

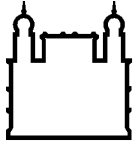
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

**VÍRUS DENGUE TIPO 4 NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO:  
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS,  
CLÍNICOS E VIRAIS DESDE A SUA EMERGÊNCIA À SUA  
ENDEMICIDADE**

MANOELA HERINGER

Rio de Janeiro  
Julho de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

*Manoela Heringer*

### **VÍRUS DENGUE TIPO 4 NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS, CLÍNICOS E VIRAIS DESDE A SUA EMERGÊNCIA À SUA ENDEMICIDADE**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências da Saúde

**Orientador (es):** Prof. Dr<sup>a</sup>. Flávia Barreto dos Santos  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Rita Marla Ribeiro Nogueira

**RIO DE JANEIRO**

Julho de 2017

Heringer, Manoela .

VÍRUS DENGUE TIPO 4 NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO:  
INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS,  
CLÍNICOS E VIRAIS DESDE A SUA EMERGÊNCIA À SUA ENDEMICIDADE /  
Manoela Heringer. - Rio de janeiro, 2017.

147 f.

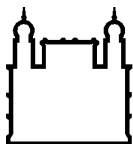
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina  
Tropical, 2017.

Orientadora: Flavia Barreto dos Santos.

Co-orientadora: Rita Maria Ribeiro Nogueira.

Bibliografia: f. 94-124

1. Dengue. 2. Epidemiologia. 3. Diagnóstico. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina tropical

**AUTORA:** MANOELA HERINGER

**VÍRUS DENGUE TIPO 4 NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: ASPECTOS  
EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS, CLÍNICOS E VIRAIS DESDE A SUA  
EMERGÊNCIA À SUA ENDEMICIDADE**

**ORIENTADOR (ES):** Prof. Dra. Flávia Barreto dos Santos  
Prof. Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### EXAMINADORES:

**Prof. Dr.** Filipe Anibal Carvalho Costa - **Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

**Prof. Dr.** Silvia Maria Baeta Cavalcanti (Universidade Federal Fluminense)

**Prof. Dr.** Josélio Maria G. de Araújo (Universidade Federal do Rio Grande do Norte)

**Prof. Dr.** Patrícia Brasil (Instituto Nacional de Infectologia/FIOCRUZ)

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

Rio de Janeiro, 31 de julho de 2017

**Trabalho realizado nos Laboratórios de Flavivírus e de Imunologia Viral do Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Fundação Oswaldo Cruz sob a orientação das Dra. Flávia Barreto dos Santos e Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira, com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

**Dedico este trabalho**  
**Aos meus pais Jeter e Ismalene,**  
**À minha irmã Monica,**  
**E à Sofia, minha sobrinha e afilhada.**

*Aos outros dou o direito de ser como  
são, a mim, dou o dever de ser cada dia  
melhor*

**Chico Xavier**

*O êxito da vida não se mede pelo caminho  
que você conquistou, mas sim pelas dificuldades  
que superou no caminho.*

**Abraham Lincoln**

*A alegria está na luta, na tentativa, no  
sofrimento envolvido e não na vitória  
propriamente dita.*

**Mahatma Gandhi**

## **AGRADECIMENTOS**

Passei por diversos momentos, bons e ruins, durante esses 4 anos de doutorado e cada pessoa que passou em minha vida teve um papel importante neste período. Mas, principalmente, naqueles momentos difíceis e que as coisas parecem não dar certo, foi quando percebi o quanto às pessoas que nos cercam são tão valiosas e possuem grande capacidade para nos impulsionar.

Agradeço à Pós-Graduação em Medicina Tropical e aos docentes do Instituto Oswaldo Cruz pela minha formação acadêmica e profissional e por confiar no meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida durante os 4 anos do curso de doutorado.

À Profa. **Dra. Flávia Barreto dos Santos**, minha orientadora, que durante 6 anos foi uma “mãezona” e um grande exemplo de mulher para mim. Foi e é um grande privilégio receber todo seu ensinamento tanto na vida profissional como na vida pessoal. Agradeço por acreditar em mim até quando eu mesma não acreditava, agradeço por toda atenção, carinho, orientação, compreensão e paciência. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Rita Maria Nogueira**, é uma honra tê-la como orientadora deste trabalho, uma grande mulher e um grande nome na virologia e na história da Dengue. Obrigada por me receber em seu laboratório, por todo ensinamento e por confiar em mim e no meu trabalho.

À **Dra. Ana Bispo**, pelo conhecimento compartilhado, por todo o seu apoio e colaboração.



