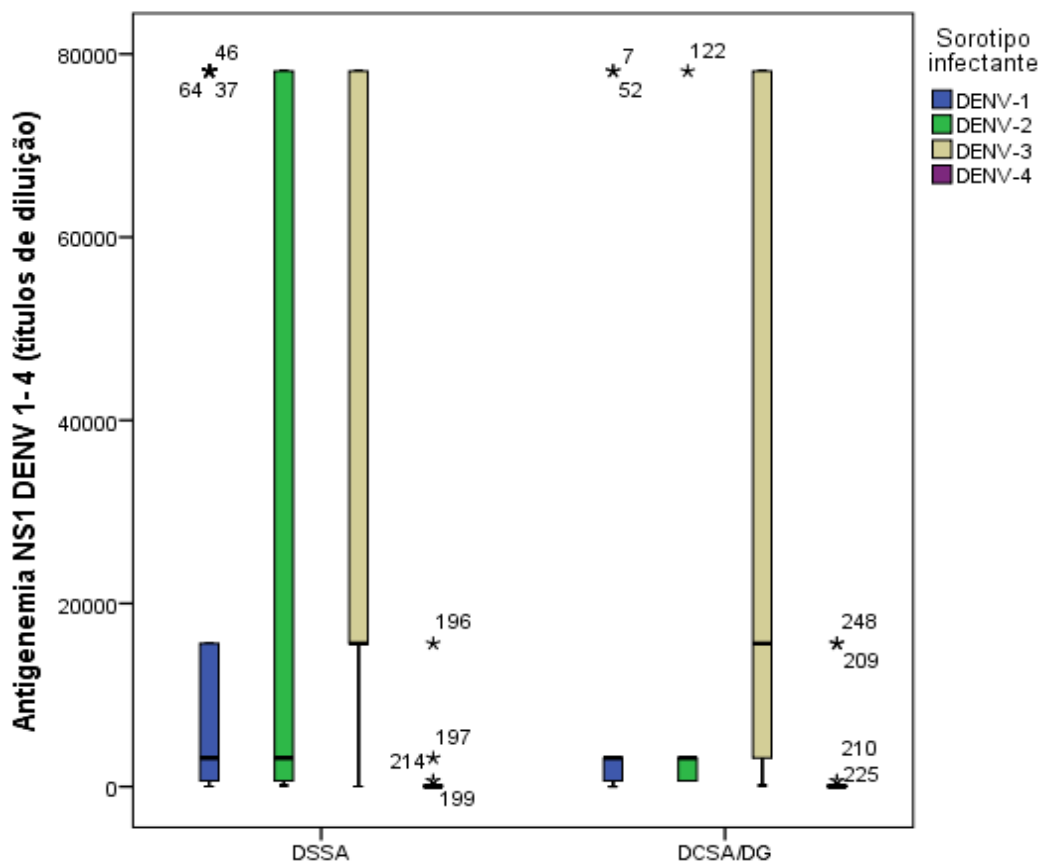


Figura 7.11-Níveis circulantes de NS1 em pacientes infectados por **DENV-1** [DSSA n=46, mediana=3125 (IQR:625-31250); DCSA/DG n=18, mediana=3125 (IQR:625-3125)] (p-valor=0,030), **DENV-2** [DSSA n=26, mediana=3125 (IQR:625-78125); DCSA/DG n=7, mediana=3125 (IQR:625-3125)] (p-valor=0,447), **DENV-3** [DSSA n=33, mediana=15625 (IQR:9375-78125); DCSA/DG n=29, mediana=15625 (IQR:3125-78125)] (p-valor=0,648) ou **DENV-4** [DSSA n=28, mediana=25 (IQR:5-125); DCSA/DG n=23, mediana=25 (IQR:25-125)] (p-valor=0,410). p<0,05 foi considerado significativo.

Com relação à variável viremia, não foi observada associação estatisticamente significativa com a apresentação clínica para os sorotipos 1 (p-valor=0,477), 2 (p-valor=0,362), 3 (p-valor=0,442) ou 4 (p-valor=0,443). A distribuição da carga viral nos grupos DSSA e DCSA/DG por sorotipo encontra-se na figura 7.12.

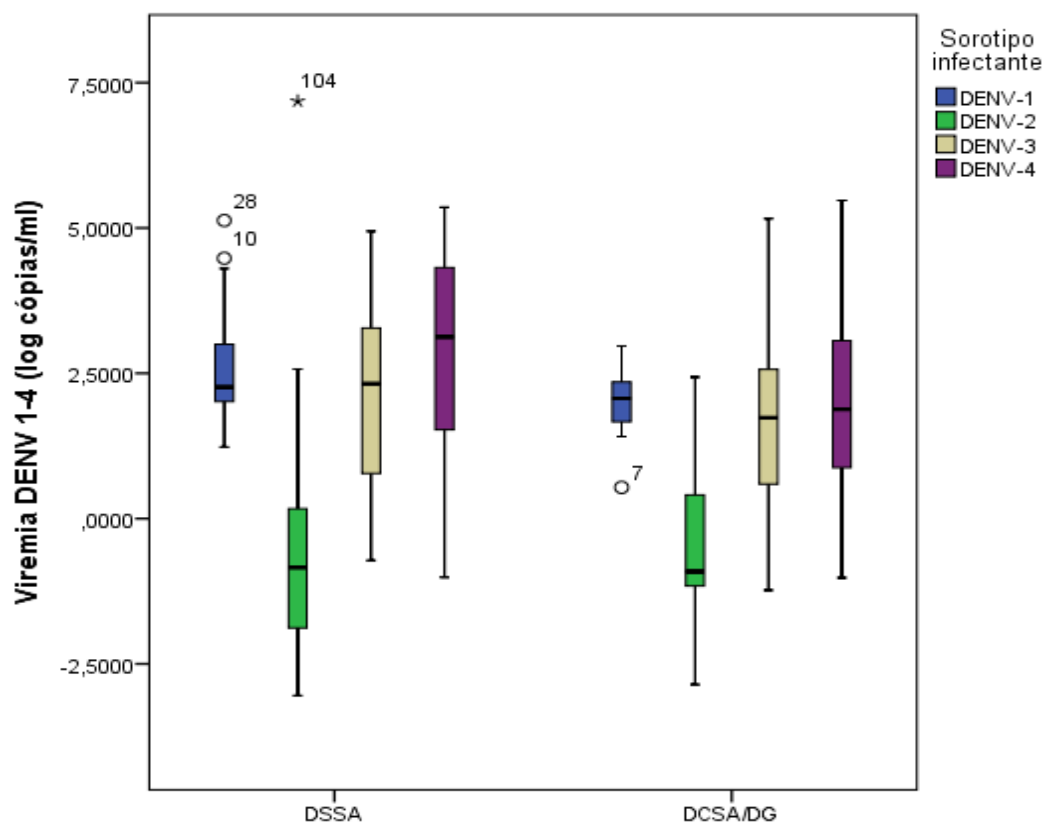


Figura 7.12-Carga viral em pacientes infectados por **DENV-1** [DSSA n=35, mediana=2,26 log cópias/ml (IQR:2,01-3,08 log cópias/ml); DCSA/DG n= 16, mediana=2,07 log cópias/ml (IQR:1,67-2,36 log cópias/ml)] (p-valor=0,477), **DENV-2** [DSSA n=40, mediana=-0,84 log cópias/ml (IQR:-1,92-0,22 log cópias/ml); DCSA/DG n=15, mediana=-0,91 log cópias/ml (IQR:-1,17-0,79 log cópias/ml)] (p-valor=0,362), **DENV-3** [DSSA n=33, mediana=2,32 log cópias/ml (IQR:0,76-3,32 log cópias/ml); DCSA/DG n=33, mediana=1,74 log cópias/ml (IQR:0,55-2,80 log cópias/ml)] (p-valor=0,442) ou **DENV-4** [DSSA n=38, mediana=3,13 log cópias/ml (IQR:1,50-4,32 log cópias/ml); DCSA/DG n=27, mediana=1,88 log cópias/ml (IQR:0,81-3,28 log cópias/ml)] (p-valor=0,443).  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### 7.2.2 – Antigenemia da NS1

A variável desfecho antigenemia da NS1 foi analisada em comparação com as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença, sorotipo e viremia. As tabelas 7.6, 7.7, 7.8 e 7.9 mostram que DENV-3 foi o único sorotipo que apresentou relação com o desfecho antigenemia da NS1: observamos associação com as variáveis resposta imune e número de dias de doença.

No que se refere à variável resposta imune, é importante destacar que os pacientes com infecção primária [mediana=15625 (IQR:3125-78125), valor mínimo 625 e valor máximo 78125] por DENV-3 apresentaram títulos discretamente mais altos de NS1 circulante em

relação aos pacientes com infecção secundária [mediana=15625 (IQR:125-78125), valor mínimo 25 e valor máximo 78125] (p-valor=0,012) (Figura 7.13).

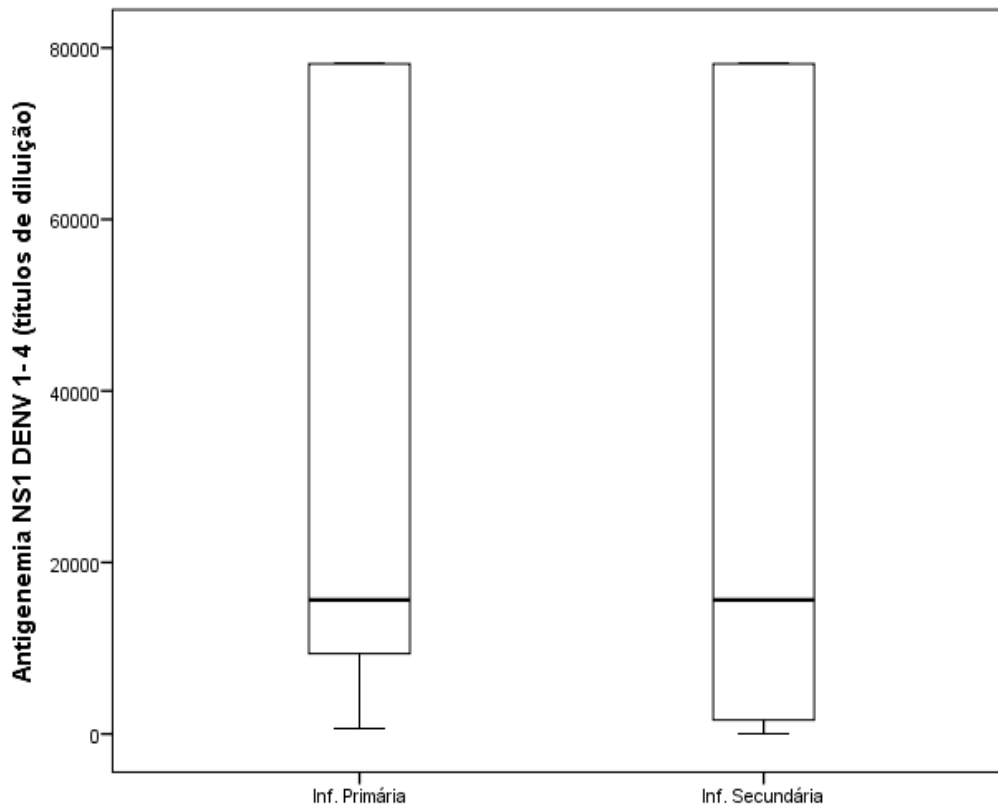


Figura 7.13-Níveis circulantes de NS1 em pacientes infectados por DENV-3 com infecção primária [n=47, mediana=15625 (IQR:3125-78125)] ou com infecção secundária [n=15, mediana=15625 (IQR:125-78125)] (p-valor=0,012). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Em relação à variável número de dias de doença, foi estabelecida uma relação significativa e ordinal com a antigenemia da NS1 quanto ao DENV-3, mostrando que a antigenemia da NS1 aumenta à medida que o número de dias aumenta (dia 0-1, mediana=3125 (IQR:875-12500); dias 2-3, mediana=15625 (IQR:9375-78125); dias 4-5, mediana=78125 (IQR:15625-78125) (p-valor=0,035) (Figura 7.14).

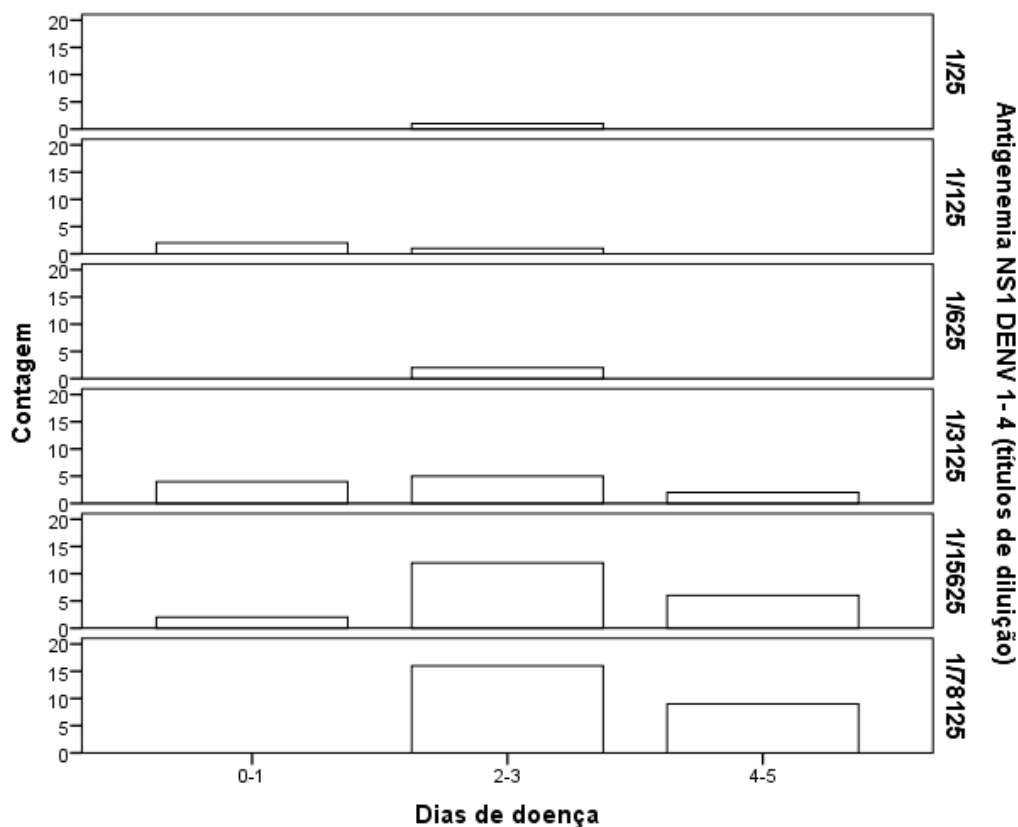


Figura 7.14-Níveis circulantes de NS1 em pacientes infectados por DENV-3 com 0-1 dia de doença [n=8, mediana=3125 (IQR:875-12500)], com 2-3 dias de doença [n=37, mediana=15625 (IQR:9375-78125)] ou com 4-5 dias de doença [n=17, mediana=78125 (IQR:15625-78125)] (p-valor=0,035). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança. p<0,05 foi considerado significativo.

### 7.2.3 – Viremia

O desfecho viremia foi analisado em comparação com as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença e sorotipo. Entre estas, DENV-2 mostrou associação apenas com a variável resposta imune (Tabela 7.7), DENV-3 mostrou associação com faixa etária e número de dias de doença (Tabela 7.8), e DENV-4 mostrou associação apenas com número de dias de doença (Tabela 7.9).

Em relação à variável faixa etária, é importante ressaltar que os pacientes infectados pelo DENV-3 e com idade igual ou superior a 60 anos apresentaram viremia discretamente maior [mediana=3,63 log cópias/ml (IQR:2,19-4,80 log cópias/ml)], seguindo-se os pacientes de 20 a 59 anos [mediana=2,31 log cópias/ml (IQR:1,33-3,24 log cópias/ml)], 13 a 19 anos [mediana=0,85 log cópias/ml (IQR:0,13-2,94 log cópias/ml)] e pacientes com idade igual ou



inferior a 12 anos [mediana=0,43 log cópias/ml (IQR:-1,09-2,18 log cópias/ml)] (p-valor=0,001) (Figura 7.15). Houve 9 pacientes sem registro de idade na ficha epidemiológica.

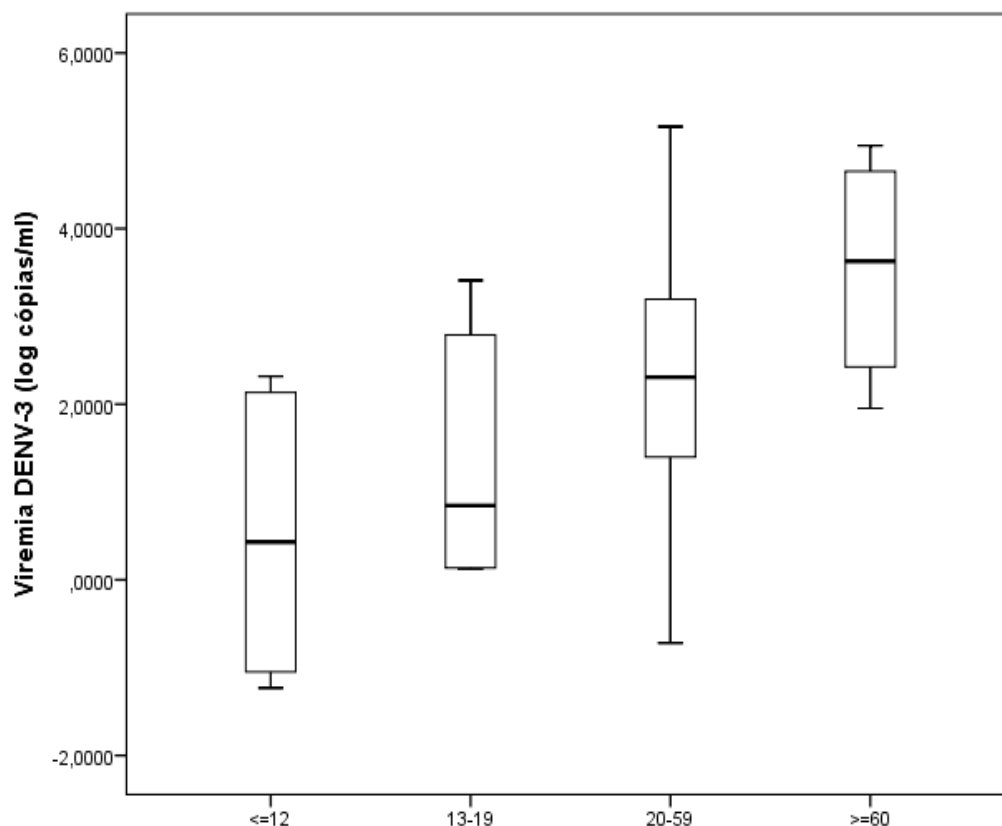


Figura 7.15-Carga viral em pacientes com idade  $\leq 12$  anos [n=6, mediana=0,43 log cópias/ml (IQR:-1,09-2,18 log cópias/ml)], de 13-19 anos [n=6, mediana=0,85 log cópias/ml (IQR:0,13-2,94 log cópias/ml)], de 20-59 anos [n=41, mediana=2,31 log cópias/ml (IQR:1,33-3,24 log cópias/ml)] ou com idade  $\geq 60$  anos [n=4, mediana=3,63 log cópias/ml (IQR:2,19-4,80 log cópias/ml)] (p-valor=0,001). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartílico (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

No que se refere à variável resposta imune, os pacientes infectados pelo DENV-2 com infecção primária [mediana= -0,07 log cópias/ml (IQR:-0,97-0,98 log cópias/ml)] apresentaram viremia discretamente mais alta que pacientes com infecção secundária [mediana= -1,04 log cópias/ml (IQR:-1,95-0,02)] (p-valor=0,015) (Figura 7.16).

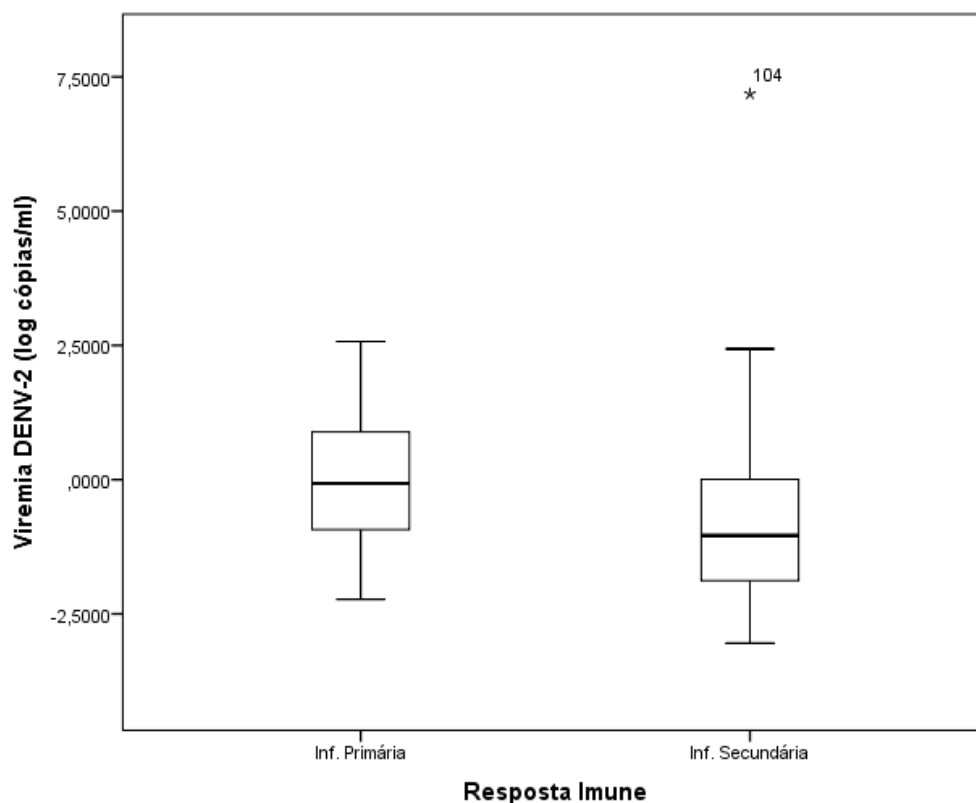


Figura 7.16-Carga viral em pacientes infectados por DENV-2 com infecção primária [n=12, mediana=-0,07 log cópias/ml (IQR:-0,97-0,98 log cópias/ml)] ou com infecção secundária [n=43, mediana=-1,04 log cópias/ml (IQR:-1,95-0,02 log cópias/ml)] (p-valor=0,015). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

No que se refere à variável número de dias de doença, a viremia encontrada em pacientes com 0 a 1 dia de doença infectados pelo DENV-3 [mediana=2,34 log cópias/ml (IQR:2,30-3,43 log cópias/ml)] ou pelo DENV-4 [mediana=3,20 log cópias/ml (IQR:1,51-4,39 log cópias/ml)] apresentou-se mais alta em relação aos pacientes com 2 a 3 dias [DENV-3, mediana=2,23 log cópias/ml (IQR:0,74-3,40 log cópias/ml) e DENV-4, mediana=2,70 log cópias/ml (IQR:1,50-3,55 log cópias/ml)] e 4 a 5 dias de doença [DENV-3, mediana=1,26 log cópias/ml (IQR:0,30-2,41 log cópias/ml) e DENV-4, mediana=1,43 log cópias/ml (IQR:0,50-2,12 log cópias/ml)] (DENV-3 p-valor=0,013 e DENV-4 p-valor<0,0001) (Figuras 7.17 e 7.18).

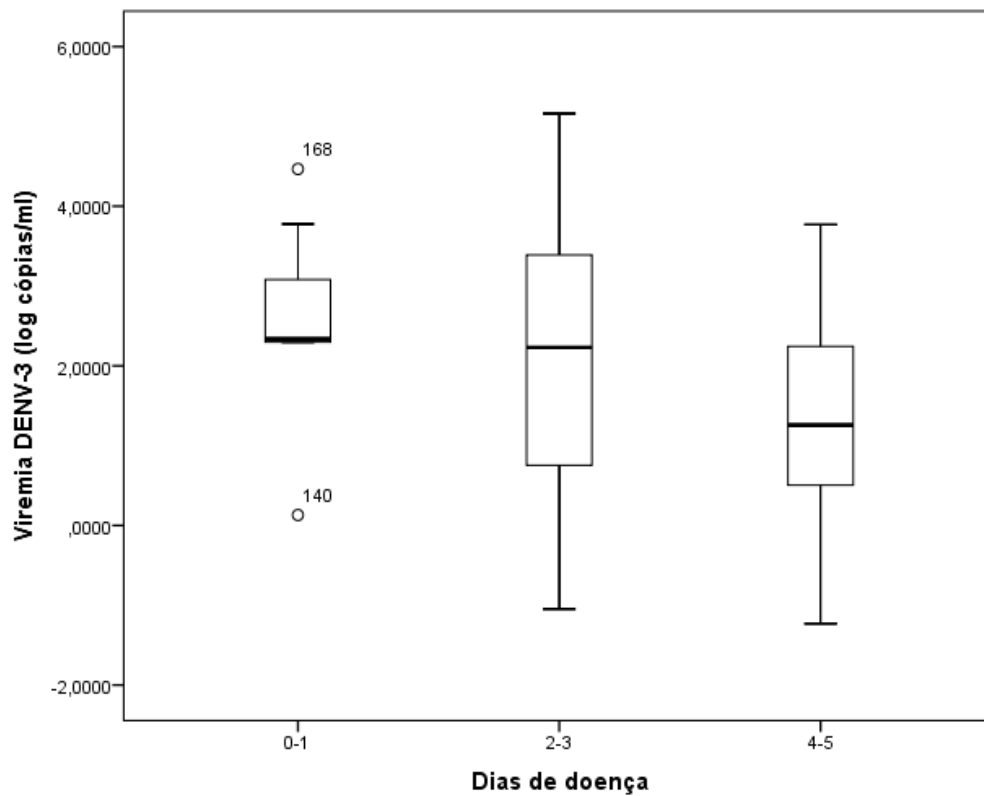


Figura 7.17-Carga viral em pacientes infectados por DENV-3 com 0-1 dia de doença [n=9, mediana=2,34 log cópias/ml (IQR:2,30-3,43 log cópias/ml)], com 2-3 dias de doença [n=36, mediana=2,23 log cópias/ml (IQR:0,74-3,40 log cópias/ml)] ou com 4-5 dias de doença [n=21, mediana=1,26 log cópias/ml (IQR:0,30-2,41 log cópias/ml)] (p-valor=0,013). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

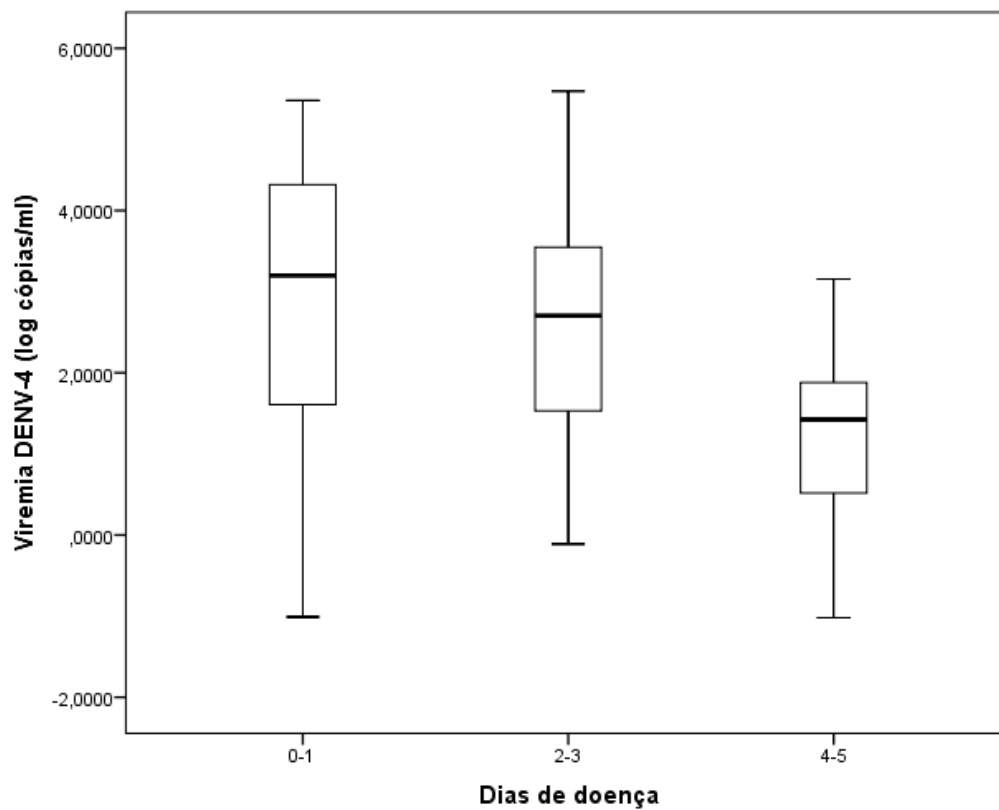


Figura 7.18-Carga viral em pacientes infectados por DENV-4 com 0-1 dia de doença [n=25, mediana=3,20 log cópias/ml (IQR:1,51-4,39 log cópias/ml)], com 2-3 dias de doença [n=30, mediana=2,70 log cópias/ml (IQR:1,50-3,55 log cópias/ml)] ou com 4-5 dias de doença [n=10, mediana=1,43 log cópias/ml (IQR:0,50-2,12 log cópias/ml)] (p-valor<0,0001). Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartil (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança. p<0,05 foi considerado significativo.

### 7.3 – ESTUDO 3

No estudo 3, foram analisadas 63 amostras da linhagem I do DENV-2, de 1990 a 2001, referentes ao período que circulou apenas a linhagem I do DENV-2 (1990 a 2007), e que fizeram parte dos estudos 1 e 2, e 66 amostras da linhagem II do DENV-2, de 2007 a 2011, referentes ao período que circulou apenas a linhagem II do DENV-2 (a partir de 2007). Essas amostras foram selecionadas objetivando estudar o comportamento das linhagens I e II do DENV-2 quanto à apresentação clínica da doença e à viremia, como desfechos, e quanto às variáveis sexo, faixa etária, resposta imune e número de dias de doença.

Os dados sócio-demográficos dos pacientes do estudo relacionadas aos sorotipos infectantes de DENV e os sinais e sintomas estão decritos nas tabelas 7.10 e 7.11 respectivamente.

A tabela 7.12 mostra que a linhagem II do DENV-2 apresentou associação entre as variáveis faixa etária e número de dias de doença com relação à variável desfecho apresentação clínica, e apenas entre a variável número de dias de doença e a variável desfecho viremia.

A tabela 7.13 compara as linhagens I e II do DENV-2 com relação aos valores encontrados para as associações entre o desfecho viremia e as variáveis apresentação clínica, sexo, faixa etária, resposta imune e número de dias de doença. A linhagem I do DENV-2 apresentou associação apenas entre a resposta imune e o desfecho viremia.

Tabela 7.10- Características sócio-demográficas e parâmetros clínicos dos pacientes relacionadas às linhagens I e II do DENV-2

Variáveis	DENV-2 Linhagem I			DENV-2 Linhagem II			Total		
	N=63 (%)			N=66 (%)			N=129 (%)		
	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total
<b>Demográficas</b>									
<i>Sexo</i>									
Masculino	20 (44,4)	12 (66,7)	32 (50,8)	29 (51,8)	6 (60,0)	35 (53,0)	49 (48,5)	18 (64,3)	67 (51,9)
Feminino	25 (55,6)	6 (33,3)	31 (49,2)	27 (48,2)	4 (40,0)	31 (47,0)	52 (51,5)	10 (35,7)	62 (48,1)
Total	45 (100,0)	18 (100,0)	63 (100,0)	56 (100,0)	10 (100,0)	66 (100,0)	101 (100,0)	28 (100,0)	129 (100,0)
<i>Faixa etária</i>									
Crianças (≤ 12 anos)	5 (11,6)	0	5 (8,2)	5 (10,9)	5 (50,0)	10 (17,9)	10 (11,2)	5 (17,9)	15 (12,8)
Jovens (13-19 anos)	2 (4,7)	1 (5,6)	3 (4,9)	5 (10,9)	1 (10,0)	6 (10,7)	7 (7,9)	2 (7,1)	9 (7,7)
Adultos (20-59 anos)	33 (76,7)	17 (94,4)	50 (82,0)	32 (69,6)	3 (30,0)	35 (62,5)	65 (73,0)	20 (71,4)	85 (72,6)
Idosos (≥60 anos)	3 (7,0)	0	3 (4,9)	4 (8,7)	1 (10,0)	5 (8,9)	7 (7,9)	1 (3,6)	8 (6,8)
Ausentes	2			10			12		12
Total	43 (100,0)	18 (100,0)	61 (100,0)	46 (100,0)	10 (100,0)	56 (100,0)	89 (100,0)	28 (100,0)	117 (100,0)
<b>Clínicas</b>									
<i>Resposta imune</i>									
Primárias	12 (26,7)	3 (16,7)	15 (23,8)	34 (60,7)	3 (60,0)	37 (60,7)	46 (45,5)	6 (26,1)	52 (41,9)
Secundárias	33 (73,3)	15 (83,3)	48 (76,2)	22 (39,3)	2 (40,0)	24 (39,3)	55 (54,5)	17 (73,9)	72 (58,1)
Ausentes					5				5
Total	45 (100,0)	18 (100,0)	63 (100,0)	56 (100,0)	5 (100,0)	61 (100,0)	101 (100,0)	23 (100,0)	124 (100,0)
<i>N. dias de doença</i>									
0-1	14 (31,1)	5 (27,8)	19 (30,2)	11 (19,6)	1 (10,0)	12 (18,2)	25 (24,8)	6 (21,4)	31 (24,0)
2-3	24 (53,3)	9 (50,0)	33 (52,4)	36 (64,3)	2 (20,0)	38 (57,6)	60 (59,4)	11 (39,3)	71 (55,0)
4-5	7 (15,6)	4 (22,2)	11 (17,5)	9 (16,1)	7 (70,0)	16 (24,2)	16 (15,8)	11 (39,3)	27 (20,9)
Total	45 (100,0)	18 (100,0)	63 (100,0)	56 (100,0)	10 (100,0)	66 (100,0)	101 (100,0)	28 (100,0)	129 (100,0)

Tabela 7.11-Sinais e sintomas observados nos pacientes com dengue, linhagens I e II do DENV-2

<i>Sinais/sintomas</i>	DENV-2 Linhagem I			DENV-2 linhagem II			Total		
	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total	DSSA	DCSA/DG	Total
Alteração SNC	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>
Anorexia	18	16	<b>34</b>	27	2	<b>29</b>	45	18	<b>63</b>
Artralgia	17	17	<b>34</b>	27	3	<b>30</b>	44	20	<b>64</b>
Astenia	21	11	<b>32</b>	16	3	<b>19</b>	37	14	<b>51</b>
Cefaleia	36	22	<b>58</b>	48	6	<b>54</b>	84	28	<b>112</b>
Choque	0	7	<b>7</b>	0	0	<b>0</b>	0	7	<b>7</b>
Diarreia	5	8	<b>13</b>	14	2	<b>16</b>	19	10	<b>29</b>
Dor abdominal	2	2	<b>4</b>	10	3	<b>13</b>	12	5	<b>17</b>
Dor retro-orbitária	19	17	<b>36</b>	30	4	<b>34</b>	49	21	<b>70</b>
Epistaxe	0	1	<b>1</b>	0	2	<b>2</b>	0	3	<b>3</b>
Exantema	3	9	<b>12</b>	10	2	<b>12</b>	13	11	<b>24</b>
Febre	30	20	<b>50</b>	56	10	<b>66</b>	86	30	<b>116</b>
Hematêmese	0	1	<b>1</b>	0	0	<b>0</b>	0	1	<b>1</b>
Hemorragia	0	1	<b>1</b>	0	0	<b>0</b>	0	1	<b>1</b>
Hipotensão	0	0	<b>0</b>	8	1	<b>9</b>	8	1	<b>9</b>
Lombalgia	6	8	<b>14</b>	7	0	<b>7</b>	13	8	<b>21</b>
Mialgia	31	22	<b>53</b>	43	6	<b>49</b>	74	28	<b>102</b>
Náusea	17	4	<b>21</b>	6	0	<b>6</b>	23	4	<b>27</b>
Náusea/ vômito	0	11	<b>11</b>	31	6	<b>37</b>	31	17	<b>48</b>
óbito	0	0	<b>0</b>	0	3	<b>3</b>	0	3	<b>3</b>
Parestesia	2	1	<b>3</b>	2	0	<b>2</b>	4	1	<b>5</b>
Petéquias	2	2	<b>4</b>	3	2	<b>5</b>	5	4	<b>9</b>
Prostração	27	19	<b>46</b>	44	6	<b>50</b>	71	25	<b>96</b>
Prova do laço negativa	4	1	<b>5</b>	0	0	<b>0</b>	4	1	<b>5</b>
Prova do laço positiva	6	0	<b>6</b>	1	1	<b>2</b>	7	1	<b>8</b>
Sangramento	0	5	<b>5</b>	0	4	<b>4</b>	0	9	<b>9</b>
Vômito	8	4	<b>12</b>	2	0	<b>2</b>	10	4	<b>14</b>

Tabela 7.12-Associações entre os desfechos apresentação clínica e viremia e as variáveis do estudo para DENV-2 linhagem II

Variáveis	APRESENTAÇÃO CLÍNICA					DENV-2 Linhagem II				VIREMIA		
	DSSA	%	DCSA/DG	%	Total	%	p-valor	OR (IC)	OR <sub>AJ</sub>	n	%	p-valor
<b>Sexo</b>							0,739					0,476
Feminino	27	48,2	4	40,0	31	47,0				29	46,0	
Masculino	29	51,8	6	60,0	35	53,0				34	54,0	
Total	56	100,0	10	100,0	66	100,0				63	100,0	
<b>Faixa etária*#</b>							<b>0,028</b>					0,353
≤ 12	5	10,9	5	50,0	10	17,9		1		7	13,2	
13-19	5	10,9	1	10,0	6	10,7		0,20 (0,01-2,38)		6	11,3	
20-59	32	69,6	3	30,0	35	62,5		<b>0,09 (0,01-0,52)</b>		35	66,0	
≥60	4	8,7	1	10,0	5	8,9		0,25 (0,02-3,09)		5	9,4	
Total	46	100,0	10	100,0	56	100,0				53	100,0	
<b>Resposta imune**</b>							0,975					0,848
Infecção primária	34	60,7	3	60,0	37	60,7				34	58,6	
Infecção secundária	22	39,3	2	40,0	24	39,3				24	41,4	
Total	56	100,0	5	100,0	61	100,0				58	100,0	
<b>Número de dias de doença</b>							<b>0,001</b>					<b>0,002</b>
0-1	11	19,6	1	10,0	12	18,2		1		12	19,0	
2-3	36	64,3	2	20,0	38	57,6		0,61(0,05-7,39)		37	58,7	
4-5	9	16,1	7	70,0	16	24,2		8,55(0,88-83,05)		14	22,2	
Total	56	100,0	10	100,0	66	100,0				63	100,0	
<b>Viremia***</b>							0,405					NA
Total	54	100,0	9	100,0	63	100,0				NA	NA	

NA-Não se aplica.\*Constam apenas os pacientes com informação quanto à idade nas fichas epidemiológicas. # A idade dos pacientes variou de 0 (5 meses) a 78 anos, com média igual a 30,8 anos.\*\*Perda de amostras sem volume suficiente para a realização do teste sorológico. \*\*\*Constam apenas as amostras que fomaram curva de amplificação.



Tabela 7.13-Associações entre o desfecho viremia e as variáveis do estudo para as linhagens I e II do DENV-2

Variáveis	VIREMIA***					
	Linhagem I			Linhagem II		
	Total	%	p-valor	Total	%	p-valor
<b>Apresentação clínica</b>			0,362			0,405
DSSA	<b>40</b>	72,7		<b>54</b>	8,6	
DCSA/DG	<b>15</b>	27,3		<b>9</b>	14,3	
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100,0</b>		<b>63</b>	<b>100,0</b>	
<b>Demográficas</b>			0,648			0,476
<i>Sexo</i>						
Feminino	<b>28</b>	50,9		<b>29</b>	46,0	
Masculino	<b>27</b>	49,1		<b>34</b>	54,0	
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>		<b>63</b>	<b>100,0</b>	
<i>Faixa etária*</i>			0,367			0,353
≤ 12	<b>4</b>	7,5		<b>7</b>	13,2	
13-19	<b>3</b>	5,7		<b>6</b>	11,3	
20-59	<b>44</b>	83,0		<b>35</b>	66,0	
≥60	<b>2</b>	3,8		<b>5</b>	9,4	
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>		<b>53</b>	<b>100,0</b>	
<b>Clínicas</b>						
<i>Resposta imune**</i>			<b>0,015</b>			0,848
Infecção primária	<b>12</b>	21,8		<b>34</b>	58,6	
Infecção secundária	<b>43</b>	78,2		<b>24</b>	41,4	
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100,0</b>		<b>58</b>	<b>100,0</b>	
<i>Número de dias de doença</i>			0,342			<b>0,002</b>
0-1	<b>18</b>	32,7		<b>12</b>	19,0	
2-3	<b>26</b>	47,3		<b>37</b>	58,7	
4-5	<b>11</b>	20,0		<b>14</b>	22,2	
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100,0</b>		<b>63</b>	<b>100,0</b>	

\*Constam apenas os pacientes com informação quanto à idade nas fichas epidemiológicas.

\*\*Perda de amostras sem volume suficiente para a realização do teste sorológico.

\*\*\*Constam apenas as amostras que formaram curva de amplificação.

### 7.3.1 – Apresentação clínica do estudo 3

O desfecho apresentação clínica foi analisado em comparação com as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune, número de dias de doença e viremia. Entre estas, as variáveis faixa etária e número de dias de doença foram significativas para a linhagem II do DENV-2 (tabela 7.12).

Em relação à faixa etária, é importante destacar que não havia informação quanto à idade em: 1) duas fichas epidemiológicas referentes à infecção por DENV-2 linhagem I; e 2) dez fichas epidemiológicas referentes à infecção por DENV-2 linhagem II.

Em relação à variável faixa etária, pelo modelo univariado, é importante ressaltar que existe claramente uma evidência de que a idade é um fator de risco para o desenvolvimento de sinais de alerta/dengue grave para a linhagem II do DENV-2 ( $p=0,028$ ), dado que a redução da idade leva a um aumento na chance de apresentar esses sinais. Ainda que sem significância estatística, os pacientes com idade igual ou inferior a 12 anos tiveram chance 80% maior de apresentar sinais de alerta/dengue grave em relação aos pacientes de 13 a 19 anos ( $OR=0,20$ ;  $IC:0,01-2,38$ ), e 75% maior em relação aos pacientes com idade igual ou superior a 60 anos ( $OR=0,25$ ;  $IC:0,02-3,09$ ). Os pacientes com idade igual ou inferior a 12 anos tiveram chance significativa 91% maior de apresentar sinais de alerta/dengue grave em relação aos pacientes de 20 a 59 anos ( $OR=0,09$ ;  $IC:0,01-0,52$ ).

No que se refere à variável número de dias de doença, pela análise do modelo univariado, para a linhagem II do DENV-2, ainda que o p-valor tenha sido significativo ( $p=0,001$ ), não foi estabelecida associação estatística entre a variável número de dias de doença e o desenvolvimento de sinais de alerta/dengue grave. As categorias 2-3 dias de doença ( $OR=0,61$ ,  $IC:0,05-7,39$ ) e 4-5 dias de doença ( $OR=8,55$ ,  $IC: 0,88-83,05$ ) apresentaram um longo intervalo de confiança, não evidenciando padrão entre elas. Além disso, o alto valor encontrado para a estimativa de risco da categoria 4-5 dias de doença foi considerado um efeito estatístico, sendo atribuído ao pequeno número amostral.

Foi construído um modelo multivariado com as variáveis faixa etária e número de dias de doença tendo a gravidade como desfecho para a linhagem II do DENV-2, contudo não foi observada significância para a variável número de dias de doença.

### 7.3.2 – Viremia

O desfecho viremia foi analisado em comparação com as variáveis sexo, faixa etária, resposta imune e número de dias de doença. Entre estas, a linhagem I do DENV-2 mostrou

associação apenas com a variável resposta imune, e a linhagem II do DENV-2 mostrou associação apenas com a variável número de dias de doença (Tabela 7.13 e Figura 7.19).

No que se refere à variável resposta imune, os pacientes infectados pelo DENV-2 linhagem I com infecção primária [mediana= -0,07 log cópias/ml (IQR:-0,97-0,98 log cópias/ml)] apresentaram viremia discretamente mais alta que pacientes com infecção secundária [mediana= -1,04 log cópias/ml (IQR:-1,95-0,02)] (p-valor=0,015), como mostrado na seção 7.2.3 (Figura 7.16).

Em relação à variável número de dias de doença, é importante destacar que a viremia dos pacientes infectados pela linhagem II do DENV-2 foi diminuindo à medida que o número de dias de doença progredia [dias 0-1, mediana=3,47 log cópias/ml (IQR:2,27-5,67 log cópias/ml); dias 2-3, mediana=1,90 log cópias/ml (IQR:0,94-3,11 log cópias/ml); dias 4-5, mediana=0,85 log cópias/ml (IQR:-0,78-1,91 log cópias/ml)] (p-valor=0,002) (Figura 7.19).

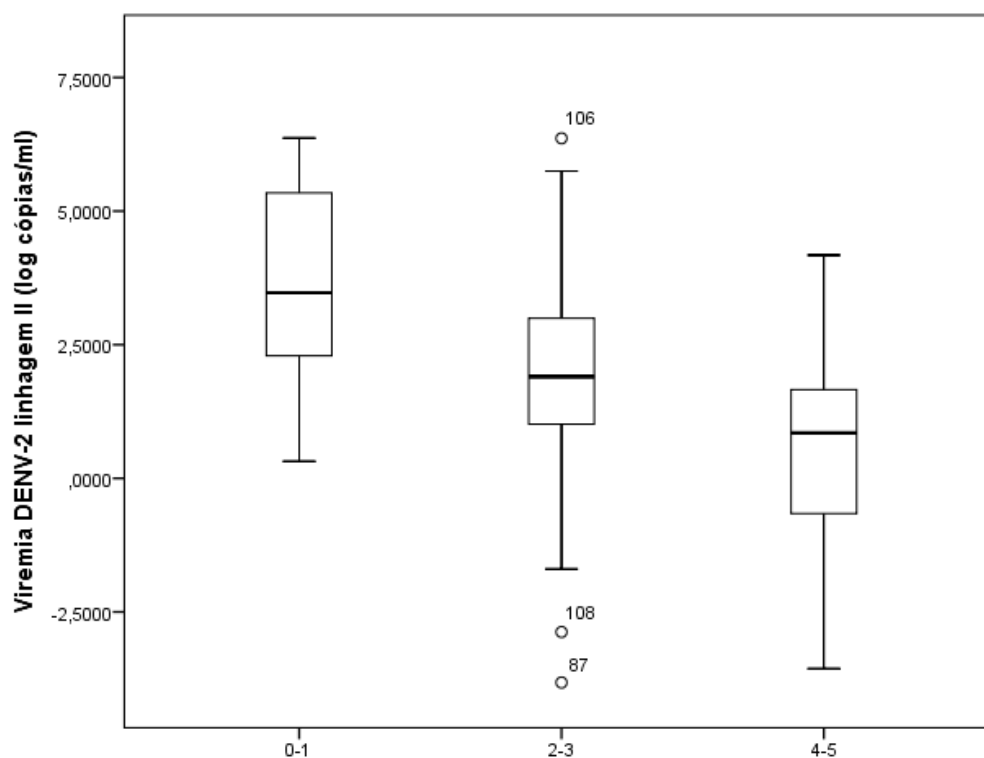


Figura 7.19-Carga viral em pacientes infectados por DENV-2 linhagem II com 0-1 dia de doença [n=12, mediana=3,47 log cópias/ml (IQR:2,27-5,67 log cópias/ml)], com 2-3 dias de doença [n=37, mediana=1,90 log cópias/ml (IQR:0,94-3,11 log cópias/ml)] ou com 4-5 dias de doença [n=14, mediana=0,85 log cópias/ml (IQR:-0,78-1,91 log cópias/ml)] (p-valor=0,002). As barras horizontais indicam os valores das medianas e o intervalo interquartílico. Caixas mostram valores das medianas (linhas horizontais nas caixas), 25-75% variação do intervalo interquartílico (IQR) (limites superior e inferior na caixa), 95% de intervalo de confiança. p<0,05 foi considerado significativo.