Ao **Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa**, pelos ensinamentos e por todo apoio durante toda minha trajetória na pós-graduação e por aceitar ser o revisor deste trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Josélio Araújo, Profa. Dra. Silvia ....., Profa Dra. Patrícia Brasil Prof. Dr. Eduardo Volotão, Dr. Alex Paulovid e Profa. Dra. Livia Villar, por aceitarem participar da Banca de Defesa desta tese, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo.

À equipe do Laboratório de Flavivirus do Instituto Oswaldo Cruz, por toda ajuda, todo apoio e pela agradável convivência durante o período que pude trabalhar neste laboratório.

Às **Dras Elzinandes Azeredo e Luzia Pinto**, pesquisadoras do Laboratório de Imunologia Viral, por me receberem com paciência e carinho em seu laboratório, por toda atenção e pelos ensinamentos.

À equipe do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Oswaldo Cruz, pela troca de conhecimentos, por toda assistência e amizade. Luciana Santos, Juan, Jéssica, Luciana Gomes, Iury, Márcio, Gabriela, Gabriel e Helver, obrigada!

À **Dra. Monique Lima e à doutoranda Priscila Nunes**, amigas de profissão e de vida. Agradeço por todo apoio, paciência, amor, conselhos, risadas e puxões de orelha e ombro amigo quando preciso.

Às "**filhas da Querida**", Dinair, Fernanda, Márcia, Maria Eduarda, Nieli, Thaís e Thiara, amigas além do laboratório, por todo conhecimento trocado, ajuda nas horas de sufoco, carinho e cumplicidade.

À **Dra Moyra Portilho** e à **Dra Clarissa Cunha**, amigas da faculdade para vida e companheiras nessa trajetória acadêmica na FIOCRUZ, por todos os momentos bem vividos, conselhos e apoio de sempre.

Sou muito grata à minha família, minha vó, tios, tias e primos, pelo amor, alegrias e todo incentivo que sempre recebi.

Agradeço aos meus pais, **Jeter Heringer e Ismalene Lima**, que sempre me motivaram e me mostraram a importância do estudo, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade que puderam, com esforço e amor, me proporcionar. São eles meu motivo para correr atrás dos meus objetivos e poder realiza-los. Agradeço por todo amor e dedicação.

À minha irmã **Monica Heringer**, e também melhor amiga, com quem pude contar em todos os momentos. E junto aos meus pais, me proporcionou a oportunidade e todas as condições para que eu pudesse chegar até aqui. Tenho nela grande exemplo de mulher e profissional. Obrigada!

À minha sobrinha e afilhada **Sofia Heringer**, que chegou na metade deste trabalho me dando mais força para o dia-a-dia, enchendo-me de esperança e renovando minha alegria.

Ao meu cunhado **Afonso Andrade**, meu irmão mais velho, agradeço por todos os conselhos, alegria, cuidado e dedicação comigo e principalmente pela paciência sempre que precisei de apoio e assistência.

A todos meus amigos, àqueles de longa data e também os que conheci a menos tempo, de Paracambi, Vassouras, Rio e espalhados por aí. Agradeço por sempre

estarem presentes, mesmo que distantes, me aconselhando, dando alegria aos meus dias e me ajudando com carinho e dedicação.

Aos meus grandes amigos de vida, **Maristela, Mateus e Luciano**, com os quais sei que posso sempre contar, pelo amor, dedicação e por simplesmente dividirem os momentos da vida comigo.

À todas as meninas com quem morei durante este período no Rio, por estarem presentes e auxiliando no dia-a-dia. Em especial Mariana, Thaina e Juliana, que aturaram minha loucura de final de doutorado.

Agradeço a todas as pessoas, que mesmo sem perceber contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta tese, me encorajando e tornando esta fase mais fácil e encantadora. Estimulando-me intelectualmente e emocionalmente.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE QUADROS .....	XIII
SIGLAS E ABREVIATURAS .....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT .....	XVII
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 BREVE HISTÓRICO.....	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE.....	2
1.2.1 <i>Dengue nas Américas</i> .....	6
1.2.2 <i>Dengue no Brasil</i> .....	9
1.3 O VÍRUS DENGUE.....	12
1.3.1 <i>Replicação do Vírus Dengue</i> .....	15
1.3.2 <i>Diversidade Genética dos DENV</i> .....	17
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	20
1.5 PATOGENIA DAS INFECÇÕES POR DENGUE.....	21
1.6 RESPOSTA IMUNE NAS INFECÇÕES POR DENGUE .....	23
1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES POR DENGUE .....	25
1.7.1 <i>Isolamento Viral</i> .....	26
1.7.2 <i>Métodos Moleculares para Detecção do Vírus</i> .....	26
1.7.3 <i>Sorologia</i> .....	27
1.7.3.1 <i>Teste de Inibição de Hemaglutinação</i> .....	28
1.7.3.2 <i>Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRNT)</i> .....	28
1.7.3.3 <i>Ensaio Imunoenzimático (ELISA)</i> .....	28
1.7.3.3.1 <i>Captura do Antígeno NS1</i> .....	29
1.8 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	29
1.8.1 <i>Vacinas</i> .....	30
2 JUSTIFICATIVA .....	32
3 OBJETIVOS .....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
4 RESULTADOS .....	35