## 8 – DISCUSSÃO

A dengue é uma arbovirose causada por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV. Nas últimas cinco décadas, vêm sendo reportadas a emergência e a reemergência da dengue, com surtos cada vez mais frequentes e de gravidade maior, em áreas anteriormente não afetadas (Jain et al., 2017). A dengue é uma doença endêmica em mais de 100 países, e metade da população mundial vive em área de risco de infecção (WHO, 2016). Apesar da estimativa feita pela OMS de 50-100 milhões de infecções anuais, os números atuais superam os 390 milhões devido à vigilância inadequada, à subnotificação e a classificações equivocadas por outras doenças (Bhatt et al., 2013). A dengue tornou-se a maior preocupação na saúde pública mundial nos últimos anos, tendo um alto custo financeiro para a sociedade, principalmente em países em desenvolvimento (Jain et al., 2017).

Terapia antiviral específica ainda não está disponível, o que faz com que o tratamento seja exclusivamente sintomático (Pang et al., 2016). O padrão de atendimento é direcionado para o monitoramento constante dos pacientes, objetivando providenciar suporte de fluido, apropriado e em tempo hábil, para evitar o desenvolvimento de choque hipovolêmico (Alexander et al., 2011; Simmons et al., 2012).

Além da importância do diagnóstico precoce da dengue, é necessário o desenvolvimento de uma ferramenta prognóstica que identifique a gravidade da doença nos primeiros dias da infecção, de modo a orientar a triagem clínica para reduzir a progressão grave da dengue e o excesso de hospitalização (Lee et al., 2013b; Yacoub & Wills, 2014).

Em 2009, uma classificação revisada para a dengue foi apresentada pela OMS, tendo como alvo os clínicos, de modo a facilitar a identificação dos sinais de alerta durante a triagem, como indicadores de possível progressão para a dengue grave e, com isso, estabelecer tratamento imediato. Embora a presença de qualquer sinal de alerta tenha sido fortemente associada a resultados graves, apenas com esses sinais não é possível prever de forma independente a progressão da doença (Pang et al., 2016).

A grande diversidade de sinais e sintomas da dengue ainda é um desafio, particularmente em áreas endêmicas, o que é exacerbado pela necessidade de identificação precoce dos pacientes que evoluirão para a forma grave da doença. Até o momento, existe uma lacuna quanto à identificação de marcadores laboratoriais precoces para a gravidade da dengue.

No estudo 1 (n=262), não observamos associação da gravidade da dengue com o sexo. O mesmo foi observado por Nunes e colaboradores (2016) e Nguyen e colaboradores (2005). No entanto, o sexo feminino já foi apontado como um fator de risco para a progressão da forma grave da doença e o óbito em estudos com crianças (Halstead, 1970; Kabra et al., 1999; Phuong

et al., 2004; Anders et al., 2011). Em Singapura, 25% (146/596) das mulheres apresentaram maior risco de ter dengue grave (Carrasco et al., 2014). Em um estudo que acompanhou a co-circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 no estado do Rio de Janeiro de 2000 a 2001, os autores observaram que todos os sorotipos produziram uma incidência maior em adultos jovens, mas DENV-3 infectou mais homens jovens (32,8% ou 22/67, n=411) (De Simone et al., 2004).

Acredita-se que diferenças fisiológicas e imunológicas existentes entre homens e mulheres poderiam explicar as particularidades entre os sexos (Whitehorn & Simmons, 2011). É necessário examinar com atenção o papel do sexo como possível determinante da dengue grave.

No estudo 1, os pacientes do sexo feminino (57,8% ou 137/237) apresentaram maior viremia, no entanto, sem associação com a gravidade. Os pacientes do sexo masculino (43,8% ou 92/210) apresentaram maior antigenemia de NS1 que mulheres, no entanto sem associação com a gravidade.

Existem poucos estudos na literatura pesquisando a antigenemia da NS1 e a viremia em relação ao sexo. Por conseguinte, a associação de níveis mais altos de NS1 e de carga viral com fatores individuais do hospedeiro, particularmente o sexo, requer investigação mais aprofundada.

Considerando a gravidade da dengue e a faixa etária, observamos que os pacientes de 13 a 19 anos (8,9% ou 22/248) apresentaram chance 75% maior de desenvolver sinais de alerta em relação aos pacientes com 12 anos ou menos. A literatura afirma que a idade é um fator de risco individual para a forma grave da dengue e para o óbito (Gamble et al., 2000; Whitehorn & Simmons, 2011). No interior da Guiana Francesa, durante a epidemia de 2005-2006, a maior prevalência de dengue foi observada nos indivíduos com idade igual ou maior que 55 anos e nos jovens de 11 a 15 anos (Meynard et al., 2009).

Em 2000, Gamble e colaboradores observaram que a chance de uma criança de 1 a 5 anos evoluir para óbito foi quatro vezes maior que uma criança de 11 a 15 anos. No Brasil, Burattini e colaboradores, em 2016, afirmaram que a maior frequência de dengue grave esteve relacionada a indivíduos mais jovens: eles perceberam que ter 10 anos ou menos quintuplicou o risco de hospitalização. A maior prevalência relativa de dengue grave e choque em crianças em relação a adultos está provavelmente vinculada ao fato de as crianças terem um endotélio vascular intrinsecamente mais permeável, de acordo com os autores. Em um estudo realizado a partir de uma grande epidemia por DENV-2 (genótipo Sudeste Asiático) em St. Coix, nas Ilhas Virgens Americanas, buscando fatores de risco para a dengue grave, a idade foi o único fator associado à gravidade da doença (Mohammed et al., 2010). Nesse caso, a maior proporção de dengue grave foi encontrada nos pacientes com mais de 40 anos, e sugeriu que muitos desses

indivíduos poderiam ter imunidade pré-existente a outro sorotipo devido a surtos anteriores na localidade. Em um estudo na Martinica, o risco de extravasamento plasmático aumentou com a idade, no sexo masculino, em infecções secundárias e em infecções por DENV-2, enquanto as formas intermediárias de gravidade acometeram com maior frequência as mulheres, e em infecções pelos sorotipos DENV-1 ou DENV-2, independentemente da idade e da resposta imune (Thomas et al., 2014).

No estudo 1, observamos sinais de alerta/dengue grave em 37,9% (94/248) dos pacientes, sendo 50% (10/20) com idade menor ou igual a 12 anos, 63,6% (14/22) de 13 a 19 anos, 36,6% (68/191) de 20 a 59 anos e 13,3% (2/15) com idade igual ou superior a 60 anos. Tivemos quatro fichas de pacientes que apresentaram sinais de alerta, mas que não havia informação sobre a idade.

Apesar de termos 68 pacientes com manifestação de sinais de alerta no grupo de 20 a 59 anos, essa não foi a faixa etária que mostrou maior chance de desenvolver sinais de alerta, refutando um possível viés quanto ao grande número de pacientes concentrado nessa faixa etária. Uma possível explicação para o grupo de pacientes de 13 a 19 anos apresentar maior chance de desenvolver sinais de alerta pode estar no sorotipo infectante de 35,7% (5/14) dos pacientes dessa faixa etária que manifestaram sinais de alerta/dengue grave, o DENV-3, que apresentou associação com a gravidade da dengue. Tivemos também cinco pacientes nesse grupo infectados por DENV-4. Em nossa população, verificamos que os pacientes com infecção pelo DENV-4 apresentaram chance 83% maior de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação àqueles com infecção pelo DENV-1. Além disso, o DENV-4 foi o sorotipo que produziu maior viremia e, ainda que não tenha sido observada correlação entre viremia e gravidade nesse estudo, essa associação foi evidenciada em outros estudos na literatura. Desta forma, poderíamos inferir que a infecção por DENV-3 tenha sido preponderante para determinar que o grupo de 13 a 19 anos tenha tido maior chance de desenvolver dengue grave. Outra explicação possível poderia ser a ordem de infecção por diferentes sorotipos, já que é sabido que a ordem de infecção influencia a gravidade da doença (Guzmán et al., 2002). Sabemos que 6 dos 22 pacientes de 13 a 19 anos apresentaram resposta imune do tipo secundária e, com isso, esses pacientes foram infectados no mínimo uma vez antes da presente infecção. Ainda que não tenhamos encontrado associação entre gravidade da dengue e resposta imune, não conseguimos avaliar quantas vezes os pacientes foram infectados nem quais sorotipos causaram as infecções anteriores, uma vez que os testes que realizamos nos permitiram identificar tão-somente a resposta imune dos indivíduos, ou seja, se respondiam a uma infecção do tipo primária ou secundária no momento da coleta do sangue. É importante pontuar que algumas regiões altamente urbanizadas da área de estudo têm proporções

substanciais da população vivendo em localidades densamente povoadas e empobrecidas, com saneamento deficiente, dificultando o controle vetorial, o que propicia condições para reinfecções (Siqueira et al., 2005).

Pacientes idosos tendem a apresentar sinais e sintomas mais graves de dengue, manifestando com mais frequência sinais de alerta, dengue grave e óbitos pela doença que pacientes mais jovens (Garcia-Rivera & Rigau-Perez, 2003; Lee et al., 2013a). A vulnerabilidade a infecções adquiridas no hospital é aumentada nessa faixa etária, o que intensifica o risco de mortalidade relacionada à infecção. Além disso, devido ao desenvolvimento de doença mais grave e de comorbidades, pacientes idosos têm um aumento da duração da hospitalização (Rowe et al., 2014).

A idade mais avançada é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de dengue grave em pacientes com histórico de infecção anterior por dengue (Yew et al., 2009). No estudo 1, um-terço (33,3% ou 5/15) dos pacientes com idade igual ou superior a 60 anos apresentava infecção secundária por DENV, aumentando a chance de desenvolver dengue com sinais de alerta/dengue grave.

Observamos que a viremia foi mais elevada nos pacientes com idade igual ou superior a 60 anos, tanto nas análises do estudo 1, quanto nas análises do estudo 2, no que se refere ao sorotipo 3. Ainda que a análise desse achado não tenha levado a apresentação clínica da dengue em consideração, a faixa etária que compreende os indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos e o sorotipo 3 foram apontados como fatores de risco por alguns estudos na literatura (Gubler et al., 1979; Garcia-Rivera & Rigau-Perez, 2003; Lee et al., 2013a; Rowe et al., 2014). Por outro lado, com relação à viremia, embora sejam necessárias cargas de vírus elevadas para desenvolver dengue grave, não há evidência direta de que isso ocorra (Vaughn et al., 2000).

É sabido que algumas cepas de DENV podem ser mais virulentas que outras (Gubler et al., 1979). DENV-3 já foi descrito como um sorotipo bastante agressivo, levando os pacientes ao óbito com uma frequência três vezes maior que os outros sorotipos (Gubler et al., 1979). No Rio de Janeiro, em 2002, DENV-3 foi o causador de uma epidemia explosiva, sendo considerada, na época, a epidemia mais grave notificada no Brasil desde a introdução do DENV em 1986 (Nogueira et al., 2005).

Em função disso, é possível que a idade mais avançada e o sorotipo 3 tenham favorecido o desenvolvimento de uma resposta mais intensa nesses pacientes de forma a produzir viremia mais alta.

A infecção primária, encontrada na totalidade das amostras de DENV-1 (100% ou 64/64), era esperada em nosso estudo, uma vez que a maior parte das amostras selecionadas

foram coletadas no ano de introdução do DENV no Brasil, e reflete um aspecto importante na dinâmica do agente etiológico da dengue.

A gravidade da dengue não mostrou relação com infecção primária ou secundária dos pacientes do estudo 1. De forma semelhante, a associação entre gravidade da dengue e resposta imune não foi observada por outros autores (Singla et al., 2016; Nunes et al., 2016).

Segundo Halstead (1988), a infecção secundária é considerada o fator de risco mais importante para a forma grave da doença. De fato, a infecção secundária esteve associada ao aumento da gravidade da dengue em pacientes do Sudeste Asiático (Vaughn et al., 2000; Libraty et al., 2002). Em um estudo na Martinica, a maioria dos casos graves foi observada em pacientes com infecção secundária por DENV-2, enquanto pacientes com infecção primária por DENV-4 não apresentaram sinais de alerta (Thomas et al., 2008).

Por outro lado, a infecção primária por dengue esteve frequentemente associada à dengue grave em pacientes do Paquistão (Khurram et al., 2014). Alguns autores sugerem que a replicação de DENV-2 em indivíduos com infecção primária apresenta maior patogenicidade (Vaughn et al., 2000).

No estudo 1, os pacientes com infecção primária (61,6% ou 146/237) apresentaram carga viral significativamente maior que pacientes com infecção secundária. Em 2009, Araújo e colaboradores observaram que a viremia dos indivíduos com infecção primária, tanto os que foram a óbito como aqueles que sobreviveram, foi mais alta que a viremia dos indivíduos com infecção secundária. Apesar de não haver associação estatística entre viremia e resposta imune, os autores apontaram que os resultados são sugestivos da ativação mais rápida do sistema imune nos pacientes com infecção secundária por DENV-3 e consequente redução da viremia.

Sabe-se que é esperada maior carga viral em infecções secundárias devido ao fenômeno da facilitação da infecção dependente de anticorpos (Rothman, 2011).

Entendemos que a patogênese da dengue grave é multifatorial e envolve interação entre características virais e a resposta do sistema imune, assim como fatores relacionados tão-somente ao paciente (genética do indivíduo, comorbidades, estado nutricional) (Thomas et al., 2010; Ngwe et al., 2013).

Na população do estudo 2, a gravidade da dengue foi sorotipo dependente: pacientes infectados por DENV-3 apresentaram chance 2,5 vezes maior de desenvolver sinais de alerta em relação aos indivíduos com infecção por DENV-1.

O sorotipo 3 foi o agente etiológico de uma das mais graves epidemias de dengue no Rio de Janeiro, no verão de 2001-2002, considerada a maior epidemia até aquele momento no Brasil (Barbosa da Silva et al., 2002; Nogueira et al., 2005; de Araújo et al., 2009). Os achados clínicos e laboratoriais sugestivos de dengue grave em um estudo epidemiológico que



acompanhou a co-circulação de DENV 1, 2 e 3 no Rio de Janeiro apresentaram associação estatística com DENV-3 e foram significativamente maiores para este sorotipo (De Simone et al., 2004). Em 2004, Passos e colaboradores observaram, nessa epidemia de 2001-2002 no Rio de Janeiro, que os indivíduos com infecção pelo DENV-3 tiveram chance 6,07 vezes maior de apresentar choque e chance 3,55 vezes maior de desenvolver exantema em comparação aos indivíduos infectados pelo DENV-2. Os autores verificaram ainda que o sorotipo 3 apresentou chance 3,06 vezes maior de causar dor abdominal e chance 3,61 vezes maior de provocar exantema, quando comparado com o sorotipo 1. Portanto, os autores concluíram que os indivíduos infectados pelo DENV-3 apresentaram sinais que indicavam uma forma mais grave da dengue. Em um estudo envolvendo várias regiões do Brasil, Burattini e colaboradores (2016) observaram que infecção por DENV-3 esteve associada ao risco quase duas vezes maior de hospitalização que a infecção por DENV-4. Em um estudo prospectivo com crianças tailandesas, Fried e colaboradores (2010) observaram que infecções por DENV-2 e DENV-3 apresentaram chance duas vezes maior de evoluir para a forma grave da dengue que infecções por DENV-4.

Contudo, no estado do Espírito Santo, vizinho do estado do Rio de Janeiro, pacientes infectados pelo sorotipo 2 apresentaram maior chance de desenvolver dengue grave, em relação aos sorotipos 1 e 4 (Vicente et al., 2016). O sorotipo 2, de forma semelhante, também esteve associado ao aumento da gravidade da dengue em um estudo na Tailândia (Vaughn et al., 2000). Já em um estudo no Sudeste Asiático, pacientes com infecção por DENV-1 tiveram maior risco de desenvolver dengue grave que os pacientes infectados por DENV-2 ou DENV-3 (Yung et al., 2015).

Não obstante, o comportamento de um sorotipo pode ser alterado em função da introdução prévia de outros sorotipos. Após a introdução de DENV-3 no México, foi observado um aumento no número de casos de dengue grave associados a DENV-1 e DENV-2 no país, em 1995 (Briseño et al., 1996; Figueroa & Ramos, 2000).

É importante ressaltar que a epidemia do DENV-2 em 2008, no Rio de Janeiro, levou a uma mudança no perfil epidemiológico da dengue, haja vista que foi observado um expressivo aumento no número de casos graves e internações em crianças, principalmente na faixa etária entre 5 e 15 anos, mas também em bebês menores de 1 ano de idade, cujo número de hospitalização aumentou sete vezes comparado com epidemias anteriores (Siqueira Jr et al., 2011).

Acredita-se que a infecção por uma cepa mais virulenta do DENV possa resultar na forma mais grave da dengue (Rosen, 1977; Gubler et al., 1978). Além disso, a gravidade da

doença causada pelo DENV-3 no estado do Rio de Janeiro pode ter sido aumentada em função da introdução anterior de DENV-1 e DENV-2, e pela co-circulação dos três sorotipos.

Na população do estudo 1, não foi observada associação entre a apresentação clínica da dengue e a viremia ou a antigenemia da NS1 quanto à infecção pelo vírus DENV. Curiosamente, observamos valores mais altos de viremia e de NS1 nos casos de dengue sem sinais de alerta em relação aos casos com sinais de alerta/dengue grave.

Nossos resultados assemelham-se ao que foi descrito por alguns autores, em estudos nos quais nem a antigenemia da NS1 ou a viremia mostraram associação com gravidade da dengue (Simmons et al., 2007; Chau et al., 2010; Fox et al., 2011; de la Cruz-Hernández et al., 2013).

Da mesma forma, não houve associação entre a detecção de NS1 e gravidade da dengue em um estudo multicêntrico com as populações da Malásia, Tailândia, Filipinas, Vietnã, Nicarágua e Venezuela (Guzmán et al., 2010b). Curiosamente, a antigenemia da NS1 foi mais alta nos pacientes sem sinais de alerta do que nos casos de dengue grave no Camboja (Duong et al., 2011).

Em um estudo conduzido na Índia, Singla e colaboradores (2016) também não observaram associação da gravidade da dengue com a viremia, apesar da alta carga viral estar relacionada à trombocitopenia prolongada e à recuperação tardia. O pico de viremia tende a manter-se até o 3º dia e gradualmente decresce, mas já foi descrito que a carga viral se mantém alta até o 5º dia de doença, em pacientes com infecção primária, sem associação da carga viral com a gravidade da dengue, assim como no presente trabalho (Tricou et al., 2011; Kyaw et al., 2017).

Outrossim, na literatura, viremia alta já foi associada ao desenvolvimento de dengue grave (Vaughn et al., 2000; Tanner et al., 2008; Low et al., 2011; Pang et al., 2016). Pang e colaboradores, em 2016, observaram que a viremia esteve significativamente associada ao desenvolvimento de sinais de alerta e à necessidade de internação, o que implica a necessidade de monitoramento do paciente, especialmente quanto aos níveis de plaquetas e de linfócitos. Os autores sugeriram um papel importante destes parâmetros para o desenvolvimento da dengue grave. Os indivíduos que foram a óbito durante a epidemia de DENV-3 no estado do Rio de Janeiro apresentavam carga viral significativamente mais alta que os pacientes que sobreviveram (12,5 log cópias RNA/ml versus 7,9 log cópias RNA/ml), sugerindo que a alta viremia é um fator importante na patogênese da dengue grave (de Araújo et al., 2009).

Uma possível explicação para nossa observação pode estar no fato da viremia encontrada no soro não conseguir refletir precisamente a replicação viral.

A formação do complexo imune com sNS1 e a ligação da sNS1 às células endoteliais foram propostas como fatores potenciais na patogênese da dengue grave (Falconar, 1997;

Young et al., 2000; Avirutnan et al., 2006). Além disso, os anticorpos dirigidos contra NS1 reagem de forma cruzada com plaquetas humanas e células endoteliais (Lin et al., 2006). Os anticorpos anti-NS1 induzem células endoteliais a sofrerem apoptose, e experiências *in vitro* demonstraram que esses anticorpos seriam responsáveis por uma maior permeabilidade à monocamada de células endoteliais (Lin et al., 2006).

A NS1 pode causar extravasamento plasmático, o que leva o paciente ao choque, podendo evoluir para o óbito e, portanto, essa proteína deveria ser considerada como parte dos fatores causais da gravidade da dengue (Beatty et al., 2015).

Segundo Allonso e colaboradores (2014), a detecção de NS1 representa a melhor abordagem para o diagnóstico de fase aguda quando comparado aos níveis de viremia, uma vez que NS1 pode ser detectada em toda a fase febril, além de ser mais estável em solução do que o genoma viral, facilitando o manuseio e o armazenamento da amostra.

A não associação da viremia ou da antigenemia com a gravidade da dengue reforça a existência de outros fatores, além da carga viral, relacionados à suscetibilidade do indivíduo e à patogênese da doença, como aspectos genéticos do hospedeiro ou a resposta imune inata do paciente (Simmons et al., 2007).

Talvez o fator mais importante que modifica a associação da gravidade da dengue com a antigenemia da NS1 ou com a viremia seja a duração da doença quando esses parâmetros são avaliados, uma vez que o pico da NS1 ou do RNA viral ocorre na fase aguda. Estudos que encontraram essa associação com a gravidade da dengue avaliaram os níveis de NS1 nas primeiras 72 horas a partir do início dos sintomas (Libraty et al., 2002), não sendo observada associação a partir do 5º dia de doença (Guilarde et al., 2008).

De fato, observamos uma relação ordinal entre o número de dias de doença e a apresentação clínica da dengue no estudo 1. A chance de observarmos sinais de alerta/dengue grave nos pacientes com 2 a 3 dias de doença foi 30% maior em relação àqueles com 0 ou 1 dia de doença. E a chance de observarmos sinais de alerta/dengue grave nos pacientes com 4 a 5 dias de doença foi 2,9 vezes maior em relação àqueles com 0 ou 1 dia de doença, mostrando claramente que o maior número de dias de doença aumenta a chance de observarmos sinais de alerta/dengue grave (2-3 dias, OR=1,30; IC:0,66-2,55 e 4-5 dias, OR=2,97; IC:1,35-6,56).

Muitos dos sinais de alerta listados pela classificação da OMS (2009) são tipicamente observados do 4º ao 7º dia de doença a partir do início dos sintomas (Leo et al., 2013; Thein et al., 2013; Tsai et al., 2013). Se os pacientes tivessem sido observados até o 7º dia de doença em nosso estudo, provavelmente teríamos identificado maior número de sinais de alerta.

No estudo 2, somente DENV-1 apresentou diferença estatisticamente significativa entre antigenemia da NS1 e gravidade da dengue. Diferente do que esperávamos, foram os pacientes

infectados por DENV-1 sem sinais de alerta que apresentaram níveis mais altos de NS1 (e de viremia, ainda que sem significância estatística) que o grupo com sinais de alerta/dengue grave. Em 2011, Duong e colaboradores também utilizaram o teste Platelia NS1 Ag kit para mensurar de forma semiquantitativa a antigenemia da NS1 em pacientes que vivem no Camboja, e observaram o mesmo: a infecção mais branda por dengue esteve associada a altos níveis de NS1 e ao sorotipo 1, e a altos níveis de viremia e ao sorotipo 1. De forma semelhante, em um estudo envolvendo seis países na Ásia e nas Américas, foi observado que a infecção por DENV-1 esteve associada a títulos mais altos de NS1, sem, contudo, apresentar associação com a gravidade da doença (Guzmán et al., 2010b). Assim, nossos resultados estão de acordo com os achados supracitados na literatura. Contudo, consideramos que a antigenemia da NS1 ainda assim possa estar relacionada à gravidade da dengue. Acreditamos que talvez um teste que apresente maior sensibilidade, e que utilize unidades mais precisas que títulos de diluição como base no cálculo da concentração de NS1 circulante possa apresentar resultados que confirmem essa hipótese.

Chau e colaboradores (2010) observaram uma tendência a concentrações mais altas de NS1 em paralelo com o aumento da gravidade em infecções por DENV-3, apesar de não terem encontrado associação entre antigenemia e gravidade da dengue. Libraty e colaboradores (2002) observaram que altos níveis de NS1 circulantes, detectados nas primeiras 72 horas após o início dos sintomas, identificavam pacientes com risco de desenvolver a forma grave da dengue.

Apesar dos nossos achados contrastarem com aqueles de estudos nos quais a maior antigenemia da NS1 está associada com doença mais grave, nossa amostra populacional foi mais representativa numericamente, selecionamos fichas de pacientes de 0 a 5 dias de doença, e não apenas até 72 horas após o início da febre, além de termos incluído características adicionais que foram controladas na análise multivariada, como idade e sexo do paciente, número de dias de doença, resposta imune e sorotipo infectante.