4.1 ARTIGO 1: IMPACT OF THE EMERGENCE AND RE-EMERGENCE OF DIFFERENT DENGUE VIRUSES' SEROTYPES IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL, 2010 TO 2012. ....	36
4.2 ARTIGO 2: A SIMPLE HEAT DISSOCIATION METHOD SIGNIFICANTLY INCREASES THE ELISA DETECTION SENSITIVITY OF THE NONSTRUCTURAL-1 GLYCOPROTEIN IN DENGUE TYPE-4 VIRUS INFECTED PATIENTS .....	44
4.3 ARTIGO 3: INCREASED SENSITIVITY OF NS1 ELISA BY HEAT DISSOCIATION IN ACUTE DENGUE 4 CASES .....	49
4.4 ARTIGO 4: ANALYSIS OF CLINICAL AND LABORATORY ALTERATIONS RELATED TO DENGUE CASE SEVERITY: COMPARISON BETWEEN SEROTYPES 2 AND 4 IN BRAZIL .....	55
4.5 ARTIGO 5: DENGUE TYPE 4 IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL: CASE CHARACTERIZATION FOLLOWING ITS INTRODUCTION IN AN ENDEMIC REGION .....	64
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
5.1 ANÁLISE DA EMERGÊNCIA DO DENV-4 NO RJ DURANTE A CO-CIRCULAÇÃO COM OS DEMAIS SOROTIPOS DE DENV ENTRE 2010 E 2012.....	75
5.2 ESTABELECIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA PARA O APERFEIÇOAMENTO DA SENSIBILIDADE DO TESTE DE CAPTURA DE NS1 PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DE DENV-4 E ANÁLISE DA SENSIBILIDADE EM UM ESTUDO PROSPECTIVO REALIZADO NO RJ.....	82
5.3 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE CASOS DE DENV-4 EM COMPARAÇÃO A CASOS DE DENV-2 RELACIONADOS À GRAVIDADE DA DOENÇA.....	84
5.4 ANÁLISE DOS ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE CASOS CONFIRMADOS DE DENV-4 APÓS A SUA INTRODUÇÃO EM ÁREA ANDÊMICA DO RJ E GENOTIPAGEM DE CEPAS ISOLADAS.....	87
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>125</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES DE IMPACTO GLOBAL.....	3
FIGURA 2: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS SOROTIPOS DE DENGU (DENV-1 A 4) AO LOGO DE 70 ANOS (1943-2013) NO MUNDO .....	4
FIGURA 3: DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL ATUAL DAS INFECÇÕES DE DENGUE .....	6
FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO DOS SOROTIPOS DE DENV NAS AMÉRIAS, 1908-2014 .....	8
FIGURA 5: CASOS DE DENGUE, DENGUE GRAVE E ÓBITOS NOTIFICADOS NO BRASIL, 1986-2016.....	11
FIGURA 6: CIRCULAÇÃO DOS SOROTIPOS DE DENGUE NO BRASIL, NO ANO DE 2016.....	11
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MORFOLOGIA DO DENV .....	13
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE REPLICAÇÃO DOS VÍRUS DENGUE .....	17
FIGURA 9: CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS DE DENGUE SEGERIDA PELA OMS EM 2009.....	21
FIGURA 10: CINÉTICA LABORATORIAL DAS INFECÇÕES POR DENGUE .....	24

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1: CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA BASEADA NA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO SEQUENCIAMENTO DO GENE QUE CODIFICA PARA A PROTEÍNA E, DE ACORDO COM WEAVER E VASILAKIS .....	19
---	----

## SIGLAS E ABREVIATURAS

C	Capsídeo
DcSA	Dengue com sinais de alerta
DG	Dengue grave
DENV	Virus Dengue
DsSA	Dengue sem sinais de alerta
E	Envelope
ELISA	Teste imunoenzimático
FHD	Febre hemorrágica do Dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HI	Inibição da hemaglutinação
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IFN	Interferon
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LABFLA	Laboratório de Flavivírus
M	Membrana
MAC-ELISA	Elisa para detecção de IgM
MS	Ministério da Saúde
MTase	Metiltransferase
n	número
NS	Não estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAs	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
prM	Pré-membrana
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas
RdRp	RNA dependente da RNA polimerase



RE	Retículo Endoplasmático
RJ	Rio de Janeiro
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da Reação em cadeia pela polimerase
SCD	Síndrome da choque do Dengue
ssRNA	RNA de fita simples
SVS	Secretaria de Vigilância à Saúde
WNV	Vírus Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

# **DENGUE TIPO 4 NO RIO DE JANEIRO: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS, CLÍNICOS E VIRAIS DESDE A SUA EMERGÊNCIA À SUA ENDEMICIDADE**

## **RESUMO**

### **TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Manoela Heringer**

A dengue é hoje um dos principais problemas de saúde pública no Brasil, que tem sido marcada por epidemias extensas. Dadas as opções limitadas de prevenção e controle, tem sido demonstrado que o diagnóstico laboratorial desempenha um papel importante no Sistema de Vigilância Epidemiológica, por infecções de monitoramento contínuo e confirmando novos casos. O principal objetivo deste estudo foi descrever a introdução do sorotipo 4 do vírus da dengue no Estado do Rio de Janeiro. Após a epidemia causada pelo DENV-2, em 2010, e durante a epidemia com maioria de DENV-1 em 2011, vimos a detecção de DENV-4 pela primeira vez no Rio de Janeiro, caracterizando um período com a co-circulação dos diferentes sorotipos no estado. Após a introdução de DENV-4 observamos uma queda na sensibilidade do método de ELISA para detecção do antígeno NS1, para melhorar esta sensibilidade fizemos um estudo com dissociação térmica anterior ao teste de ELISA e observamos um aumento na sensibilidade. Um estudo descritivo e retrospectivo foi feito pela análise de uma base de dados contendo informações de registros epidemiológicos recebidos, juntamente com as amostras biológicas enviadas para o Laboratório de Flavivirus (LABFLA) e os resultados do diagnóstico laboratorial. Um total de 703 casos de DENV-4 foram confirmados nos anos de 2011 a 2013. A RT-PCR foi negativa para apenas 1 caso, enquanto a inoculação em células C6/36 confirmou 41% dos casos. Apenas 10% foram considerados dengue grave, com 14 mortes. Análise filogenética indicou a circulação do Genótipo II de provável origem da Venezuela ou Colômbia. O perfil da epidemia de DENV-a foi diferente das epidemias ocorridas no RJ anteriormente, principalmente em relação ao quadro clínico da doença.

# **DENGUE TIPO 4 NO RIO DE JANEIRO: INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, LABORATORIAIS, CLÍNICOS E VIRAIS DESDE A SUA EMERGÊNCIA À SUA ENDEMICIDADE**

## **ABSTRACT**

### **TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Manoela Heringer**

Dengue is now one of the main public health problems in Brazil, which has been marked by extensive epidemics. Given as limited options for prevention and control, it has been demonstrated that the laboratory diagnosis plays an important role in the Epidemiological Surveillance System, due to continuous monitoring infections and confirming new cases. The main objective of this study was to describe the introduction of serotype 4 of the dengue virus in the State of Rio de Janeiro. After an epidemic caused by DENV-2 and during epidemics with DENV-1 majority in 2011, we detected the detection of DENV-4 for the first time in Rio de Janeiro, characterizing a period with the co-circulation of the different serotypes in the state. After the introduction of DENV-4 we observed a decrease in the detection rate of the NS1 antigen, to solve we did a study with these samples of thermal dissociation prior to the ELISA test and observed an increase in sensitivity. A descriptive and retrospective study was done by analyzing a database containing information from epidemiological records received, together with the biological samples sent to LABFLA and the results of the laboratory diagnosis. A total of 703 cases of DENV-4 were confirmed in the years 2011 to 2013. RT-PCR was negative for only 1 case whereas inoculation in C6 / 36 cells confirmed 41% of the cases. Only 10% were considered severe dengue, with 14 deaths. In a phylogenetic analysis of representative strains only Genotype II was identified with a probable origin of Venezuela and Colombia. The comparison of epidemics with most cases of DENV-4 infection with other serotypes showed differences between them in epidemiological and laboratory variables, especially in relation to the clinical picture of the disease.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Breve histórico

A dengue é uma doença amplamente descrita em todo o mundo e sua origem ainda é especulada. Alguns autores sugerem sua origem no continente africano, devido à origem de seu vetor (Edwards, 1932; Christophers, 1960). Contudo, estudos ecológicos feitos por Smith, em 1956 e Rudnick, em 1986, narram que a não susceptibilidade do vetor ancestral, o *Aedes aegypti formosus*, aos vírus dengue africanos (Diallo et al., 2005). Além disso, estudos de análises filogenéticas indicam uma origem asiática (Gubler, 1998).