O motivo pelo qual maior viremia foi encontrada nos pacientes sem sinais de alerta, ainda que sem significância estatística, não está claro, mas indica que os níveis de viremia parecem ser o resultado de uma interação complexa entre os fatores virais e os fatores relacionados ao hospedeiro (Clyde et al., 2006; Noisakran & Perng, 2008; Rothman, 2011; Simmons et al., 2012; Watanabe et al., 2012).

Nossos resultados sugerem que tão-somente a alta viremia e a antigenemia elevada na fase aguda da dengue não são suficientes para determinar a progressão da doença para sua forma mais grave. Certamente, outros fatores imunológicos, com viremia ou antigenemia altas ou não, atuam na evolução para dengue grave.

Entendemos que a utilização de uma metodologia semiquantitativa para avaliar os níveis de NS1 não nos permitiu estabelecer a magnitude absoluta da antigenemia. Contudo, a análise conjunta da antigenemia com a viremia proporcionou um melhor entendimento da dinâmica da dengue, dos parâmetros e fatores que a afetam e sua relação com o desfecho clínico.

Na população do estudo 1, observamos associação entre viremia e número de dias de doença.

No estudo 2, a antigenemia foi mais alta nos pacientes com 4 a 5 dias de infecção pelo DENV-3. A viremia mostrou associação com o número de dias de doença para os sorotipos 3 e 4: viremia mais alta foi detectada nos dias 0 a 1, decrescendo nos dias 2 a 3 e atingindo níveis mais baixos com 4 a 5 dias de doença, o que era esperado em função do processo natural de depuração do vírus no soro.

Em um estudo conduzido na Colômbia, altos níveis de viremia e antigenemia da NS1 foram encontrados no segundo dia após o início da febre, e os níveis diminuíram ao longo do terceiro e quarto dias, com níveis indetectáveis na maioria das amostras no quinto dia após o início da febre (Perdomo-Celis et al., 2017).

De fato, a literatura sinaliza que altos títulos de NS1 plasmático e carga viral foram detectados entre o 2º e o 4º dias da doença, tornando-se indetectáveis após o 5º dia (Alcon et al., 2002; Duyen et al., 2011).

O motivo pelo qual a antigenemia da NS1 não mostrou correlação com o número de dias de doença, o que seria esperado, permanece desconhecido. É importante investigar ainda mais a cinética da antigenemia de modo a compreender melhor como se comporta esse parâmetro na fisiopatologia da dengue.

Importante acrescentar que 262 amostras de pacientes com confirmação para dengue por isolamento viral e/ou RT-PCR e que atendiam aos critérios de elegibilidade para o presente estudo foram submetidas ao teste Platelia™ Dengue NS1 AG (dados não informados). Entretanto, apenas 210 (80,2%) amostras agudas de soro foram positivas para o NS1, o que pode ser explicado pela sensibilidade do kit Platelia empregado em nosso estudo. Outros autores encontraram resultados semelhantes, em que a sensibilidade do teste Platelia variou de 58% a 94% (Chuansumrit et al., 2008; Dussart et al., 2008; Lapphra et al., 2008; Hang et al., 2009; Guzmán et al., 2010b; Duong et al., 2011).

Nos estudos 1 e 2, os pacientes com infecção primária apresentaram níveis mais altos de viremia e de antigenemia da NS1 que pacientes com infecção secundária.

A cinética da viremia em nosso estudo mostrou correlação com o número de dias de doença: níveis mais altos de RNA viral foram detectados nos dois primeiros dias de infecção, diminuindo progressivamente até o 5º dia. Outros autores observaram o mesmo comportamento

da carga viral em relação ao período de infecção (Alcon et al., 2002; Duyen et al., 2011; Libraty et al., 2002; Thomas et al., 2010; Tricou et al., 2011; Kyaw et al., 2017).

Pacientes com infecção primária por DENV-3 apresentaram maior nível de NS1 circulante em relação aos pacientes com infecção secundária, enquanto pacientes infectados pelo DENV-2 com infecção primária apresentaram viremia mais alta que pacientes com infecção secundária. Resultados semelhantes foram encontrados em Taiwan, no Vietnã, no México, na Colômbia e em Myanmar (Yeh et al., 2006; Duyen et al., 2011; de la Cruz-Hernández et al., 2013; Kyaw et al., 2017; Perdomo-Celis et al., 2017).

Em pacientes do Sudeste Asiático, níveis mais altos de viremia foram observados em infecções secundárias (Vaughn et al., 2000; Libraty et al., 2002).

Nossos achados podem ser explicados por alguns fatores. O primeiro deles seria a presença de complexos circulantes formados por NS1 e anticorpo durante infecções secundárias que impedem a detecção da NS1 (Koraka et al., 2003). Outro fator importante é o *clearance* viral mais precoce e mais rápido em infecções secundárias (Vaughn et al., 2000; Duyen et al., 2011; Tricou et al., 2011). Os parâmetros virológicos estudados são altamente modificados pelo dia da doença, especialmente quando são analisados juntamente com a resposta imune do paciente (Perdomo-Celis et al., 2017).

A antigenemia da NS1 mostrou-se significativamente maior em infecções por DENV-3, em seguida por DENV-1, DENV-2 e, por último, DENV-4. Nosso achado foi consistente com alguns estudos do Sudeste Asiático (Chau et al., 2008; Chau et al., 2010; Duyen et al., 2011).

Este comportamento parece refletir diferentes níveis de avides dos anticorpos monoclonais do Platelia para os epítomos mais importantes na superfície da NS1 de diferentes sorotipos e/ou de diferentes linhagens do mesmo sorotipo; ou talvez possa ser a presença de diferentes magnitudes da carga viral em pacientes com diferentes sorotipos (Guzmán et al., 2010b).

Os pacientes infectados por DENV-4 apresentaram maior nível de viremia seguido por DENV-1, 3 e 2, porém sem relação com a gravidade.

Apesar de termos encontrado relação significativa entre viremia e cada sorotipo, a diferença entre as respectivas viremias não ultrapassou a diferença de 4 log cópias/ml entre os valores encontrados para DENV-4 (a maior viremia encontrada) e DENV-2 (a menor viremia determinada): DENV-4= 2,76 log cópias/ml, DENV-1= 2,21 log cópias/ml, DENV-3= 2,14 log cópias/ml, DENV-2= -0,84 log cópias/ml.

É possível que a diferença entre as viremias de cada sorotipo seja decorrente da qualidade de conservação das amostras ao longo do tempo, uma vez que os valores mais altos

de viremia foram encontrados para DENV-4, o sorotipo mais recente da nossa análise. Por outro lado, DENV-1 foi o sorotipo mais antigo da nossa população e apresentou a segunda viremia mais alta. Curiosamente, DENV-2 apresentou os valores mais baixos de viremia. Uma possível explicação poderia ser a conservação dessas amostras ao longo do tempo, bem como a eficiência do fluoróforo HEX, utilizado nas reações de qRT-PCR para a quantificação da carga viral nas amostras de DENV-2.

A literatura aponta níveis de RNA viral em pacientes com DENV-1 significativamente mais altos que nos pacientes com DENV-2, como observado no presente estudo (Yung et al., 2015). Por outro lado, em um estudo com os quatro sorotipos do DENV no Vietnã, infecções por DENV-1 apresentaram níveis de viremia marcadamente mais altos que infecções por DENV-4, discordante do que encontramos, e discretamente superiores que infecções por DENV-2, conforme nossos achados (Thai et al., 2010).

No estudo 3, os pacientes infectados pela linhagem II do DENV-2 com idade igual ou inferior a 12 anos tiveram maior chance de desenvolver sinais de alerta que as demais faixas etárias.

Nunes e colaboradores, em 2016, observaram que os pacientes com idade igual ou inferior a 15 anos, e infectados pela linhagem II, apresentaram a forma mais grave da dengue, quando comparados os períodos de 1990 a 2002, com a circulação da linhagem I, e 2007 a 2011, com a circulação da linhagem II, no Rio de Janeiro.

Os pacientes infectados pela linhagem II e com 0 a 1 dia de doença apresentaram viremia mais alta, coincidindo com achados na literatura (Nunes et al., 2016).

A circulação de múltiplos sorotipos, o que inclui a introdução sequencial de novos sorotipos na mesma área geográfica, resulta na exposição de indivíduos a diferentes sorotipos ao longo da vida, e infecções secundárias por um sorotipo heterólogo de DENV é um fator de risco conhecido para dengue grave (Sangkawibha et al., 1984; Burke et al., 1988; Kouri et al., 1989). Além disso, diferentes genótipos dentro de um determinado sorotipo, e linhagens diferentes dentro de um determinado genótipo, podem influenciar de maneira diferente a gravidade da dengue (Messer et al., 2003; Bennett et al., 2010; Steel et al., 2010). Até 1981, o genótipo Americano do DENV-2 era o único que circulava nas Américas e, a partir daquele ano, o genótipo Sudeste Asiático/Americano do DENV-2 passou a ser detectado na região (Kouri et al., 1989). O genótipo Americano do DENV-2 era pouco associado à forma grave da dengue nas Américas (Williams et al., 2014). No entanto, a invasão do genótipo Sudeste Asiático/Americano do DENV-2 resultou na primeira grande epidemia de dengue grave nas Américas (Rico-Hesse, 1990). Estudos experimentais revelaram que o genótipo Americano do DENV-2 apresentou menor capacidade de replicação em células humanas cultivadas e

infectividade reduzida para *Ae. aegypti* em comparação ao genótipo Sudeste Asiático/Americano desse sorotipo (Leitmeyer et al., 1999; Armstrong & Rico-Hesse, 2003; Cologna & Rico-Hesse, 2003; Cologna et al., 2005; Vasilakis et al., 2007). E graças à sua maior aptidão aos sistemas dos seus hospedeiros e dos seus vetores, o genótipo Sudeste Asiático/Americano do DENV-2 substituiu o genótipo Americano em muitas regiões das Américas (Watts et al., 1999; Cologna et al., 2005).

Essa substituição do genótipo Americano para o genótipo Sudeste Asiático/Americano foi observada no Peru, durante um surto de dengue de magnitude e gravidade sem precedentes na região do Loreto. O sequenciamento de todo o genoma do DENV-2 causador da epidemia indicou a linhagem II do genótipo Sudeste Asiático/Americano, e estava mais relacionada ao vírus circulante no Brasil durante a epidemia de 2007-2008, do que ao vírus que circulava anteriormente no Brasil (linhagem I do genótipo Sudeste Asiático/Americano) e, desde 1990, na América do Sul como um todo (Williams et al., 2014). A gravidade da dengue é determinada por fatores virais e relacionados ao hospedeiro. É bastante provável que o grande número de casos graves de dengue observados durante a epidemia de 2010/2011 no Peru não esteve associado somente ao aumento da replicação viral nos hospedeiros ou nos mosquitos, mas sim à introdução da linhagem II do genótipo Sudeste Asiático/Americano do DENV-2 naquela população com imunidade pré-existente aos outros sorotipos (Williams et al., 2014).

É sabido que infecções sequenciais por DENV podem afetar a gravidade da doença (Sangkawibha et al., 1984; Guzmán & Kouri, 2008). Ainda mais especificamente, demonstrou-se que a gravidade da doença pode ser afetada pelo genótipo do DENV-2 infectante, diante de uma determinada condição imunológica da população (Kochel et al., 2002; OhAinle et al., 2011). A associação da linhagem II com a faixa etária, o número de dias de doença e a viremia, em nosso estudo, ratifica a hipótese de que cepas mais virulentas influenciam a gravidade da dengue (Simmons et al., 2007; Romano et al., 2010).

Nossos achados sugerem que a linhagem II do DENV-2 foi um importante fator para o desenvolvimento da forma grave da dengue, uma vez que sinais de alerta foram observados em pacientes com idade igual ou inferior a 12 anos, com 4 a 5 dias de doença e com viremia mais alta. Além disso, estes fatores mostraram-se fortemente associados com a gravidade da dengue em nossas análises estatísticas.

A análise de 27 anos de vigilância da dengue delimitou dois períodos distintos: uma fase inicial de 1986 a 1993, caracterizada por ondas epidêmicas localizadas e esporádicas em centros urbanos, e um padrão endêmico e epidêmico de ampla abrangência no país a partir de 1994 (Siqueira et al., 2005). Neste segundo período, várias epidemias de dengue avançaram em um padrão hiperendêmico em múltiplos centros urbanos (Siqueira et al., 2005). Desde 1999,



observamos um crescimento dramático, tanto na incidência como na hospitalização, devido à dengue e à dengue grave, indicando aumento notável na gravidade da doença nos últimos anos (Siqueira et al., 2005). Mudanças na cobertura da vigilância poderiam explicar parte desse aumento, porém essa justificativa parece improvável dado que não foram feitas mudanças significativas nos parâmetros e definições da vigilância (Siqueira et al., 2005). O padrão atual caracterizado pela transmissão intensa do DENV pode ser explicado, principalmente, pelo número de municípios infestados pelos mosquitos *Ae. aegypti*, pela mobilidade da população e pela introdução e co-circulação dos quatro sorotipos no estado do Rio de Janeiro.

### **Limitações**

Ainda que indicadores da dengue grave estejam bem documentados, os mecanismos que desencadeiam a gravidade ainda permanecem obscuros e, certamente, são multifatoriais. Possíveis fatores de risco para a dengue grave incluem comorbidades. A análise acerca da presença de comorbidades não foi feita no presente estudo, primeiramente porque não fazia parte do objeto de estudo e, em um segundo momento, porque não havia informação quanto a esse dado em todas as fichas epidemiológicas. Contudo, acreditamos que teria sido uma informação importante para entender a dinâmica da gravidade da dengue em nossa população.

Apesar das fichas epidemiológicas para esse estudo terem sido escolhidas, entre outros fatores, pela qualidade de preenchimento (priorizamos as fichas mais completas, isto é, com maior número de dados relevantes para as análises), não foi possível obter todas as informações necessárias na totalidade das fichas. Da mesma forma, L'Azou e colaboradores (2014) reportaram que dados quanto à distribuição da idade durante infecções pelos quatro sorotipos frequentemente não estavam descritos nas fichas da vigilância e em estudos epidemiológicos. Os autores afirmaram que essa falta de informações relevantes limita o potencial em estabelecer comparações e delinear conclusões ao longo do tempo, entre territórios e entre diferentes faixas etárias.

Certas limitações do estudo estão relacionadas à sua natureza retrospectiva devido ao fato de haver informações importantes, por vezes incompletas, ou não terem sido corretamente descritas nas fichas epidemiológicas, o que implica uma limitação típica desse tipo de estudo (Burattini et al., 2016). Além disso, várias outras características importantes, como estado nutricional e variáveis individuais socioeconômicas, que poderiam estar associadas com o risco de hospitalização e dengue grave, não foram avaliadas na presente análise.

O sistema de vigilância epidemiológica da dengue no Brasil vem apresentando melhorias contínuas desde 1986. Assim, os avanços quanto à qualidade na notificação dos casos

de dengue e o registro mais cuidadoso e minucioso da ficha epidemiológica do paciente contribuirão para preencher as lacunas quanto à epidemiologia da doença em estudos futuros.

Uma explicação em potencial para não termos encontrado associação da gravidade da dengue com algumas variáveis pode estar no fato de os sinais de alerta tenderem a aparecer no dia em que tem início a defervescência, e nós estudamos amostras antes desse período. Uma vez que um dos nossos objetivos era encontrar um biomarcador de gravidade da dengue na fase aguda, de forma que esse marcador pudesse ser utilizado principalmente na triagem dos casos de dengue, muitos sinais de alerta mais graves, em sua maioria, ainda não tinham sido descritos e, por consequência, não puderam ser observados durante o atendimento médico.

Além disso, existem diferenças individuais na população estudada, uma vez que a maior parte das amostras de soro foram coletadas de indivíduos infectados no ano de introdução de cada sorotipo e nos dois anos seguintes, além dessa população restringir-se ao estado do Rio de Janeiro, diferente de muitos estudos anteriormente citados. E ainda, esses pacientes procuraram atendimento médico em unidades de saúde da rede pública (com exceção de quatro pacientes que foram atendidos em um hospital da rede privada), o que também impediria que a análise fosse extrapolada para a população do estado do Rio de Janeiro como um todo. Tivemos apenas as fichas epidemiológicas para analisar o quadro clínico dos pacientes, e isso pode ter comprometido a classificação dos casos de dengue quanto à gravidade, uma vez que a maior parte dessas fichas é antiga, não apresentavam todas as informações utilizadas atualmente para classificação quanto à gravidade, e estavam frequentemente incompletas.

Em função do presente trabalho tratar-se de um estudo epidemiológico, foi necessário organizar nossas variáveis de forma categórica para utilizar a regressão logística. A categorização implica assumir um viés ao homogeneizar nossa população. Assim, podem existir associações reais que não puderam ser estabelecidas. Além disso, de forma a estudar o comportamento de cada sorotipo, tivemos uma redução significativa no número amostral, o que é uma limitação importante no presente estudo, dado que possíveis associações podem não ter sido estabelecidas.

Apesar de terem permanecido lacunas importantes no conhecimento epidemiológico, as informações coletadas, analisadas e apresentadas no presente trabalho são importantes para que se avalie a evolução epidemiológica ao longo do tempo em diferentes espaços.

### **Considerações e perspectivas**

A dengue continua sendo uma ameaça crescente para a saúde pública em muitas partes do mundo. Fica evidente que somente o controle vetorial é uma ferramenta insuficiente para a saúde pública em áreas endêmicas. Ainda que o controle clínico cuidadoso possa reduzir a taxa

de mortalidade entre os pacientes hospitalizados para menos de 1%, a dengue coloca uma enorme pressão sobre os serviços de saúde, e tem um impacto social e econômico substancial (Shepard et al., 2011). Além disso, várias outras doenças causam sinais e sintomas muito similares à dengue, como a doença do Zika vírus, a febre amarela, a leptospirose, a meningite meningocócica, dentre outras, o que implica a investigação minuciosa dos casos com apresentações clínicas atípicas, principalmente aqueles com envolvimento do sistema nervoso central, em busca de possíveis co-infecções por diferentes agentes etiológicos (Cerbino-Neto et al., 2016; de Filippis et al., 2016).

Uma das questões mais relevantes acerca da dengue é determinar quais fatores têm influência no desenvolvimento da forma grave da doença. É consenso que a gravidade da dengue está associada à dinâmica de aspectos multifatoriais, como a carga viral e sorotipos, infecções sequenciais e aspectos genéticos do hospedeiro (Simmons et al., 2007). Acredita-se que a combinação de biomarcadores, como a resposta imune, marcadores da ativação endotelial, bem como marcadores bioquímicos e genéticos do hospedeiro, será benéfica na previsão da forma grave da dengue, principalmente em função do avanço nas técnicas e equipamentos, que possibilitam a análise de múltiplos biomarcadores a partir, apenas, de pouco volume de soro dos pacientes (John et al., 2015).

Visando avaliar fatores virológicos e do hospedeiro e sua relação com a gravidade da dengue em uma população do estado do Rio de Janeiro, exposta aos quatro sorotipos, encontramos como potenciais marcadores de gravidade, durante a fase aguda da doença, o sorotipo DENV-3, a faixa etária de 13 a 19 anos e a linhagem II do sorotipo 2. Nossos achados mostram que a interação entre fatores relacionados aos hospedeiros e ao DENV influenciam o desenvolvimento da forma grave da dengue, ressaltando que a patogênese da dengue grave se configura como um processo complexo e multifatorial, envolvendo a co-circulação de vários sorotipos do DENV.

Diante do fato do Rio de Janeiro ser um polo turístico, com a afluência de um grande número de pessoas, além da possibilidade de introdução de novas amostras de DENV, faz-se necessário continuar a vigilância e a investigação de casos suspeitos com vistas a minimizar o impacto na população, acompanhando possíveis reemergências dos quatro sorotipos e a repercussão para a população do estado do Rio de Janeiro. Além da NS1 como um método rápido, é importante buscar novas metodologias para o diagnóstico precoce da dengue, objetivando mitigar as consequências para uma população hiperendêmica e, principalmente, diminuir o óbito pela doença.

## 9 – CONCLUSÕES

- (1) Observamos que 38,1% (123/323) de todas as amostras classificadas quanto ao tipo de infecção (323) respondiam a uma infecção secundária. Dentre estes, apenas 32,5% (40/123) apresentavam sinais de alerta/dengue grave, mostrando que o tipo de resposta, primária ou secundária, não pode ser o único fator a ser considerado quanto ao desenvolvimento da forma grave da dengue e, portanto, a gravidade da doença tem origem multifatorial.
- (2) Em relação à quantificação dos níveis da glicoproteína NS1, a presença de sinais de alerta/dengue grave foi observada em apenas 36,7% (77/210) dos pacientes, porém a associação entre a gravidade da dengue e a antigenemia da NS1 não foi significativa ( $p=0,101$ ). Acreditamos que um número maior de sinais de alerta/dengue grave teria sido identificado caso os pacientes tivessem sido observados até o 7º dia de doença em nosso estudo e, portanto, essa associação deve continuar sendo investigada.
- (3) No que se refere à viremia, a presença de sinais de alerta/dengue grave foi observada em 33,3% (100/300) dos pacientes, sendo que estes apresentaram níveis mais baixos de carga viral que os pacientes sem sinais de alerta/dengue grave. É possível que o desenvolvimento da forma grave da dengue não esteja relacionado a altas cargas virais, uma vez que a viremia encontrada no soro pode não conseguir refletir precisamente a replicação viral.
- (4) Observamos que os pacientes de 13 a 19 anos apresentaram chance maior de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação aos pacientes das demais faixas etárias. A infecção pelo DENV-3 em 35,7% (5/14) dos pacientes dessa faixa etária pode ter sido preponderante para determinar esse achado, uma vez que o sorotipo 3 apresentou maior chance de induzir sinais de alerta/dengue grave em relação aos demais sorotipos.
- (5) Níveis mais altos da NS1 foram observados em infecções primárias pelo sorotipo 3, mostrando que a presença de complexos circulantes formados por NS1 e anticorpo durante

infecções secundárias impede a detecção da NS1, além do *clearance* viral ser mais precoce e mais rápido em infecções secundárias. Os pacientes infectados pelo sorotipo 3 apresentaram títulos mais altos da NS1 em relação aos demais sorotipos, possivelmente devido à resposta mais intensa do sistema imune provocada por esse sorotipo, considerado mais patogênico na literatura. A maior antigenemia da NS1 observada em pacientes com 4 a 5 dias de doença e infectados pelo DENV-3 precisa ser ainda mais investigada, de modo a permitir maior entendimento acerca do comportamento desse possível biomarcador da gravidade da dengue.

- (6) Viremia mais alta foi observada em infecções primárias pelo sorotipo 2 (linhagem I), o que é sugestivo da ativação mais rápida do sistema imune nos pacientes com infecção secundária pelo DENV-2 (linhagem I) e consequente redução da viremia. Os níveis mais altos de carga viral observados em pacientes com idade igual ou superior a 60 anos infectados pelo sorotipo 3 podem ser explicados pela idade mais avançada e pelo DENV-3, os quais podem ter favorecido o desenvolvimento de uma resposta mais intensa nesses pacientes de forma a produzir viremia mais alta. A viremia mais alta observada em pacientes que apresentavam 0 a 1 dia de doença infectados pelos sorotipos 3 ou 4 era esperada em função do processo natural de depuração do vírus no soro.
- (7) Pacientes infectados pela linhagem II do DENV-2 e com idade igual ou inferior a 12 anos apresentaram maior chance de desenvolver sinais de alerta/dengue grave em relação aos pacientes das demais faixas etárias, evidenciando que a infecção de crianças por essa linhagem é um fator de risco para o desenvolvimento da forma grave da dengue.
- (8) Encontramos como potenciais marcadores de gravidade da dengue, durante a fase aguda, o sorotipo DENV-3, a faixa etária de 13 a 19 anos e a linhagem II do sorotipo 2. Nossos achados mostram que a interação entre fatores relacionados aos hospedeiros e ao DENV influenciam o desenvolvimento da forma grave da dengue, ressaltando que a patogênese da forma grave se configura como um processo complexo e multifatorial, envolvendo a co-circulação dos diferentes sorotipos, a sequência de infecção de cada um deles e fatores individuais.

## 10 – PERSPECTIVAS

Apesar dos esforços em combater as epidemias recorrentes de dengue, do investimento feito para desenvolver uma vacina tetravalente eficiente, da busca ativa por medicamentos que bloqueiem a replicação viral, para reduzir a ocorrência de casos graves, a dengue continua a ser um grave problema de saúde pública. Vários fatores, como a rápida urbanização, controle vetorial ineficiente, além do rápido progresso no transporte aéreo, contribuíram para o surgimento de dengue endêmica em mais de 100 países. Enquanto isso, a busca por marcadores de gravidade para rastreio precoce da progressão da doença tornou-se a estratégia mais viável para identificar casos graves e fatais (Allonso et al., 2014).

Apesar do grande interesse na busca por novos marcadores de evolução da doença, ainda há poucos estudos descrevendo o potencial da NS1 com essa finalidade. Desta forma, acreditamos que seria interessante dar continuidade ao estudo da relação entre antigenemia e gravidade da dengue. Uma vez que utilizamos um método semiquantitativo de detecção da NS1, devemos continuar nossa investigação utilizando uma metodologia quantitativa que permita o cálculo da concentração da NS1 circulante nas amostras positivas em unidades mais precisas que títulos de diluição.

Seria uma contribuição relevante realizar um estudo: i) prospectivo, de modo que o preenchimento completo da ficha epidemiológica seja acompanhado e, desta forma, termos melhor qualidade dos dados a serem analisados; ii) com pacientes hospitalizados, que caracterizam um grupo com sinais de alerta mais graves, além de podermos acompanhar a evolução da doença e a antigenemia, através de amostras de sangue pareadas; iii) com até 7 dias de doença, uma vez que os sinais de alerta mais graves tendem a surgir a partir do 5º dia após o início da febre; iv) com infecção primária e secundária, para avaliar a influência do tipo de resposta no desenvolvimento de dengue grave; vi) em que os níveis de NS1 sejam medidos através de um método mais preciso na quantificação da antigenemia da NS1.

## 11 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2):376-81.
- Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health.* 2011;16(8):936-48.
- Allonso D, Meneses MD, Fernandes CA, Ferreira DF, Mohana-Borges R. Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2014;9(11):e113634.
- Anders KL, Nguyet NM, Chau NV, Hung NT, Thuy TT, Lien le B, et al. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(1):127-34.
- Añez G, Morales-Betoulle ME, Rios M. Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. *PLoS One.* 2011;6(11):e27459.
- Añez G, Heisey DA, Espina LM, Stramer SL, Rios M. Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 4 circulating in Puerto Rico and Key West, Florida, during 2010 epidemics. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87(3):548-53.
- Antunes P, Watterson D, Parmvi M, Burger R, Boisen A, Young P, et al. Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic nanocluster detection. *Sci Rep.* 2015;5:16145.
- Armstrong PM, Rico-Hesse R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(5):539–44.
- Atyame CM, Labbé P, Lebon C, Weill M, Moretti R, Marini F, et al. Comparison of irradiation and Wolbachia based approaches for sterile-male strategies targeting *Aedes albopictus*. *PLoS One.* 2016;11:e0146834.

- Austin SK, Dowd KA, Shrestha B, Nelson CA, Edeling MA, Johnson S, et al. Structural basis of differential neutralization of DENV-1 genotypes by an antibody that recognizes a cryptic epitope. *PLoS Pathog.* 2012; 8(10):e1002930.
- Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006;193(8):1078-88.
- Baldacchino F, Caputo B, Chandre F, Drago A, della Torre A, Montarsi F, et al. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Manag Sci.* 2015;71(11):1471-85.
- Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog.* 2010;6(2):e1000790.
- Barbosa da Silva J Jr, Siqueira JB Jr, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta FG Jr. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull.* 2002; 23(1):3-6.
- Bartholomeusz AI, Wright PJ. Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Arch Virol.* 1993;128(1-2):111-21.
- Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med.* 2015;7(304):304ra141.
- Bennett KE, Flick D, Fleming KH, Jochim R, Beatty BJ, Black WC 4th. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics.* 2005; 170(1):185-94.
- Bennett SN, Drummond AJ, Kapan DD, Suchard MA, Munoz-Jordan JL, Pybus OG, et al. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Mol Biol Evol.* 2010; 27(4):811-18.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013; 496(7446):504-7.
- Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000833.



- Black WCt, Bennett KE, Gorrochotegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernandez-Salas I, de Lourdes Muñoz M, et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch Med Res*. 2002;33(4):379–88.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília. 2009. 160p.
- Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Epidemiológico*, 2015;46(3).
- Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Encuesta seroepidemiologica retrospectiva a virus dengue en el municipio Cerro. *Metodologia. Rev Cubana Med Trop*. 1985;37(3):259-68.
- Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):816–20.
- Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J*. 2004;23(4):728-38.
- Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:371-402.
- Briseño B, Gómez-Dantés H, Argot-Ramírez E, Montesano R, Vázquez-Martínez AL, Ibáñez-Bernal S, et al. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of dengue serotype 3 in Mexico. *Emerg Infect Dis*. 1996;2(2):133-35.
- Buchy P, Yoksan S, Peeling RW, Hunsperger E. Laboratory tests for the diagnosis of dengue virus infection. Scientific Working Group, Report on Dengue, 1-5 October 2006, Geneva, Switzerland, World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2007. Disponível em: <[http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg\\_dengue\\_2.htm](http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue_2.htm)> Acesso em: 29 jan 2015.
- Burattini MN, Lopez LF, Coutinho FA, Siqueira-Jr JB, Homsani S, Sarti E, et al. Age and regional differences in clinical presentation and risk of hospitalization for dengue in Brazil, 2000-2014. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016;71(8):455-63.

- Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(1):172–80.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169–93.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55(4):611-22.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol.* 1989;70(Pt 1):37-43.
- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2014;384(9951):1358-65.
- Carrasco LR, Leo YS, Cook AR, Lee VJ, Thein TL, Go CJ, et al. Predictive tools for severe dengue conforming to World Health Organization 2009 criteria. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(7):e2972.
- Carvalho MS, Honorio NA, Garcia LMT, Carvalho LCS. *Aedes aegypti* control in urban areas: A systemic approach to a complex dynamic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(7):e0005632.
- Cerbino-Neto J, Mesquita EC, Souza TM, Parreira V, Wittlin BB, Durovni B, et al. Clinical Manifestations of Zika Virus Infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1318-20.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.
- Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, Rice CM. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. *J Virol.* 1999;73(4):3095–101.
- Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;47(2):155-66.
- Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NT, et al. Dengue in Vietnamese infants – results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease

- epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2008;198(4):516–24.
- Chau TN, Anders KL, Lien le B, Hung NT, Hieu LT, Tuan NM, et al. Clinical and virological features of Dengue in Vietnamese infants. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(4):e657.
- Chen R, Vasilakis N. Dengue—quo tu et quo vadis? *Viruses.* 2011; 3(9):1562-608.
- Chen RF, Wang L, Cheng JT, Chuang H, Chang JC, Liu JW, et al. Combination of CTLA-4 and TGFbeta1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. *Clin Immunol.* 2009;131(3):404-9.
- Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1295-304.
- Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(1):43-8.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006;80(23):11418–31.
- Cockburn JJ, Navarro Sanchez ME, Fretes N, Urvoas A, Staropoli I, Kikuti CM, et al. Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody. *Structure.* 2012;20(2):303-14.
- Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol.* 2003;77(7):3929–38.
- Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005;79(2):853–59.
- COSEMS/SP. Atenção Importância da dengue Internet: COSEMS/SP; 2012. Disponível em: <<http://www.cosemssp.org.br/noticias/120/atencao-importancia-da-dengue.html>> Acesso em: 02 jan 2018.
- Coudeville L, Baurin N, L'Azou M, Guy B. Potential impact of dengue vaccination: Insights from two large-scale phase III trials with a tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2016;34(50):6426-35.

- Crabtree MB, Kinney RM, Miller BR. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol.* 2005;150(4):771–86.
- Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol.* 2001;75(16):7769-73.
- Crill WD, Hughes HR, Delorey MJ, Chang GJ. Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One.* 2009;4(4):e4991.
- Crooks AJ, Lee JM, Easterbrook LM, Timofeev AV, Stephenson JR. The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. *J Gen Virol.* 1994;75(Pt 12):3453–60.
- Cunha RV, Netto GF. Aspectos clínico-epidemiológicos do Dengue Hemorrágico no Município do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1991;24(Supl.2):123-8.
- de Araújo JM. Vírus dengue sorotipo 3 (DENV-3) no Brasil: estudos sobre patogênica, sítios de replicação, filogenia e evolução molecular. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2009.
- de Araújo JM, de Filippis AM, Schatzmayr HG, Araújo ES, Britto C, Cardoso MA, et al. Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(9):952-4.
- de Araújo JM, Bello G, Romero H, Nogueira RM. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(9):e1784
- de Bruycker-Nogueira F, Nogueira RMR, da Costa Faria NR, Simões JBS, Nunes PCG, de Filippis AMB, et al. Insights Of The Genetic Diversity Of DENV-1 Detected In Brazil In 25 Years: Analysis of the Envelope Domain III allows Lineages Characterization. *Infect Genet Evol.* 2015;34:126-36.
- de Filippis I, Guerra Nunes PC, de Andrade CF, Gonçalves BS, de Araújo ES, Bezerra IO, et al. Fatal case of co-infection with dengue virus and *Neisseria meningitidis* during a dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *JMM Case Rep.* 2016;3(4):e005055.
- de la Cruz-Hernández SI, Flores-Aguilar H, González-Mateos S, López-Martínez I, Alpuche-Aranda C, Ludert JE, et al. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(3):446-54.

- De Simone TS, Nogueira RM, Araújo ES, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(9):553-62.
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science.* 2010;328(5979):745-8.
- Dettogni RS, Louro ID. Phylogenetic characterization of dengue virus type 2 in Espírito Santo, Brazil. *Mol Biol Rep.* 2012;39(1):71–80.
- Deubel V, Kinney RM, Trent DW. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology.* 1988;165(1):234–44.
- Diamond MS. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunol Cell Biol.* 2003;81(3):196–206.
- Dick OB, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(4):584-93.
- dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Viol J.* 2011;8:387.
- dos Santos FB, de Filippis AMB, Araújo ESM, Lima MRQ, Nogueira FB, Faria NRC, et al. A review on dengue diagnosis and epidemiology by a Regional reference laboratory in 25 years, Rio de Janeiro. *Brazil Dengue Bull.* 2013;37:61–76.
- Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeueng N, et al. Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(7):e1244.
- Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13(11): 1185–9.
- Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(8):e280.

- Duyen HT, Ngoc TV, Ha do T, Hang VT, Kieu NT, Young PR, et al. Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *J Infect Dis.* 2011;203(9):1292-300.
- Dye C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annu Rev Entomol.* 1992;37:1-19.
- Encyclopaedia Britannica, Inc. 2015. Swahili language. Disponível em: <<http://global.britannica.com/EBchecked/topic/576136/Swahili-language>> Acesso em: 22 jan 2015.
- Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, et al. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis.* 2004;189(6):990–1000.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):165-256.
- Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol.* 1997;142(5):897–916.
- Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* 1991;65(5):2467-75.
- Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simões JB, Nogueira Fde B, da Rocha Queiroz Lima M, et al. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2095.
- Felix A, Romano C, Centrone Cde C, Rodrigues C, Villas-Boas L, Araújo ES, et al. Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(12):1972-76.
- Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe.* 2009;5(4):318-28.

- Ferraz FO, Bomfim MR, Totola AH, Ávila TV, Cisalpino D, Pessanha JE, et al. Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. *J Clin Virol*. 2013;58(1):41-6.
- Fibriansah G, Ng TS, Kostyuchenko VA, Lee J, Lee S, Wang J, et al. Structural changes in dengue virus when exposed to a temperature of 37°C. *J Virol*. 2013;87(13):7585-92.
- Figueiredo A, Vieira NC, dos Santos JF, Janegitz BC, Aoki SM, Junior PP, et al. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. *Sci. Rep.* 2015;5:7865.
- Figueiredo LT. Dengue in Brazil: past, presente and future perspective. *Dengue Bulletin*. 2003;27:25-33.
- Figueiredo LT. Dengue in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(3):285.
- Figueiredo LTM, Cavalcante SMB, Simões MC. Dengue serologic survey of school children in Rio de Janeiro, Brazil, 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Org*. 1990, 24(2):217-25.
- Figueroa R, Ramos C. Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Arch Med Res*. 2000;31(4):429-30.
- Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol*. 1999;73(7):6104-10.
- Fox A, Le NM, Simmons CP, Wolbers M, Wertheim HF, Pham TK, et al. Immunological and viral determinants of dengue severity in hospitalized adults in Ha Noi, Viet Nam. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e967.
- Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e617.
- Fry S, Meyer M, Semple M, Simmons C, Sekaran S, Huang J, et al. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e1199.
- FUNASA. Casos de dengue no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

- Gamble J, Bethell D, Day NP, Loc PP, Phu NH, Gartside IB, et al. Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock? *Clin Sci (Lond)*. 2000;98(2):211–6.
- Garcia-Rivera EJ, Rigau-Perez JG. Dengue severity in the elderly in Puerto Rico. *Rev Panam Salud Publica*. 2003;13(6):362–8.
- Gubler DJ. Dengue. In: Monath TP, editor. *Epidemiology of arthropod-borne viral diseases*. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc.; 1988. p. 223–60.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G, editores. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. London: CAB International; 1997. p. 1–22.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):480–96.
- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002;10(2):100-3.
- Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. In: *New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases*. Wiley. Novartis Found Symp. 2006; 277:3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-3. Disponível em: < <https://books.google.com.br> > Acesso em: 21 Jan 2015.
- Gubler DJ. Dengue viruses: their evolution, history and emergence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farrar J, editores. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. 2. ed. Croydon: CAB International; 2014. p. 1-29. Parcialmente disponível em: < <https://books.google.com.br> > Acesso em: 22 Jan 2015.
- Gubler DJ, Rosen L. A simple technique for demonstrating transmission of dengue viruses by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am J Trop Med Hyg*. 1976; 25(1):146–50.
- Gubler DJ, Reed D, Rosen L, Hitchcock JR. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg*. 1978;27(3):581-9.
- Gubler DJ, Suharyono W, Lubis I, Eram S, Sulianti Saroso J. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. I. Virological and epidemiological studies. *Am J Trop Med Hyg*. 1979;28(4):701-10.
- Gubler DJ, Trent DW. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis*. 1993;2(6):383–93.



- Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Feres VC, Rocha B, Levi JE, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis.* 2008;197(6):817-24.
- Guzmán MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987–2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(6):522–3.
- Guzmán MG, Kouri G, Morier L, Soler M, Fernandez A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. *Bull Pan Am Health Organ.* 1984;18(3):213-20.
- Guzmán MG, Kouri G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica.* 2002;11(4):223-7.
- Guzmán MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010a;8(12 Supl): S7–S16.
- Guzmán MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010b;4(8).pii:e811.
- Guzmán MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015; 385(9966):453-65.
- Hadinegoro SR. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatr Int Child Health.* 2012;32 Suppl 1:33-8.
- Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med.* 1970;42(5):350–62.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988; 239(4839):476–81.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet.* 2007;370(9599):1644–52.
- Halstead SB. Dengue: overview and history. In: Pasvol G, editor. *Tropical Medicine: Science and Practice.* London: Imperial College Press; 2008. p. 1–28.
- Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med.* 1970; 42(5):311-28.
- Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science.* 1960;131(3407):1102-3.

- Hammond SN, Balmaseda A, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(6):1063–70.
- Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(1):e360.
- Harker BW, Behura SK, deBruyn BS, Lovin DD, Mori A, Romero-Severson J, et al. Stage-specific transcription during development of *Aedes aegypti*. *BMC Dev Biol.* 2013;13:29.
- Haug CJ, Kieny MP, Murgue B. The Zika Challenge. *N Engl J Med.* 2016; 374(19):1801-3.
- Hayes EB, Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J.* 1992; 11(4):311–7.
- Hladish TJ, Pearson CA, Chao DL, Rojas DP, Recchia GL, Gómez-Dantés H, et al. Projected Impact of Dengue Vaccination in Yucatán, Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 26:10(5):e0004661.
- Hoang KP, Teo TM, Ho TX, Le VS. Mechanisms of sex determination and transmission ratio distortion in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors.* 2016;9:49.
- Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 2003;3(1):19-28.
- Horstick OFJ, Lum L, Martine z E, San Martin JL, Ehrenberg J, Velayudhan R, et al. Reviewing the development, evidence base and application of the revised dengue case classification. *Pathog Glob Health.* 2012;106(2):94–101.
- Hotta S, Kimura R. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J Infect Dis.* 1952;90(1):1–9.
- Hu D, Fry SR, Huang JX, Ding X, Qiu L, Pan Y, et al. Comparison of surface plasmon resonance, resonant waveguide grating biosensing and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the evaluation of a dengue virus immunoassay. *Biosensors (Basel).* 2013;3(3):297-311.
- Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40(4):418-27.

- Inouye S, Matsuno S, Tsurukubo Y. “Original antigenic sin” phenomenon in experimental flavivirus infections of guinea pigs: studies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol. Immunol.* 1984; 28(5):569-74.
- Jain S, Mittal A, Sharma SK, Upadhyay AD, Pandey RM, Sinha S, et al. Predictors of Dengue-Related Mortality and Disease Severity in a Tertiary Care Center in North India. *Open Forum Infect Dis.* 2017; 4(2):ofx056.
- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J Infect Dis.* 2004;189(8):1411–8.
- John DV, Lin YS, Perng GC. Biomarkers of severe dengue disease - a review. *J Biomed Sci.* 2015;22:83.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):4977-83.
- Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, et al. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *J Virol.* 2010;84(16):8353-8.
- Kabra SK, Jain Y, Pandey RM, Madhulika, Singhal T, Tripathi P, et al. Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(3):294-8.
- Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* 1997;176(2):313-21.
- Kalayanarooj S, Nimmannitya S. Is dengue severity related to nutritional status? *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005;36(2):378-84.
- Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005;38(1):5-16.
- Khetarpal N, Khanna I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *J Immunol Res.* 2016;2016:6803098.
- Khurram M, Qayyum W, Hassan SJ, Mumtaz S, Bushra HT, Umar M. Dengue hemorrhagic fever: comparison of patients with primary and secondary infections. *J Infect Public Health.* 2014;7(6):489-95.

- Kinney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology*. 2001;44(2-3):176-97.
- Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38(2):411-9.
- Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;40(4):444-51.
- Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, et al. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 2002;360(9329):310-2.
- Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006;138(1-2):123-30.
- Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4154-9.
- Kouri G, Guzmán MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bull Pan Am Health Organ*. 1986;20(1):24-30.
- Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):821-3.
- Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*. 1989; 67(4):375-80.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002; 108(5):717-25.
- Kyaw AK, Ngwe Tun MM, Moi ML, Nabeshima T, Soe KT, Thwe SM, et al. Clinical, virological and epidemiological characterization of dengue outbreak in Myanmar, 2015. *Epidemiol Infect*. 2017;145(9):1886-97.

- Lai CY, Tsai WY, Lin SR, Kao CL, Hu HP, King CC, et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol.* 2008;82(13):6631-43.
- Lanciotti RS. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;61:67-99.
- Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, Chakorn T, et al. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(4):387-91.
- Laughlin CA, Morens DM, Cassetti MC, Costero-Saint Denis A, San Martin JL, Whitehead SS, et al. Dengue research opportunities in the Americas. *J Infect Dis.* 2012;206(7):1121-7.
- L'Azou M, Taurel AF, Flamand C, Quénel P. Recent epidemiological trends of dengue in the French territories of the Americas (2000-2012): a systematic literature review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(11):e3235.
- Lee CC, Hsu HC, Chang CM, Hong MY, Ko WC. Atypical presentations of dengue disease in the elderly visiting the ED. *Am J Emerg Med.* 2013a;31(5):783-7.
- Lee LK, Earnest A, Carrasco LR, Thein TL, Gan VC, Lee VJ, et al. Safety and cost savings of reducing adult dengue hospitalization in a tertiary care hospital in Singapore. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013b;107(1):37-42.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999;73(6):4738-47.
- Leo YS, Gan VC, Ng EL, Hao Y, Ng LC, Pok KY, et al. Utility of warning signs in guiding admission and predicting severe disease in adult dengue. *BMC Infect Dis.* 2013;13:498.
- Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science.* 2008; 319(5871):1830-4.
- Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1165-8.

- Lima EP, Goulart MO, Rolim Neto ML. Meta-analysis of studies on chemical, physical and biological agents in the control of *Aedes aegypti*. *BMC Public Health*. 2015;15:858. doi: 10.1186/s12889-015-2199-y.
- Lima M da R, Nogueira RM, Filippis AM, Nunes PC, Sousa CS, Silva MH, et al. A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. *J Virol Methods*. 2014;204:105-8.
- Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol*. 2006;19(2):127–32.
- Linares EM, Pannuti CS, Kubota LT, Thalhammer S. Immunospot assay based on fluorescent nanoparticles for Dengue fever detection. *Biosens. Bioelectron*. 2013;41:180–5.
- Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23-61.
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007. p. 1101-52.
- Lindenbach BD, Murray CL, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editores. *Field's virology*. vol 1. 6. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh AA. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J Virol*. 2004; 78(22):12225-35.
- Lorenz IC, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J Virol*. 2003;77(7):4370-82.
- Low JG, Ong A, Tan LK, Chaterji S, Chow A, Lim WY, et al. The early clinical features of dengue in adults: challenges for early clinical diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;(5): e1191.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(6):1292-305.
- Mackenzie J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic*. 2005;6(11):967–77.
- Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 1996;220(1):232-40.

- Mackenzie JM, Jones MK, Westaway EG. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J. Virol.* 1999;73(11):9555-67.
- Mackenzie JM, Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol.* 2001;75(22):10787-99.
- Mackow E, Makino Y, Zhao BT, Zhang YM, Markoff L, Buckler-White A, et al. The nucleotide sequence of dengue type 4 virus: analysis of genes coding for nonstructural proteins. *Virology.* 1987;159(2):217-28.
- Mandl CW, Heinz FX, Stockl E, Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology.* 1989;173(1):291-301.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Ver.* 2009;22(4):564-81.
- Martinez-Torres ME. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Martí; 1990. 180p.
- Marzochi KBF, Carneiro MB, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Ewerton E, Souza RV. A Dengue no Rio de Janeiro: modelo clínico-laboratorial. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987;20:29-35.
- Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology.* 1989;169(2):354-64.
- Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. Use of four dengue virus antigens for determination of dengue immune status by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5784-6.
- Mattingly PF. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. I. Taxonomy and bionomics. *Ann Trop Med Parasitol.* 1957;51(4):392-408.
- McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect.* 2000;2(9):1041-50.
- McFarlane M, Arias-Goeta C, Martin E, O'Hara Z, Lulla A, Mousson L, et al. Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(7):e2994.

- McSherry JA. Some medical aspects of the Darien scheme: was it dengue? *Scott Med J*. 1982;27(2):183-4.
- Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(7):800-9.
- Meynard JB, Ardillon V, Venturin C, Ravachol F, Basurko C, Matheus S, et al. First description of a dengue fever outbreak in the interior of French Guiana, February 2006. *Eur J Public Health*. 2009;19(2):183-8.
- Miagostovich M, Nogueira R, Schatzmayr H, Lanciotti R. Molecular epidemiology of DEN-2 virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93(5):625-6.
- Miagostovich MP, Vorndam V, Araújo ESM, Santos FB, Schatzmayr HG, Nogueira RMR. Evaluation of IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol*. 1999;14(3):183-9.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427(6972):313-9.
- Mohammed H, Ramos M, Armstrong J, Muñoz-Jordán J, Arnold-Lewis KO, Ayala, A et al. An Outbreak of Dengue Fever in St. Croix (US Virgin Islands), 2005. *PLoS One*. 2010;5(10):e13729.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13-22.
- Muller DA, Landsberg MJ, Bletchly C, Rothnagel R, Waddington L, Hankamer B, et al. Structure of the dengue virus glycoprotein non-structural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis. *J Gen Virol*. 2012;93(Pt 4):771-9.
- Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14333-8.
- Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(11):e1397.
- Nasirudeen AM, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1):e926.



- Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L: Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005;36(5):425-35.
- Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(12):2516-21.
- Nelson S, Jost CA, Xu Q, Ess J, Martin JE, Oliphant T, et al. Maturation of West Nile virus modulates sensitivity to antibody-mediated neutralization. *PLoS Pathog.* 2008; 4(5):e1000060.
- Nguyen TH, Nguyen TL, Lei HY, Lin YS, Le BL, Huang KJ, et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(4):370-4.
- Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, Vo DT, et al. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(10):e304.
- Ngwe Tun MM, Thant KZ, Inoue S, Kurosawa Y, Lwin YY, Lin S, et al. Serological characterization of dengue virus infections observed among dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in upper Myanmar. *J Med Virol.* 2013;85(7):1258-66
- Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology.* 2009;6:211.
- Nimmannitya S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1987;18(3):392-7
- Nimmannitya S. Clinical manifestations of Dengue/Dengue haemorrhagic fever. In: Thongcharoen P, editor. *Monograph on Dengue/Dengue haemorrhagic fever.* India: World Health Organization; 1993. p. 48-57.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MF, Farias Filho JD. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83(2):219-25.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990;85(2):253.
- Nogueira RMR, Zagne SMO, Martins ISM. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86(2):269-74.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Virol.* 1992; 143(6):423-7.

- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect.* 1993;111(1):163-70.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Cunha RV, Zagne SM, Gomes FP, Nicol AF, et al. Fatal primary dengue infections in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(4):418.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(7):925-6.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, Filippis AMB, dos Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(9):1376-81.
- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica.* 2007;22(5):358-63.
- Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(3):255-6.
- Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med.* 2008;233(4):401-8.
- Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DBA, Lima CPS, Carvalho VL, et al. Phylogeography of Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010–2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(11):1858-64.
- Nunes PC, Sampaio SA, da Costa NR, de Mendonça MC, Lima Mda R, Araujo SE, et al. Dengue severity associated with age and a new lineage of dengue virus-type 2 during an outbreak in Rio De Janeiro, Brazil. *J Med Virol.* 2016;88(7):1130-6.
- OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborío S, et al. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med.* 2011;3(114):114ra128.
- Oliphant T, Nybakken GE, Austin SK, Xu Q, Bramson J, Loeb M, et al. Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus. *J Virol.* 2007;81(21):11828-39.
- Oliveira ECL, Pontes ERJC, Cunha RV, Froés IB, Nascimento D. Alterações hematológicas em pacientes com dengue. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(6):682-5.

- Oliveira MF, Galvao de Araujo JM, Ferreira OC Jr, Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):576-8.
- Osanai CH, Travassos da Rosa APA, Amaral S, Passos ACD, Tauil PL. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima: Nota Prévia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983;25(1):53-4.
- PAHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control (Scientific Publication No. 548). Washington DC, Pan American Health Organization. 1994
- PAHO/WHO. State of the arte of the prevention and control of dengue in the américas. Meeting Report. Washington DC, USA. 28-29 Maio 2014.
- PAHO/WHO. 2017: Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue in the Americas, by Country - October 27, 2017 (EW 41). Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=1](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1)>. Acesso em: 16 jan 2018.
- Palucka AK. Dengue virus and dendritic cells. *Nature Medicine*. 2000;6(7):748-9.
- Pang J, Lindblom A, Tolfvenstam T, Thein TL, Naim AN, Ling L, et al. Discovery and Validation of Prognostic Biomarker Models to Guide Triage among Adult Dengue Patients at Early Infection. *PLoS One*. 2016;11(6):e0155993.
- Pang T, Cardoso MJ, Guzmán MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 2007;85(1):43-5.
- Pang Z, Li A, Li J, Qu J, He C, Zhang S, et al. Comprehensive multiplex one-step real-time TaqMan qRT-PCR assays for detection and quantification of hemorrhagic fever viruses. *PLoS One*. 2014;9(4):e95635.
- Pang X, Zhang R, Cheng G. Progress towards understanding the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virolog Sin*. 2017;32(1):16-22
- Panyasrivanit M, Khakpoor A, Wikan N, Smith DR. Colocalization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J Gen Virol*. 2009; 90(Pt 2):448-56.
- Passos MN, Santos LM, Pereira MR, Casali CG, Fortes Bde P, Ortiz Valencia LI, et al. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de

- 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37(4):293-5
- Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Supl):S30-8.
- Perdomo-Celis F, Salgado DM, Narváez CF. Magnitude of viremia, antigenemia and infection of circulating monocytes in children with mild and severe dengue. *Acta Trop.* 2017;167:1-8.
- Perng GC, Chokephaibulkit K. Immunologic hypo- or non-responder in natural dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 2013;20:34.
- Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2010;71(11):1135-40.
- Phuong CX, Nhan NT, Kneen R, Thuy PT, van Thien C, Nga NT, et al. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful? *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(2):172-9.
- Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2012;2(2):168-75.
- Plevka P, Battisti AJ, Junjhon J, Winkler DC, Holdaway HA, Keelapang P, et al. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO Rep.* 2011;12(6):602-6.
- Pryor MJ, Wright PJ. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. *J Gen Virol.* 1994;75(Pt 5):1183-7.
- Ranjit S, Kissoon N. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes *Pediatr Crit Care Med.* 2011;12(1):90-100.
- Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J.* 2016;13:131.
- Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One.* 2012;7(12):e52215.

- Recker M, Vannice K, Hombach J, Jit M, Simmons CP. Assessing dengue vaccination impact: Model challenges and future directions. *Vaccine*. 2016;34(38):4461-5.
- Reis NN, Silva ALD, Reis EPG, Silva FCE, Reis IGN. Viruses vector control proposal: genus *Aedes* emphasis. *Braz J Infect Dis*. 2017;21(4):457-63.
- Rey FA. Dengue virus: two hosts, two structures. *Nature*. 2013;497(7450):443-4.
- Rezza G. Dengue and chikungunya: long-distance spread and outbreaks in naïve areas. *Pathog Glob Health*. 2014;108(8):349-55.
- Rice CM, Strauss EG, Strauss JH. Structure of the flavivirus genome. In: *The Togaviridae and Flaviviridae*. Schlesinger S, Schlesinger M J, editores. New York: Plenum; 1986. p. 279-326.
- Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174(2):479-93.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997; 230(2):244-51.
- Rocco IM, Barbosa ML, Kanomata EHN. Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1998;40(3):151-4.
- Rocha BAM, Guilarde AO, Argolo AFLT, Tassara MP, da Silveira LA, Junqueira IC, et al. Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil. *Infect Dis Poverty*. 2017;6(1):116.
- Rodhain F, Rosen L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relations ships. In: Gubler DJ, Kuno G, editores. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; 1997. p. 45-60.
- Rodrigues MBP, Freire HBM, Corrêa PRL, Mendonça ML, Silva MRI, França EB. É possível identificar a dengue em crianças a partir do critério de caso suspeito preconizado pelo Ministério da Saúde? *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81(3):209-15.
- Romano CM, de Matos AM, Araujo ESA, Villas-Boas LS, da Silva WC, Oliveira OM, et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS ONE*. 2010;5(7):e11811.
- Rosen L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1977;26(3):337-43.

- Rosen L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;37(2):398-402.
- Rothman AL. Dengue: Defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 2004;113(7):946-51.
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):532-43.
- Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 1999;257(1):1-6.
- Rowe EK, Leo YS, Wong JG, Thein TL, Gan VC, Lee LK, et al. Challenges in dengue fever in the elderly: atypical presentation and risk of severe dengue and hospital-acquired infection [corrected]. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(4):e2777.
- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet.* 2012;380(9853):1559-67.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 1984;120(5):653-69.
- Sanofi Pasteur Media Release . Disponível em: <<http://www.sanofipasteur.com/en/articles/First-Vaccinations-against-Dengue-Mark-Historic-Moment-in-Prevention-of-Infectious-Diseases.aspx>> Acesso em: 19 set 2016.
- Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2311.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa AP. An outbreak of Dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(2):245-6.
- Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol.* 1987;68(Pt 3):853-7.

- Schneider J, Droll D. A Time Line for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and Noted First Occurrences. Washington, DC: Pan American Health Organization; 2001. Disponível em: <[www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue\\_finaltime.doc](http://www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue_finaltime.doc)> Acesso em: 25 jan 2015.
- Schüpbach J, Flepp M, Pontelli D, Tomasik Z, Lüthy R, Böni J. Heat-mediated immune complex dissociation and enzyme-linked immunosorbent assay signal amplification render p24 antigen detection in plasma as sensitive as HIV-1 RNA detection by polymerase chain reaction. *AIDS*. 1996;10(10):1085-90.
- Service MW. Importance of ecology in *Aedes aegypti* control. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992;23(4):681-90.
- Shen WF, Galula JU, Chang GJ, Wu HC, King CC, Chao DY. Improving dengue viral antigens detection in dengue patient serum specimens using a low pH glycine buffer treatment. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017;50(2):167-74.
- Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):200-7.
- Silva MMS, Dias ACMS, Silva BVM, Gomes-Filho SLR, Kubota LT, Goulart MOF, et al. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. *J Chem Technol Biotechnol*. 2015;90(1):194–200.
- Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol*. 2017; 98(1):2-3.
- Simmons CP, Chau TN, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Thien NT, et al. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. *J Infect Dis*. 2007;196(3):416-24.
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012;366(15):1423-32.
- Singla M, Kar M, Sethi T, Kabra SK, Lodha R, Chandele A, et al. Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India--Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004497.
- Siqueira JB Jr, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(1):48-53.

- Siqueira JB Jr, Vinhal LC, Said RFC, Hoffmann JL, Martins J, Barbiratto SB, et al. Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. In: Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde; 2011. p. 157-72.
- Smith GW, Wright PJ. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. *J Gen Virol*. 1985;66(Pt 3):559-71.
- Somnuk P, Hauhart RE, Atkinson JP, Diamond MS, Avirutnan P. N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. *Virology*. 2011;413(2):253-64.
- Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:67-82.
- Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, et al. Dengue—how best to classify it. *Clin Infect Dis*. 2011;53(6):563-7.
- Stadler K, Allison SL, Schlich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*. 1997;71(11):8475-81.
- Steel A, Gubler DJ, Bennett SN. Natural attenuation of dengue virus type-2 after a series of island outbreaks: a retrospective phylogenetic study of events in the South Pacific three decades ago. *Virology*. 2010;405(2):505-12.
- Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Org*. 2005;83(4):308-14.
- SVS. Secretaria de Vigilância Sanitária. 2008. Relatório de casos de dengue. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov/Docs/Acoes/dengue/Relatorio.htm>> Acesso em: 1 set 2017.
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>>Acesso em: 1 set 2017.
- Tanner L, Schreiber M, Low JG, Ong A, Tolfvenstam T, Lai YL, et al. Decision tree algorithms predict the diagnosis and outcome of dengue fever in the early phase of illness. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(3):e196.



- Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saude Publica*. 2001;17(Supl):99-102.
- Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*. 1999;8(4):5-33.
- Teixeira MG, Costa MC, Barreto F, Barreto ML. Dengue: Twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25(Supl 1):S7–18.
- Thai KT, Phuong HL, Thanh Nga TT, Giao PT, Hung le Q, Van Nam N, et al. Clinical, epidemiological and virological features of Dengue virus infections in Vietnamese patients presenting to primary care facilities with acute undifferentiated fever. *J Infect*. 2010;60(3):229-37.
- Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56(5):566-72.
- Thein TL, Gan VC, Lye DC, Yung CF, Leo YS. Utilities and limitations of the World Health Organization 2009 warning signs for adult dengue severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2023.
- Thisyakorn U, Nimmannitya S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis*. 1993;16(2):295-7.
- Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, et al. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(6):990-8.
- Thomas L, Najioullah F, Verlaeten O, Martial J, Brichler S, Kaidomar S, et al. Relationship between nonstructural protein 1 detection and plasma virus load in Dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(3):696-9.
- Thomas L, Najioullah F, Besnier F, Valentino R, Césaire R, Rosine J, et al. Clinical presentation of dengue by serotype and year of epidemic in Martinique. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(1):138-45.
- Tricou V, Vu HT, Quynh NV, Nguyen CV, Tran HT, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis*. 2010;10:142.

- Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(9):e1309.
- Tsai CY, Lee IK, Lee CH, Yang KD, Liu JW. Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(4):271-81.
- Tung YC, Lin KH, Chang K, Ke LY, Ke GM, Lu PL, et al. Phylogenetic study of dengue-3 virus in Taiwan with sequence analysis of the core gene. *Kaohsiung J Med Sci*. 2008;24(2):55-62.
- van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog*. 2008;4(12):e1000244.
- Vasconcelos PF, Travassos da Rosa ES, Travassos da Rosa JF, de Freitas RB, Dégallier N, Rodrigues SG, et al. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaiana, Tocantins, Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993;35(2):141-8.
- Vasconcelos PFC, Menezes DB, Melo LP, Pessoa EFTP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1995;37(3):253-5.
- Vasilakis N, Shell EJ, Fokam EB, Mason PW, Hanley KA, Estes DM, et al. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology*. 2007;358(2):402-12.
- Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res*. 2008;72:1-76.
- Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(7):532-41.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000;181(1):2-9.
- Vicente CR, Herbinger KH, Fröschl G, Malta Romano C, de Souza Areias Cabidelle A, Cerutti Junior C. Serotype influences on dengue severity: a cross-sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitória, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2016;16:320

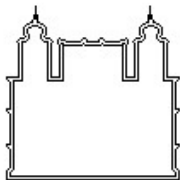
- Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med*. 2015;372(2):113-23.
- Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infection. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Gubler DJ, Kuno G, editores. New York: CAB International; 1997. p. 313-33.
- Wang W, Chao D, Kao C, Wu H, Liu Y, Li C, et al. High Levels of Plasma Dengue Viral Load during Defervescence in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever: Implications for Pathogenesis. *Virology*. 2003;305(2):330-8.
- Watanabe S, Tan KH, Rathore APS, Rozen-Gagnon K, Shuai W, Rueda C. The magnitude of dengue virus protein secretion is strain dependent and does not correlate with severe pathologies in the mouse infection model. *J Virol*. 2012;86(10):5508-14.
- Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1999;354(9188):1431-4.
- Weaver SC, Barrett AD. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(10):789-801.
- Weerakkody RM, Palangasinghe DR, Dalpatadu KP, Rankothkumbura JP, Cassim MR, Karunanayake P. Dengue fever in a liver-transplanted patient: a case report. *J Med Case Rep*. 2014;8:378.
- Wentzel M. Brasil testa duas armas contra o *Aedes aegypti*: saiba quando teremos resultado. *BBC Brasil*. 2015.
- Westaway EG, Blok J. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. In: *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Gubler DJ, Kuno G, editores. London, United Kingdom: CAB International; 1997. p. 147-73.
- Westaway EG, Goodman MR. Variation in distribution of the three flavivirus-specified glycoproteins detected by immunofluorescence in infected Vero cells. *Arch Virol*. 1987; 94(3-4):215-28.
- Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 2011;29(42):7221-8.

- Williams M, Mayer SV, Johnson WL, Chen R, Volkova E, Vilcarrromero S, et al. Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 is associated with a severe dengue outbreak in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(3):611-20.
- Winkler G, Randolph VB, Cleaves GR, Ryan TE, Stollar V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology.* 1988;162(1):187-96.
- Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology.* 1989;171(1):302-5.
- Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem.* 1990;186(2):328-31.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques.* 2013;54(6):314-20.
- WHO. World Health Organization. 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/index.html>> Acesso em: 5 set 2016.
- WHO/TDR. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New Edition. Geneva: World Health Organization, 2009.
- WHO. World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control 2012–2020. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2012. Part 3.3: Sustainable vector control. p. 14–16.  
Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf?ua=1)>.  
Acesso em: 27 jul 2014.
- WHO. World Health Organization. Dengue and severe dengue. Fact Sheet No. 117. Updated April 2016 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em: 18 Jul 2016.
- WHO. World Health Organization. Dengue control. *Epidemiology.* Disponível em: <<http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>> Acesso em: 1 set 2017.

- Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop Med Int Health*. 2004;9(9):1022-9.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*. 2000;6(7):816-20.
- Yacoub S, Wills B. Predicting outcome from dengue. *BMC Med*. 2014;12:147.
- Yeh WT, Chen RF, Wang L, Liu JW, Shaio MF, Yang KD. Implications of previous subclinical dengue infection but not virus load in dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;48(1):84-90.
- Yew YW, Ye T, Ang LW, Ng LC, Yap G, James L, et al. Seroepidemiology of dengue virus infection among adults in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2009;38(8):667-75.
- Young RP, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1053-7.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*. 2008;319(5871):1834-7.
- Yung CF, Lee KS, Thein TL, Tan LK, Gan VC, Wong JG, et al. Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(5):999-1005.
- Zagne SMO, Alves VGF, Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Tavares W. Dengue haemorrhagic fever in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88(6):677-9.
- Zhang X, Sheng J, Plevka P, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(17):6795-9.
- Zhang H, Zhou YP, Peng HJ, Zhang XH, Zhou FY, Liu ZH, et al. Predictive symptoms and signs of severe dengue disease for patients with dengue fever: a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:359308.

## 12 – ANEXOS

Neste item, estão incluídos o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/FIOCRUZ, o trabalho desta tese submetido à revista científica indexada e os trabalhos publicados com co-autoria.



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 13 de maio de 2014.

**Solicitação de extensão do prazo de execução de projeto e emenda**

**Título do Projeto:** *"Dengue no Brasil: vigilância virológica, epidemiologia molecular e padronização de método sorológico utilizando antígenos recombinantes".*

**Protocolo de pesquisa:** 274/05

**Pesquisador Responsável:** Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira.

**Instituição:** Laboratório de Flavivírus do IOC/Fiocruz

---

Foi submetido à apreciação do CEP Fiocruz/IOC e APROVADA a solicitação de extensão do prazo de execução do projeto supracitado até 2016, e a emenda solicitando a inclusão de Biomanguinhos como colaborador do projeto.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifestase pela aprovação da solicitação de extensão do prazo de execução do projeto supracitado.

Informamos que deverão ser apresentados relatórios parciais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

---

**José Henrique da Silva Pilotto**  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
(CEP Fiocruz-IOC)

# PLOS ONE

## Dynamics of non-structural glycoprotein-1 in dengue patients presenting with different clinical manifestations from 1986 to 2012 in Rio de Janeiro, Brazil

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-17-30072
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Dynamics of non-structural glycoprotein-1 in dengue patients presenting with different clinical manifestations from 1986 to 2012 in Rio de Janeiro, Brazil
<b>Short Title:</b>	Dynamics of non-structural glycoprotein-1 in dengue patients
<b>Corresponding Author:</b>	Bianca De Santis Fundacao Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, BRAZIL
<b>Keywords:</b>	dengue severity; antigenemia; non-structural protein 1; immune status; infecting serotype
<b>Abstract:</b>	<p>The hyperendemicity and co-circulation of different dengue serotypes in Brazil have increased the number of severe dengue cases and the rate of hospitalization for dengue. Virological and individual factors are associated with the disease's complexity, and, in particular, the antigenemia levels of non-structural glycoprotein-1 (NS1) have been associated with dengue warning signs. Here, we evaluated the association of NS1 antigenemia with viremia levels, immune status, and demographic factors in patients from the state of Rio de Janeiro clinically classified as having dengue with warning signs and dengue without warning signs. The patient samples were from 1986 to 2012, a period encompassing the intervals of introduction and outbreaks of dengue virus serotypes 1-4 (DENV-1-4). Although sera from patients with primary infection showed higher NS1 titers, mainly in DENV-3-infected patients, immune status was not significantly related to dengue warning signs for any serotype. However, warning signs were significantly associated with low levels of NS1 antigenemia in DENV-1 patients. There was no relation between viremia and NS1 levels for any of the serotypes in patients with or without warning signs. In terms of demographic factors, higher levels of NS1 were observed in men, but no association was observed between disease outcome and sex. The risk of developing warning signs was ~3.2 times higher for patients in the age range of 13-19 years compared to other age ranges. Despite NS1 antigenemia being independent of age for all 4 serotypes together, as well as for serotypes 3 and 4 singly, DENV-1 and DENV-2 infections and age ranges of 13-19 and 20-59 years, respectively, demonstrated the highest NS1 titers. In conclusion, NS1 antigenemia was influenced by warning signs for DENV-1, immune status, infecting serotype and age range, and did not show association with viremia. Our findings suggest that NS1 antigenemia was not an ideal biomarker to predict disease severity in the studied population.</p>
<b>Order of Authors:</b>	Bianca De Santis Gonçalves Rita Maria Ribeiro Nogueira Monique da Rocha Queiroz Lima Eliane Saraiva de Araújo Simone Alves Sampaio Ana Maria Bispo de Filippis
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<b>Financial Disclosure</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



# Dengue Severity Associated With Age and a New Lineage of Dengue Virus-Type 2 During an Outbreak in Rio De Janeiro, Brazil

Priscila Conrado Guerra Nunes, Simone Alves Faria Sampaio, Nieli Rodrigues da Costa, Marcos Cesar Lima de Mendonça, Monique da Rocha Queiroz Lima, Saraiva Eliane M Araujo, Flávia Barreto dos Santos, Jaqueline Basto Santos Simões, Bianca de Santis Gonçalves, Rita Maria Ribeiro Nogueira, and Ana Maria Bispo de Filippis\*

*Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation / Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil*

Dengue virus-type 2 (DENV-2) caused three outbreaks, in the years 1990, 1998, and 2008, in Rio de Janeiro, Brazil. The 2008 outbreak was the most severe in reported cases, hospitalizations, and deaths. To investigate virological and epidemiological factors that may have contributed to the pathogenic profile of 2008 epidemic, 102 patients sera obtained during the epidemic and inter-epidemic periods of three outbreaks were analysed by qRT-PCR to estimate viremia levels and their correlation with the clinical, immunological, and demographic patient characteristics. DENV-2 isolates from the outbreaks were sequenced. Two DENV-2 lineages (I and II) of the American/Asian genotype were confirmed, each exclusive for 1990–2002 and 2007–2011, respectively. The mean viremia level in the 2008 samples was two orders of magnitude higher than that of the 1990–2002 samples. Severe dengue cases increased from 31% in 1990–2002 to 69% in 2007–2011; in patients aged  $\leq 15$  years, from 3% in 1990–2002 to 37% in 2007–2011. The DENV-2 lineage II and younger age significantly contributed to the pathogenic profile of 2008 epidemic in Rio de Janeiro. **J. Med. Virol.** 88:1130–1136, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** viremia; qRT-PCR; genotype; dengue outbreaks

## INTRODUCTION

Dengue virus (DENV) infections have unpredictable clinical outcomes ranging from asymptomatic or a mild febrile illness to severe and fatal disease. Globally it estimated that 3.6 billion people live in dengue risk areas [WHO, 2009; Bhatt et al., 2013].

Since the introduction of DENV in Brazil in 1981, about 12 million cases have been reported. In the last 3 decades, Brazil has accounted for 70% of all dengue cases in the Americas, with the case fatality rate varying from 1.45% (1995) to 11.25% (2007) [Teixeira et al., 2009; San Martín et al., 2010; SVS, 2012]. In particular, the state of Rio de Janeiro (southeast region of Brazil) has been marked with extensive dengue epidemics due to the introduction or re-emergence of different dengue serotypes during the last 28 years. After the introduction of DENV-2 in 1990, two additional DENV-2 outbreaks occurred in Rio de Janeiro in 1998 and 2008. The 2008 epidemic was considered to be of a greater magnitude with 806,036 cases reported across the country. During this epidemic, approximately 322,000 dengue cases were reported in Rio de Janeiro with 252 fatal cases [Nogueira et al., 2007; SVS, 2008; Gibson et al., 2013; Macedo et al., 2013]. Coincidentally, a change in the epidemiological disease profile was observed during the 2008 epidemic with an increase in severity and the number of affected children  $\leq 15$  years of age [Teixeira et al., 2009].

According to the phylogenetic analysis of the DENV-2 strains isolated during the epidemics of 1990, 1998, and 2008 in Rio de Janeiro, the virus isolated in the 2008 epidemic was genetically different from the other epidemics despite belonging to the

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Grant number: 304872/2011-3; Grant sponsor: Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ; Grant numbers: E-26/110.663/2013; E/-26/103.149/2011

Conflict of Interest: None

\*Correspondence to: Ana Maria Bispo de Filippis, FIOCRUZ/IOC - Av. Brasil, 4365 Manguinhos – Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: abispo@ioc.fiocruz.br

Accepted 29 December 2015

DOI 10.1002/jmv.24464

Published online 9 February 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

same genotype (American/Asian). Therefore, the 1990 and 1998 viruses were classified as lineage I and those of 2008 were considered as lineage II [Oliveira et al., 2010; Faria et al., 2013]. Mechanisms that determine the variations in the clinical manifestations of dengue infections are not clearly understood, but are frequently associated with types of infection, viral serotype, genotype, lineages, and host genetic factors [Simmons et al., 2007]. The two most accepted hypotheses for the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF) are based on antibody-dependent-enhancement or virulence of the viral strain [Halstead et al., 1970; Rosen, 1986; Rico-Hesse et al., 1997; Silva et al., 2010]. According to the second hypothesis, disease severity depends on the degree of virulence of the DENV variants. Therefore, strains that replicate more efficiently and reach higher serum titres have a greater epidemic potential and higher incidence of DHF and dengue shock syndrome [Rico-Hesse et al., 1997; Vaughn et al., 2000; Rico-Hesse, 2003; Silva et al., 2010].

The circulation of different DENV-2 lineages in Brazil has been described in phylogenetic studies [Oliveira et al., 2010; Drumond et al., 2013; Faria et al., 2013; Romano et al., 2010]; however, the impact of these lineages in the Brazilian population has not been previously evaluated. In the present study, we analyzed the epidemiological profile of DENV-2 strains (lineages I and II) circulating in Rio de Janeiro through the correlation of viremia levels, disease severity and patients characteristics, in order to determine the factors that may have contributed to the pathogenic profile of the 2008 epidemic.

## MATERIALS AND METHODS

### Specimens

We obtained 102 serum from patients in Rio de Janeiro representative of periods of lineages circulation (American/Asian genotype), 1990–2002 (lineage I) and 2007–2011 (lineage II), respectively, which encompass the three DENV-2 epidemics (1990, 1998, 2008). Acute serum (days 1–4) were selected from patients previously confirmed as DENV-2 [Lanciotti et al., 1992] and clinically classified as dengue or severe dengue [WHO, 2009]. The major symptoms used for clinical classification of dengue cases were patients presenting fever with two or more of the following symptoms: headache, pain behind the eyes, muscle and joint pains, nausea, vomiting or rash. The severe dengue cases presented symptoms of respiratory insufficiency, severe bleeding, organ failure or death. Cases were further classified according to the immune status of the patient (i.e., primary or secondary dengue infection) [Miagostovich et al., 1999].

### Quantification of Viral RNA

Viral RNA was extracted from 140  $\mu$ l of human serum specimens with the QIAamp Viral RNA Mini

Kit (QIAGEN, Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's suggested protocol. Viremia levels were measured by serotype-specific qRT-PCR assay using a previously reported protocol [de Oliveira Poersch et al., 2005]. The number of copies of viral RNA detected was calculated by generating a standard curve using five points by 10 times dilution of RNA extracted from a DENV-2 prototype, strain 40247, with a title of  $8,7 \times 10^7$  PFU/ml, which was determined by a plaque assay [Azevedo et al., 2011].

### Sequencing and Phylogenetic Analysis

Partial genome sequencing of the envelope (E) gene of DENV-2 isolates from 1990 to 2002 ( $n=19$ ) and 2007 to 2011 ( $n=25$ ) were performed on PCR amplified products as previously described [Faria et al., 2013]. A multiple alignment of the sequences was performed using CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>); phylogenetic analysis was conducted using the MEGA 5 software ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) and the neighbor-joining method according to the [Tamura et al., 2011].

### Statistical Analyses

SPSS software for Windows 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all parametric tests (*t*-test and/or Fisher's test). Differences were considered significant for *P*-values  $<0.05$ .

### Ethical Approval

Study approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (Resolution number: CSN196/96) and the Ministry of Health, Brazil.

## RESULTS

### Patient Serum Samples and Inter-Relationships Between Variables

A total of 102 serum samples were analyzed from patients affected with DENV-2 lineages I and II during 1990–2002 ( $n=52$ ; 51%) and 2007–2011 ( $n=50$ ; 49%), respectively. From 1990 to 2002, 77% (40/52) of samples were from 1990 ( $n=20$ ) and 1998 ( $n=20$ ) epidemics, respectively and approximately 80% (40/50) from the period 2007 to 2011 were from the 2008 epidemic; therefore, about two random samples were selected from each year for genetic characterization to represent the other years in both periods. Cases from the interim period (i.e., 2003–2006) and after 2011 were not included in this study because there was no DENV-2 activity in Rio de Janeiro during these periods.

The demographic characteristics of the patients included a male:female ratio of 1:1.04 (50 males and 52 females) and an age range of 1–88 years. Approximately 21% (18/85) of patients were aged  $\leq 15$  years and 79% (67/85) of patients were aged  $\geq 16$  years; age data were missing for 17% (17/102) of patients.

Regarding types of infection, primary and secondary infections were observed in 29% (30/102) and 71% (72/102) of patients, respectively. According to the clinical classification, 70% (67/102) and 34% (35/102) of patients were dengue and severe dengue, respectively. According to the correlation of types of infection versus clinical classification by age group, 72% (13/18) of the patients aged  $\leq 15$  years had secondary infection, which was classified as severe dengue 54% (7/13) or dengue 46% (6/13). Primary infection accounted for 28% (5/18) of patients aged  $\leq 15$  years and 80% (4/5) of those cases involved severe dengue. In the subgroup of patient aged  $\geq 16$  years, 27% (18/67) and 73% (49/67) of cases were primary and secondary infections, respectively. Out of the secondary infection cases, 33% (16/49) and 67% (33/49) of cases progressed to severe dengue and dengue, respectively. In contrast to the subgroup of patients aged  $\leq 15$  years, a smaller fraction of the population in the older subgroup had primary rather than secondary infection and 22% (4/18) of those progressed to severe dengue.

### Correlation Between DENV-2 Infection Periods and Patient Variables

The correlations between the infection periods and patient characteristics (i.e., age, gender, disease severity, and types of infection) were analyzed. During 1990–2002, due to the epidemiological pattern of dengue in Brazil, the great majority of the cases involved patients aged  $\geq 16$  years (97%). In this period although we have received samples from 10 patients  $\leq 15$ , only one fulfilled the inclusion criteria to have DENV-2 confirmed, IgM confirmed the remaining cases as dengue. Whereas, during 2007–2011, the number of patients age  $\leq 15$  years increased to 37%, furthermore, the number of severe dengue cases increased from 21% in 1990–2002 to 56% in 2007–2011. However, gender and types of infection were not significantly correlated with disease severity in the two periods.

The correlations between clinical classification (i.e., dengue and severe dengue) and key variables (i.e., age, gender, types of infection, and viral lineage) (Table I) were analyzed using Fisher's test. No correlations were observed between the clinical classification and types of infection ( $P=0.650$ ) or gender ( $P=0.060$ ), but more men than women presented with severe dengue (63% vs. 37%, respectively). However, age and lineage appeared to be correlated with the clinical classification. The relative frequency of severe dengue cases was significantly higher in patients aged  $\leq 15$  years than older patients ( $P=0.025$ ). There were significantly more cases of severe dengue than dengue cases with lineage II than lineage I ( $P=0.006$ ). Thus, after the emergence of lineage II, 69% of the cases were classified as severe dengue, when compared to the lineage I only 31% of the cases were serious. Furthermore,

TABLE I. Comparisons of Different Categorical Variables in Relation to Dengue Disease Severity

Categorical variables	Severe dengue (%)	Dengue (%)	P-value
Age			
$\leq 15$ years	11/31 (35)	7/54 (13)	<b>0.025</b>
$\geq 16$ years	20/31 (65)	47/54 (87)	
Gender			0.060
Female	13/35 (37)	39/67 (58)	
Male	22/35 (63)	28/67 (42)	
Lineage			<b>0.006</b>
I	11/35 (31)	41/67 (61)	
II	24/35 (69)	26/67 (39)	
Types of infection			0.650
Primary	09/35 (26)	21/67 (31)	
Secondary	26/35 (74)	46/67 (69)	

coincidentally or not the younger population were more affected during lineage II circulation.

### Correlation Between RNA Viremia Level of DENV-2 Lineages I and II and Patient Characteristics

The analysis of the viremia level for studied subgroups is shown in Table II. In general, the viremia level was two orders of magnitude higher in sera from 2007 to 2011 (lineage II) than from 1990 to 2002 (lineage I). Notably, the mean serum titres of DENV-2 in patients, clinically classified as severe dengue cases from either period, were higher than those classified as dengue cases, but only severe cases of lineage II were statistically significant ( $P=0.006$ ). Age and lineage II were statistically significant ( $P=0.009$ ). There were no significant differences between the age subgroups when analyzed cumulatively for both periods (i.e., 1990–2011;  $P=0.680$ ). No significant relationship was observed between the viremia level and gender (lineage I;  $P=0.308$  and

TABLE II. Correlation of Viremia Level in Dengue Virus-Type 2 Lineages With Clinical Classification, Types of Infection, Gender, and Age

Categorical variables	1990–2002 (Lineage I)		2007–2011 (Lineage II)	
	Viral load (RNA/mL)	P-Value	Viral load (RNA/mL)	P-Value
Age				
$\leq 15$ years	$1,74 \times 10^5$	0.072	$9,68 \times 10^7$	<b>0.009</b>
$\geq 16$ years	$1,62 \times 10^4$		$1,17 \times 10^5$	
Gender		0.308		0.765
Female	$7,13 \times 10^4$		$1,04 \times 10^6$	
Male	$1,44 \times 10^4$		$1,23 \times 10^7$	
Clinical classification		0.893		<b>0.006</b>
Severe dengue	$5,27 \times 10^4$		$1,42 \times 10^7$	
Dengue	$4,44 \times 10^3$		$5,21 \times 10^5$	
Types of infection		0.060		0.218
Primary	$1,61 \times 10^3$		$9,36 \times 10^5$	
Secondary	$6,78 \times 10^4$		$9,27 \times 10^6$	

lineage II;  $P = 0.765$ ) and types of infection (lineage I;  $P = 0.060$  and lineage II;  $P = 0.218$ ) using sera from both periods.

### Phylogenetic Analysis

In order to confirm no co-circulation of the two lineages during the periods studied, 44 DENV-2 isolates from period encompassing the three DENV-2 epidemics (early, mid, and late) were randomly selected for sequencing the E gene. According to the sequencing results, there was no concomitant circulation of the two lineages. Lineage I alone was identified in the 1990–2002 samples, whereas samples from 2007 to 2011 had lineage II exclusively (Fig. 1). Samples from 2003 to 2006 and after 2011 were not included because there was no DENV-2 activity in Rio de Janeiro during these periods.

### DISCUSSION

After 7 years without detectable activity, DENV-2 re-emerged in April 2007 in Rio de Janeiro causing one of the most severe dengue epidemics already reported in the State in 2008 [SVS, 2008; Macedo et al., 2013]. According to the phylogenetic analysis of the DENV-2 strains from the entire study period (i.e., 1990–2011), which encompass the introduction and the two re-emergences, the DENV-2 isolates in Rio de Janeiro from 2007 onwards were genetically distinct from those found earlier despite belonging to the same genotype (American/Asian); these viruses were grouped as lineage II.

Several investigators have sought to identify clinical-epidemiological and laboratory predictor patterns for dengue severity by examining correlations with viremia levels [Vaughn et al., 2000; Thomas et al., 2008]. An increase in dengue severity has been associated with DENV-2 and DENV-3 serotypes [Rico-Hesse, 2003]. In this study, results suggest that lineage was an important factor for disease severity because higher viremia levels and severe dengue were more frequent observed in patients infected by DENV-2 lineage II than by lineage I, both belong to American/Asian genotype.

The observed disappearance of lineage I viruses and temporal replacement by lineage II viruses after 2007, which was associated with a higher RNA viremia level and a greater disease severity during the 2008 epidemic, supports the hypotheses that viruses replicating more efficiently can out-compete and displace those that have lower epidemiological impact [Rico-Hesse et al., 1997; Rico-Hesse, 2003; Vu et al., 2010; OhAinle et al., 2011].

The association of viremia levels with the immune status and their relationship with disease progression remain contradictory. A secondary infection with DENV-2, which was characterized by a greater disease severity and high viremia level, was reported in patients who were previously infected with DENV-1 or DENV-3 [Alvarez et al., 2006]. The

sequence of introduction and re-emergences of dengue viruses in Rio de Janeiro was as follows: DENV-1 in 1986, DENV-2 in 1990, DENV-3 in 2001, DENV-2 in 2007, DENV-1 in 2010, and DENV-4 in 2011. Severe cases and deaths began to be reported during the first epidemic of DENV-2 in 1990, this number increased during DENV-3 epidemic in 2002; however, during DENV-2 epidemic in 2008 there was an increase of twofold higher in the case fatality rate for dengue in the state, coincidentally during the circulation of lineage II. According to our results, independent of the period of lineage circulation, secondary infection was not correlated with disease severity. There were no significant association between higher viremia levels and disease due to immune status in patients previously infected with DENV-1 and/or DENV-3, which circulated widely in Rio de Janeiro in 1986–1997 and 2001–2006, respectively, before the introduction and re-emergence of DENV-2 in 1990 and 2008 [Nogueira et al., 2007; Teixeira et al., 2009; SVS, 2012; Macedo et al., 2013].

In contrast with what is observed in other endemic regions of the world, in Brazil since its introduction, dengue was predominant among individuals >15 years; from 2007 to 2009, there was an age shift in which the disease affected mainly children aged ≤15 years. During 2008 epidemic, the state of Rio de Janeiro was responsible for 37% of reported dengue cases in Brazil [Ramos and Machado, 2014], from these, 50% of dengue cases and 86% of deaths occurred in individuals ≤15 years [Teixeira et al., 2009]. Furthermore, there was also a sevenfold increase in the number of hospitalizations of children under 1 year of age, shifting from 8% of the total number of cases per 100,000 inhabitants in 2002 during DENV-3 epidemic to 57% in 2008. This epidemiological profile changed in 2010 during the huge DENV-1 epidemic (more than one million cases) with a shift of the disease to age group >60 years. During DENV-1 epidemic the state of Rio de Janeiro, epicentre of 2002 (DENV-3) and 2008 (DENV-2) epidemics responded for only 2.9% of the dengue cases in the country.

In our casuistic besides the significant association with disease severity, higher RNA viremia levels was observed in ≤15 years group during lineage II circulation suggesting that age was an important factor for the peak of viremia. The association of an emergent lineage of DENV-2 with higher viremia was also described in paediatrics inpatients from Viet Nam [Vu et al., 2010].

Physiological, immunological, and behavioral conditions can contribute to a substantially higher rate of mortality. Furthermore, gender is one of the risk factors that have been associated with severe dengue and dengue deaths. In Brazil, the distribution of dengue cases by sex is proportional but with a slight increase for women, in a study conducted from 2002 to 2010, women represented 55% of dengue cases in the

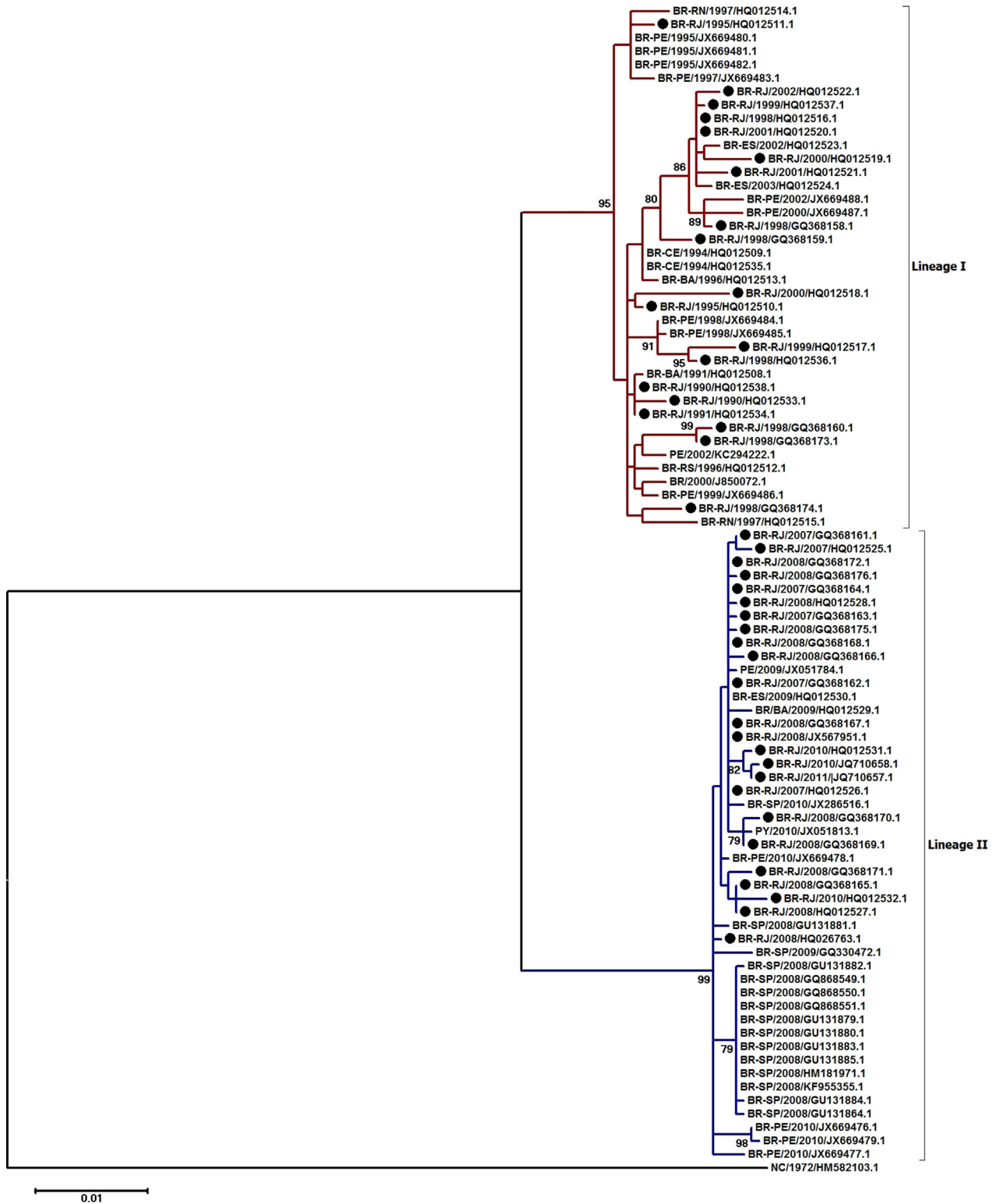


Fig. 1. Phylogenetic relation of DENV-2 isolates spanning the three DENV-2 epidemics and the two lineages 1990–2002 (Lineage I) and 2007–2011 (Lineage II). The sequenced strains representing the periods of our study are marked with black dots.

country [Siqueira et al., 2010]. In our study, the population was homogeneous for gender (52% women and 50% men), but 37% of women and 63% of men were classified as having severe dengue. Although the rate of severe dengue in men has been higher than that in women, disease severity was not significantly associated with gender in this study, which corroborates with previous observations [Wang et al., 2003].

There were no observed associations between disease severity and immune status, age, or gender during the lineage I period and the occurrence of higher viremia levels during the lineage II period reinforces the hypothesis that strains with higher virulence are an important factor for disease severity [Simmons et al., 2007; Romano et al., 2010], as observed during the 2008 epidemic.

In Brazil, the circulation and evolution of DENV-2 lineages were previously reported [Halstead et al., 1970; Drumond et al., 2013]; however, this was the first report in which the epidemiological impact of these lineages are described in the Brazilian population. According to our data, the ability of a lineage II to replicate at higher titres and the high susceptibility to DENV-2 in the individuals  $\leq 15$  years may have been key factors for the disease dynamics in the 2008 epidemic.

The hyperendemicity of dengue with co-circulation of multiple DENV serotypes, emergence or re-emergence of new serotypes, virulent genotypes or lineages, constant replenishment of susceptible individuals due to birth cohort, and high density of *Aedes aegypti* are a constellation of factors contributing to the serious dengue scenario observed in the last 10 years in Brazil. Until a vaccine is available, the only strategy to prevent the worsening situation is to improve measures of vector control and medical assistance to the population.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Pedro Hernan Cabello and Dr. Filipe Anibal Costa-Carvalho for their supervision during statistical analysis.

## REFERENCES

- Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez S, Morier L, Gonzalez D, Castro O, Kouri G, Halstead SB, Guzman MG. 2006. Dengue hemorrhagic fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* 75:1113-1117.
- Azevedo AS, Yamamura AM, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, Galler R, Alves AM. 2011. *PLoS ONE* 6:e20528.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496:504-507.
- de Oliveira Poersch C, Pavoni DP, Queiroz MH, de Borba L, Goldenberg S, dos Santos CN, Krieger MA. 2005. Dengue virus infections: Comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J Clin Virol* 32:272-277.
- Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, de Morais Bronzoni RV, Bosch I, Nogueira ML. 2013. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: Dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS ONE* 8: e.59422.
- Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simões JB, Nogueira FeB, da Rocha Queiroz Lima M, dos Santos FB. 2013. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: Molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2095.
- Gibson G, Souza-Santos R, Brasil P, Pacheco AG, Cruz OG, Honório NA, Kubelka C, Carvalho MS. 2013. From primary care to hospitalization: Clinical warning signs of severe dengue fever in children and adolescents during an outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica* 29:82-90.
- Halstead SB, Udomsakdi S, Simasthien P, Singharaj P, Sukhavanachana P, Nisalak A. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. *Yale J Biol Med* 42:261-275.
- Lancioti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:545-551.
- Macedo GA, de Araújo JM, Schatzmayr HG, Costa FA, de Filippis AM, Santos FB, Nogueira RM. 2013. Virological surveillance for early warning of dengue epidemics in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107:141-146.
- Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES, Vorndam V. 1999. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol* 14:183-189.
- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica* 22:358-363.
- OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborio S, Nuñez A, Lennon NJ, Birren BW, Gordon A, Henn MR, Harris E. 2011. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med* 3:114-128.
- Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC, Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, Schatzmayr HG, Tanuri A, Ribeiro Nogueira RM. 2010. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis* 16:576-578.
- Ramos R, Machado C. 2014. Uma análise espaço-temporal dos grupos de pesquisa do CNPQ: a dengue no Brasil. *Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde (Uberlândia)* 10:58.
- Rico-Hesse R. 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59:315-341.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230:244-251.
- Romano CM, de Matos AM, Araújo ES, Villas-Boas LS, da Silva WC, Oliveira OM, Carvalho KI, de Souza AC, Rodrigues CL, Levi JE, Kallas EG, Pannuti CS. 2010. Characterization of Dengue virus type 2: New insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS ONE* 5:11811.
- Rosen L. 1986. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *S Afr Med J* 70:40-42.
- San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, Guzmán MG. 2010. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 82:128-135.
- SVS (Secretaria de Vigilância Sanitária). 2012. Coordenação Geral do Programa Nacional de Dengue. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02\\_n03\\_dengue\\_brasil\\_si.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02_n03_dengue_brasil_si.pdf)
- SVS (Secretaria de Vigilância Sanitária). 2008. Relatório de casos de dengue. <http://www.saude.rj.gov/Docs/Acoes/dengue/Relatorio.htm>
- Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, Melo PS, Morato VG, Reis EA, Dias JP, Castro JM, Vasconcelos PF, Goddard KA, Barreto ML, Reis MG, Teixeira MG. 2010. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur J Hum Genet* 18:1221-1227.
- Simmons CP, Chau TN, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Thien NT, Lien IB, Quy NT, Hieu NT, Hien TT, McElnea C, Young P, Whitehead S, Hung NT, Farrar J. 2007. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. *J Infect Dis* 196:416-424.

- Siqueira JB, Jr., Vinhal LC, Said RFC, Hoffmann JL, Martins J, Barbiratto SB, Coelho GE. 2010. Chapter 7. Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. In: Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde. Série G. Estatística e Informação em Saúde. ISBN 978-85-334-1851-6. Brasília: Ministério da Saúde, 372 p. Available: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_brasil\\_2010.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2010.pdf)
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Teixeira MG, Costa MaC, Barreto F, Barreto ML. 2009. Dengue: Twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 25:S7–18.
- Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, Najioullah F, Plumelle Y, Fonteau C, Dussart P, Césaire R. 2008. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 78:990–998.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181:2–9.
- Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, Churcher C, Parkhill J, Cardoso J, Farrar J, Wills B, Lennon NJ, Birren BW, Buchy P, Henn MR, Simmons CP. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: In vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS Negl Trop Dis* 2010 Jul 20 4:e57 2010.
- Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, Lin SC, Ho ST, Huang JH, King CC. 2003. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: Implications for pathogenesis. *Virology* 305:330–338.
- WHO(World Health Organization) 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: pp 3–17.

## Case Report

# Fatal case of co-infection with dengue virus and *Neisseria meningitidis* during a dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil

Ivano de Filippis,<sup>1</sup> Priscila Conrado Guerra Nunes,<sup>2</sup>  
 Claudia Ferreira de Andrade,<sup>1</sup> Bianca de Santis Gonçalves,<sup>2</sup>  
 Eliane Saraiva de Araújo,<sup>2</sup> Itacirema de Oliveira Bezerra,<sup>3</sup>  
 Ivan Rocha Ferreira da Silva,<sup>4</sup> Rita Maria Nogueira<sup>2</sup> and  
 Ana Maria Bispo de Filippis<sup>2</sup>

## Correspondence

Ivano de Filippis  
 ivano.defilippis@incqs.fiocruz.br

<sup>1</sup>National Institute for Quality Control of Health - INCQS, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institution, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>State Secretary of Health, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup>Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

**Introduction:** Dengue and meningococcal disease are caused by two different agents: a flavivirus and a Gram-negative bacterium, respectively. The first symptoms of both diseases can be indistinct and a rapid and accurate diagnosis is crucial, considering that both diseases are associated with high morbidity and mortality, representing a major public-health problem in Brazil.

**Case presentation:** We report a fatal case of co-infection of dengue virus (DENV) and *Neisseria meningitidis* in a 54-year-old patient. The serum tested positive for DENV NS1 antigen, and *N. meningitidis* serogroup C was detected by *nspA*-PCR. Following the initial positive result for DENV infection, rRT-PCR was performed and DENV-4 was confirmed.

**Conclusion:** Our report highlights the importance of accurate differential diagnosis during periods of high circulation of DENV, in order to provide adequate management and an improved outcome.

**Keywords:** Dengue; meningococcal disease; diagnostic; PCR; RT-PCR.

Received 4 March 2016

Accepted 21 June 2016

## Introduction

Despite being aetiologically distinct diseases, both dengue, caused by one of four serotypes of dengue virus (DENV), and meningococcal meningitis, caused by the Gram-negative bacterium *Neisseria meningitidis*, can initially present with similar clinical symptoms, such as high fever, dizziness (potentially evolving to central nervous system injuries), petechial rash or an occasionally fatal shock syndrome (Coureuil *et al.*, 2013; Stephens *et al.*, 2007).

Dengue is hyperendemic in Brazil, with outbreaks occurring almost yearly. The co-circulation of all four DENV serotypes in all Brazilian states has increased the incidence of severe cases, hospitalizations and death secondary to dengue infection (Siqueira *et al.*, 2005). Since the first reports of dengue in the 1980s, more than 10 million cases have been diagnosed (Brasil Ministério da Saúde SVS/MS, 2016).

During 2012, 565 510 cases of dengue infection were reported in Brazil, including 4055 cases of severe dengue infection and 284 related deaths (Brasil Ministério da Saúde SVS/MS, 2016; van Panhuis *et al.*, 2014; Zambrano & San Martin, 2014; Pan American Health Organization (PAHO) 2016, PAHO/World Health Organization programme – dengue, [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=1&Itemid=40734](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734), accessed on 25 May 2016). In the state of Rio de Janeiro, a total of 181 169 cases with 43 deaths were reported in 2012. In the same year, a total of 2083 cases of meningococcal disease were notified, with 440 deaths in Brazil. At the same time in Rio de Janeiro, a total of 390 cases of meningococcal disease with 96 deaths were reported (SVS/SES-RJ, 2016).

Unlike dengue, almost all pathogenic *N. meningitidis* serogroups are preventable by immunization; however, meningococcal disease is still endemic in our country, being the leading cause of bacterial meningitis in Brazil. The incidence of meningococcal disease in Brazil ranges from 1–1.5

Abbreviation: DENV, dengue virus.



cases per 100 000 inhabitants, with a reported case-fatality rate over the past 10 years of about 11 % when presenting as meningitis, 16 % as meningitis with septicaemia, rising to 38 % in septicaemia, with an overall case-fatality rate of 20 % (Brasil Ministério da Saúde SVS/MS, 2015). The clinical forms of meningitis, meningitis with septicaemia and septicaemia alone accounted for 39.2, 33 and 27.8 %, respectively, of the confirmed cases of meningococcal disease in Brazil during this period of time. (Gorla *et al.*, 2011). Meningococcal disease is frequently observed in epidemic waves or in local outbreaks, which might be influenced by virulent strains, crowded locations with poor ventilation, climate and lower socioeconomic status. Some authors have previously described bacterial co-infection during the course of a viral infection with DENV (Srirangaraj *et al.*, 2014; Pérez Rodríguez *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2013; Nagassar *et al.*, 2012); however, this is, to the best of our knowledge, the first report of a fatal case of co-infection of DENV and *N. meningitidis*.

Patients presenting with DENV or with *N. meningitidis* infection might experience similar symptoms, including high fever, prostration, joint pain, neck stiffness and petechial rash. With regards to the potentially overlapping signs and symptoms, rapid accurate diagnosis is vital, to aid proper management and improve the outcome.

## Case report

During a dengue outbreak in 2013 in the state of Rio de Janeiro, a 54-year-old gentleman presented to an urgent care facility with fever and dyspnoea. Initially, the diagnosis of community acquired pneumonia was made and the patient was discharged home with a prescription for a 10 day course of oral amoxicillin with clavulanic acid, 500 mg every 8 h. Three days later, he was readmitted with severe headache, fever and confusion, with peripheral cyanosis and a petechial rash. On laboratory testing, the patient was found to be thrombocytopenic and had acute renal failure, requiring urgent haemodialysis. Due to the presenting clinical picture, blood samples were collected to test for dengue and meningococcal infection. Blood cultures were negative for *N. meningitidis*. A lumbar puncture with cerebral spinal fluid analysis disclosed an opening pressure of 30 cm H<sub>2</sub>O, a cell count of 750 white blood cells per field (90 % neutrophils), protein levels of 102 mg dl<sup>-1</sup> and glucose levels of 45 mg dl<sup>-1</sup>. Cerebral spinal fluid cultures were not performed by the admitting hospital. The patient was immediately started on ceftriaxone, 2 g intravenously every 12 h. The results of NS1 antigen testing and RT-qPCR for dengue (Lanciotti *et al.*, 1992) were positive for DENV-4 and anti-dengue IgM was negative. A *nspA*-PCR assay (de Filippis *et al.*, 2005) performed to detect meningococcal disease confirmed *N. meningitidis* infection, and serogroup C was determined by *siada*-PCR (Tzanakaki *et al.*, 2003). The amplified *nspA* DNA fragment was sequenced in both directions and confirmed as the *nspA* gene. The DNA sequence was submitted to GenBank under accession number KP721282. Unfortunately, after 5 days in a critical care unit,

the patient developed multi-system organ failure and died. The medical team in charge reported meningococcal disease as the cause of death on his death certificate.

## Discussion

The natural habitat of *N. meningitidis* is the human nasopharynx, where it can live as a commensal in about 10 % of the population for a few months without causing invasive disease. These individuals are called asymptomatic carriers. For unknown reasons, 5–10 % of the carriers might develop invasive disease with devastating consequences, such as meningitis, sepsis (meningococemia) and acute adrenal failure (Waterhouse–Friederiksen's syndrome) (Gasparini *et al.*, 2012; Varon *et al.*, 1998). Meningococcal disease is a vaccine-preventable disease for 4 of the 5 most common serogroups (A, C, W135, Y). At the time of the reported case, there was no vaccine available against serogroup B meningococci. In the beginning of 2015, a four-component protein vaccine against serogroup B was introduced in immunization calendars in Europe and the USA. In the same year, the vaccine was also approved in Brazil for use in private vaccination clinics. The world's first dengue vaccine was released in 2015 and was approved for use in Brazil in January 2016, but it is not yet listed in the national immunization calendar. Dengue disease has no specific antiviral treatment currently available.

It is known that dengue affects the immune system, predisposing patients to other infections. It is possible that the patient was initially an asymptomatic carrier of the bacterium, who afterwards acquired DENV infection, and the resulting low immunity caused by dengue led to meningococcal invasive disease. Conversely, the most important human defence against bacterial infection is the immune system, so it is also possible that the patient was acutely exposed to *N. meningitidis* while his immune defences were compromised by an acute DENV infection.

Supportive care is basically the only therapy against dengue. Management of severe dengue requires careful attention to fluid management and diligent treatment of haemorrhages. In addition, meningococcal disease is a preventable infection, and early administration of appropriate antibiotics can result in a successful outcome. There are several diseases that can present with strikingly similar symptoms, such as dengue, yellow fever, leptospirosis and meningococcal meningitis, among others. Therefore, it is crucial that even during periods of high circulation of dengue, cases with atypical clinical presentations, particularly the ones with neurological involvement, are further investigated for a potential co-infection with other agents. Different therapies are currently recommended for these diseases, and prompt medical attention with rapid and accurate diagnosis is imperative, as it might significantly impact the final outcome.

## References

Brasil, Ministério da Saúde. SVS/MS (2015). Perfil Epidemiológico da Meningite Brasil & Mundo. <http://www.saude.rs.gov.br/upload/>

1437759444\_Perfil%20Epidemiol%C3%B3gico%20da%20Meningite%20Brasil%20&%20Mundo.pdf. Accessed on 25 May 2016.

**Brasil Ministério da Saúde SVS/MS (2016).** Informe epidemiológico da dengue – casos de dengue no Brasil, 1990 a 2014. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Dengue-at-2014.pdf>. Accessed on 19 May 2016.

**Coureuil, M., Join-Lambert, O., Lécuyer, H., Bourdoulous, S., Marullo, S. & Nassif, X. (2013).** Pathogenesis of meningococemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a012393.

**de Filippis, I., do Nascimento, C. R., Clementino, M. B., Sereno, A. B., Rebelo, C., Souza, N. N. & Riley, L. W. (2005).** Rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid by one-step polymerase chain reaction of the *nspA* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51, 85–90.

**Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P. L. & Panatto, D. (2012).** *Neisseria meningitidis*, pathogenetic mechanisms to overcome the human immune defences. *J Prev Med Hyg* 53, 50–55.

**Gorla, M. C., de Paiva, M. V., Salgueiro, V. C., Lemos, A. P., Brandão, A. P., Vázquez, J. A. & Brandileone, M. C. (2011).** Antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated from meningitis cases in Brazil from 2006 to 2008. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29, 85–89.

**Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J. & Vorndam, A. V. (1992).** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30, 545–551.

**Nagassar, R. P., Bridgelal-Nagassar, R. J., McMorris, N. & Roye-Green, K. J. (2012).** *Staphylococcus aureus* pneumonia and dengue virus co-infection and review of implications of coinfection. *BMJ Case Rep* 2012, bcr0220125804.

**Pérez Rodríguez, N. M., Galloway, R., Blau, D. M., Traxler, R., Bhatnagar, J., Zaki, S. R., Rivera, A., Torres, J. V., Noyd, D. & other**

**authors (2014).** Case series of fatal *Leptospira* spp./dengue virus co-infections-Puerto Rico, 2010-2012. *Am J Trop Med Hyg* 91, 760–765.

**Siqueira, J. B., Jr., Martelli, C. M., Coelho, G. E., Simplicio, A. C. & Hatch, D. L. (2005).** Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* 11, 48–53.

**Srirangaraj, S., Kali, A. & Vijayan, S. (2014).** Dengue co-infection in a blood stream infection caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a case report. *Australas Med J* 7, 441–444.

**Stephens, D. S., Greenwood, B. & Brandtzaeg, P. (2007).** Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 369, 2196–2210.

**SVS/SES-RJ (2016).** Boletim Epidemiológico 004/2016. Governo do Estado do Rio de Janeiro. <http://riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=DmjDDb%2BR24E%3D>. Accessed on 25 May 2016.

**Tsai, J. J., Hsieh, M. H., Liu, L. T., Hsiao, H. M. & Perng, G. C. (2013).** Mortality from septic shock in a dengue infected patient: a case report. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 44, 623–629.

**Tzanakaki, G., Tsolia, M., Vlachou, V., Theodoridou, M., Pangalis, A., Foustoukou, M., Karpathios, T., Blackwell, C. C. & Kremastinou, J. (2003).** Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immunol Med Microbiol* 39, 31–36.

**van Panhuis, W. G., Hyun, S., Blaney, K., Marques, E. T. A. Jr., Coelho, G. E., Siqueira, J. B., Tibshirani, R., da Silva, J. B. Jr. & Rosenfeld, R. (2014).** Risk of dengue for tourists and teams during the World Cup 2014 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3063.

**Varon, J., Chen, K. & Sternbach, G. L. (1998).** Rupert Waterhouse and Carl Friderichsen: adrenal apoplexy. *J Emerg Med* 16, 643–647.

**Zambrano, B. & San Martín, J. L. (2014).** Epidemiology of dengue in Latin America. *J Pediatric Infect Dis Soc* 3, 181–182.

Zika viruses by PCR. These results were confirmed by the Shanghai Center for Disease Control and Prevention and the China Center for Disease Control and Prevention. Yellow fever virus RNA remained detectable 9 days after symptom onset in serum and for an additional 3 days in urine and feces.

A person from China traveling to a yellow fever–endemic area would usually receive vaccination against yellow fever (4). Persons such as our patient, who cannot or should not receive vaccination for yellow fever, should be monitored closely. As of April 2, 2016, a total of 9 imported cases of yellow fever were reported in China: 4 cases in Fujian Province, 4 cases in Beijing, and 1 case in Shanghai. All 9 cases occurred in travelers returning to China from Angola; no local cases have been reported.

The mosquito density is low in Shanghai, and the temperature typically is low in March, suggesting that the imported case we describe will probably not result in mosquito-borne transmission. However, in the upcoming summer, the risk for onward transmission of travel-associated yellow fever in China will warrant increased vigilance. To help prevent the importation and potential spread of yellow fever in China, the Chinese government now requests proof of vaccination for yellow fever from persons traveling to China from Angola.

#### Acknowledgments

We thank our patient and his family for their cooperation.

#### References

1. Garske T, Van Kerkhove MD, Yactayo S, Ronveaux O, Lewis RF, Staples JE, et al. Yellow fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med.* 2014;11:e1001638. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001638>
2. National Health and Family Planning Commission of China. China confirms an imported yellow fever case [in Chinese] [cited 2016 Mar 18]. <http://www.nhfpc.gov.cn/yjb/s7860/201603/67202ceff58b44e3ba63db1e2bbfc1ab.shtml>
3. World Health Organization. Yellow fever—Angola [cited 2016 Mar 18]. <http://who.int/csr/don/12-february-2016-yellow-fever-angola/en>
4. Centers for Disease Control and Prevention. Yellow fever vaccine recommendations [cited 2016 Mar 18]. <http://www.cdc.gov/yellowfever/vaccine>

Address for correspondence: Hongzhou Lu, Department of Infectious Diseases, Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, No. 2901 Caolang Rd, 201508 Shanghai, China; email [luhongzhou@fudan.edu.cn](mailto:luhongzhou@fudan.edu.cn)

## Clinical Manifestations of Zika Virus Infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015

**José Cerbino-Neto, Emersom Cicilini Mesquita, Thiago Moreno L. Souza, Viviane Parreira, Bernardo Bastos Wittlin, Betina Durovni, Maria Cristina Ferreira Lemos, Alexandre Vizzoni, Ana Maria Bispo de Filippis, Simone Alves Sampaio, Bianca de Santis Gonçalves, Fernando A. Bozza**

Author affiliations: Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (J. Cerbino-Neto, E.C. Mesquita, T.M.L. Souza, V. Parreira, A. Vizzoni, A.M. Bispo de Filippis, S.A. Sampaio, B. de Santis Gonçalves, F.A. Bozza); Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (B.B. Wittlin, B. Durovni, M.C.F. Lemos)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.160375>

**To the Editor:** Zika virus infection, which has been associated with microcephaly and other neurologic disorders, has reached the level of public health emergency of international concern (1). Zika virus (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) is transmitted by mosquitos of the genus *Aedes* (2). The virus was first isolated from a serum specimen from a rhesus monkey in the Zika Forest of Uganda in 1947 (3). After 2007, a rapid geographic expansion of the virus was observed, including outbreaks in the Pacific region (4) and, more recently, in South America. Brazil reported the first autochthonous case of Zika virus disease in April 2015 (5), and subsequently, increasing numbers of cases have been reported, especially in northeastern Brazil (6).

Studies on the natural history of Zika virus infection are scarce. Previous research defined Zika virus infection as a dengue-like illness, typically characterized by fever, maculopapular rash, arthralgia, and conjunctivitis (4). Although some patients have all of these symptoms during early onset, fever is not an early symptom for all. Here we describe the frequency of signs and symptoms from a sample of clinic patients in Rio de Janeiro, Brazil, who were later confirmed to have Zika virus disease by using real-time reverse transcription PCR (rRT-PCR).

We retrospectively collected clinical data on a convenience sample of 57 patients found to be Zika virus–positive by rRT-PCR who had medical attention at the 24-hour acute care clinic of Manguinhos in Rio de Janeiro during April 28–June 8, 2015. Data were collected from electronic medical records and surveillance reports. Data were anonymized and included age, sex, and signs and symptoms documented on the first clinic visit of patients who reported acute rash, dengue-like illness, or both. Fever

was documented either through direct measurement in the clinic or by patient self-report. Pregnancy status was not assessed. We collected blood samples for serum sample testing during each patient's initial visit to the clinic and tested for Zika virus using rRT-PCR as described by Lanciotti et al. (7); all samples were collected within 7 days of illness onset. Patients were not tested for dengue or chikungunya viruses. We did not measure the duration of any sign or symptom.

Of the 57 Zika virus disease case-patients, median age was 34 years; 63% were women (Table). The most common sign or symptom was exanthema (98%), followed by headache (67%), fever (67%), arthralgias (58%), myalgias (49%), and joint swelling (23%) (Table). Conjunctivitis was observed in 39% case-patients and retro-orbital eye pain was reported by 40%. Among 30 patients who had fever assessed by clinic staff, median temperature was 38°C (range 37.5°C–38.5°C). One patient had no rash or joint swelling but did have all other symptoms. One patient's sole symptom was rash. No patients were referred for hospitalization.

Our clinic-based study of 57 rRT-PCR–confirmed cases of Zika virus disease found rash to be the most common symptom for which patients sought care (98%); fever, generally low-grade, was reported or observed in 67%. Because our study design was retrospective in nature, wherein we reviewed records for selected patients in whom Zika was subsequently found to be laboratory-confirmed by using rRT-PCR, we may have introduced selection bias to our sample, limiting the generalizability and comparability of our results. For example, clinic staff may have seen patients with mild symptoms but decided not to test for the virus, leading to a bias toward testing patients with more severe rash. It is also possible, considering the retrospective nature of our data collection, that some data points were not accurately recorded and could not be validated. Despite these limitations, our data suggest the term “Zika fever” is not a

helpful substitute term for Zika virus disease. Furthermore, referring to the illness caused by this virus as “Zika fever” (8) may be misleading and should probably be avoided until further more systematic studies clarify the frequency of fever as a symptom.

Although patient sampling and laboratory testing methods are not directly comparable to our study, a 2015–2016 assessment in Puerto Rico detected Zika virus in 30 of 155 case-patients in whom Zika virus disease was suspected. In that study, laboratory-confirmed disease was defined as detection of Zika virus RNA by using rRT-PCR or IgM by using ELISA. Among the 30 confirmed cases, the most frequently reported signs and symptoms were rash (77%), myalgia (77%), arthralgia (73%), and fever (73%) (9). The February 12, 2015, interim case definition published by the World Health Organization describes a suspected case-patient as a person with rash, fever, or both, in addition to 1 of 3 other listed symptoms (10). Like the Puerto Rico report, our report supports the established World Health Organization case definition indicating that the presence of rash, fever, or both should be emphasized as primary characteristics of Zika virus disease.

Dr. Cerbino-Neto is an infectious diseases specialist and epidemiologist, a researcher at Oswaldo Cruz Foundation in Brazil, and Deputy Director of Clinical Care at the National Institute of Infectious Diseases. His primary research interests are immunization, health surveillance systems, and emerging infectious diseases.

## References

1. World Health Organization. Zika situation report. 2016 March 31 [cited 2016 Apr 1]. <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/31-march-2016/en/>
2. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mbouï Ondo S, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)—2007: a new threat from *Aedes albopictus*? Charrel R, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2681. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>
3. Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46:509–20. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
4. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;360:2536–43. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
5. Zanluca C, de Melo VCA, Mosimann ALP, dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:569–72. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150192>
6. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:1885–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2110.150847>
7. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1232–9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080287>

**Table.** Characteristics of Zika virus disease patients seeking care in an acute care clinic, Rio de Janeiro, Brazil, April 28–June 8, 2015

Characteristic	Value*
Cohort, no. patients	57
Age, y	34 (25–40)
Female sex	36 (63)
Symptoms	
Exanthema	56 (98)
Fever†	38 (67)
Days from symptom onset to exanthema	1 (0–2)
Arthralgia	33 (58)
Itching	32 (56)
Headache	38 (67)
Myalgia	28 (49)
Retro-orbital pain	23 (40)
Conjunctivitis	22 (39)
Joint swelling	13 (23)

\*Median (interquartile range) or no. (%) case-patients.

†Measured in medical office (n = 30) or self-reported (n = 8).

8. Martínez de Salazar P, Suy A, Sánchez-Montalvá A, Rodó C, Salvador F, Molina I. Zika fever. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. In press 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.016>
9. Thomas DL, Sharp TM, Torres J, Armstrong PA, Munoz-Jordan J, Ryff KR, et al. Local transmission of Zika virus—Puerto Rico, November 23, 2015–January 28, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65:154–8. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6506e2>
10. World Health Organization. Zika virus disease. 2015 Feb 12 [cited 2016 Mar 10]. <http://www.who.int/csr/disease/zika/case-definition/en/>

Address for correspondence: José Cerbino-Neto, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) Fiocruz, Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21045-900; email: [cerbino@fiocruz.br](mailto:cerbino@fiocruz.br)

## Zika Virus–Related News Coverage and Online Behavior, United States, Guatemala, and Brazil

Brian G. Southwell, Suzanne Dolina, Karla Jimenez-Magdaleno, Linda B. Squiers, Bridget J. Kelly

Author affiliation: RTI International, Research Triangle Park, North Carolina, USA

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.160415>

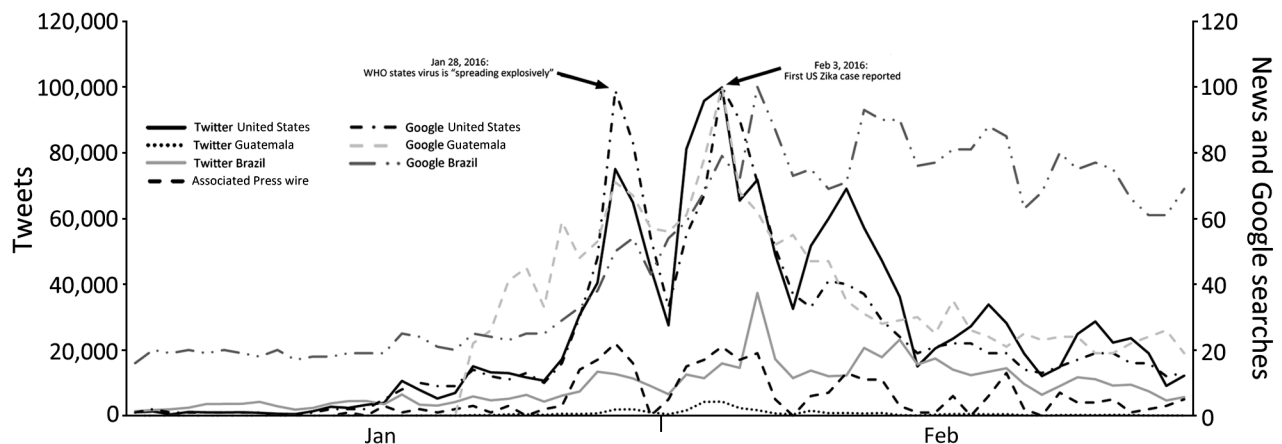
**To the Editor:** News coverage of emerging infectious diseases tends to be episodic and ephemeral rather than thematic, comprehensive, and consistent over time, in part because of newsroom constraints (1–3). Public health authority announcements may help drive peaks in coverage and warrant attention, in particular given the importance

of trust and credibility for information acceptance (4,5). Moreover, online search behavior and social media interaction tend to respond to news coverage, especially for novel health issues (6,7).

The nature of Zika virus transmission as a novel phenomenon not completely understood by researchers could encourage anxiety and fear among the public (8,9). Patterns of social interaction and search behavior regarding Zika virus can point to opportunities and constraints for education efforts.

To assess relationships between news coverage, social media mentions, and online search behavior regarding Zika virus, we studied data available for January 1–February 29, 2016. Although news outlets occasionally covered Zika virus before 2016, our selected period included prominent announcements. For example, on January 28, the World Health Organization declared that Zika virus was “spreading explosively” (10), and the Centers for Disease Control and Prevention issued a travel alert. On February 3, authorities reported the first case that appeared in the United States.

Across 3 data sources, we searched for mentions of “Zika” or “El Zika.” We used Google Trends (Google Inc., Mountain View, CA, USA) to assess the number of total searches that originated in the United States, Guatemala, or Brazil for these terms, relative to total Google searches for any topic for the same period. We used a scale of 0–100 (as an indicator of relative volume), with 50 representing half the volume as 100 but not a specific absolute number. Zika virus has been detected in >25 countries since 2015; the countries selected were places where transmission has been relatively widespread or where Zika virus had not yet been but was anticipated to be. We used a monitoring tool, Crimson Hexagon (<http://www.crimsonhexagon.com/>), to capture the total number of daily Twitter posts (tweets) and focused on tweets geotagged as originating from the United



**Figure.** Comparison of number of tweets by individual persons, Google searches by individual persons, and Associated Press news stories about Zika virus in the United States, Guatemala, and Brazil, January 1–February 29, 2016.