Mesmo antes do século XVIII o vírus dengue (DENV) apresentava uma ampla distribuição, com grandes epidemias sendo descritas por todo mundo (McSherry, 1982, Guzman et al., 2010).

Durante a Dinastia Chin (265 a 420 d.C.) foram encontrados os primeiros relatos de uma doença clinicamente compatível com a dengue. Nas enciclopédias chinesas, foi descrita uma enfermidade denominada de “veneno da água”, em virtude de uma associação entre mosquitos e a água, onde os doentes apresentavam febre, exantema, mialgia, artralgia e manifestações hemorrágicas (Gubler, 1998; Murray et al., 2013). Contudo, somente entre os anos de 1779 e 1780, foram documentadas as primeiras epidemias, ocorridas na Ásia, América do Norte e África (Gubler, 2006). Outros possíveis surtos de dengue ocorreram em 1635 nas Índias Ocidentais e em 1699 no Panamá (McSherry, 1982, Guzman et al., 2010).

O advento do transporte marítimo contribuiu para a dispersão dos mosquitos *Aedes* e de humanos infectados nos trópicos e conseqüentemente, em um aumento na notificação de surtos da doença durante o século XVII (Sharp et al., 2017).

O termo “dengue” originou-se na Espanha e foi introduzido na literatura médica inglesa entre 1827 e 1828, durante uma epidemia de exantema com artralgia ocorrida no Caribe. Em 1869, foi estabelecido pelo London Royal College of Physicians para denominar esta enfermidade, até então referida na literatura como

“febre articular”, “febre quebra ossos”, “dinga”, “polka”, entre outros (Siler et al., 1926; Halstead, 1980).

Em 1903, Graham, publicou o envolvimento de mosquitos na transmissão da doença e posteriormente foi confirmado a papel do *Aedes aegypti* como vetor, em estudo feito por Bancroft em 1906 (Rosen et al., 1954).

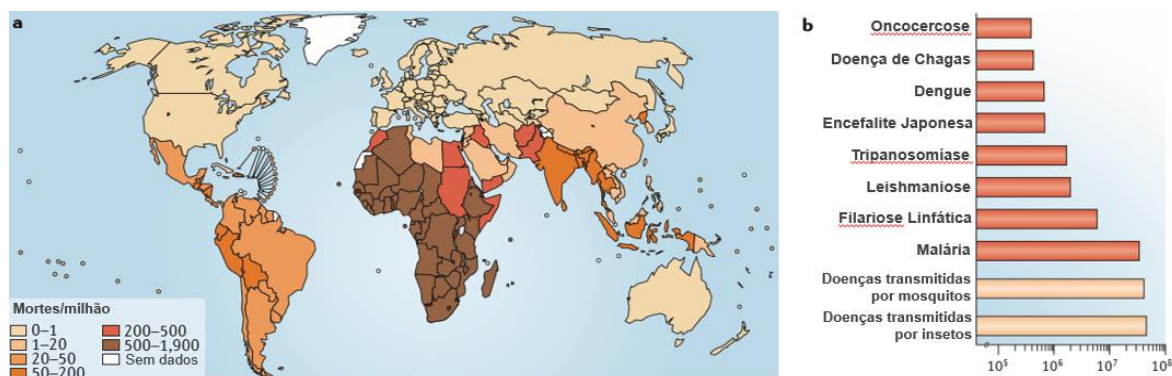
Após experimentos feitos por Ashburn & Craig, em 1907, onde indivíduos sadios foram infectados e reproduziram a doença, foi comprovada a presença do vírus na circulação sanguínea, com a observação de um organismo filtrável e de tamanho ultramicroscópico. Mas somente em março de 1944, durante a Segunda Guerra Mundial, que o DENV foi isolado pela primeira vez, em soldados que contraíram a infecção na Índia, Nova Guiné e Havai (Sabin, 1952). Estes primeiros isolados foram denominados dengue tipo 1 (DENV-1), sendo a cepa do Havai, considerada protótipo para este sorotipo atualmente. Em Nova Guiné, algumas cepas apresentaram características antigênicas distintas, sendo considerado um sorotipo diferente e denominado como dengue tipo 2 (DENV-2), atualmente considerado protótipo. Durante uma epidemia ocorrida em Manila, em 1953, dois novos vírus foram isolados e denominados como dengue tipo 3 (DENV-3) e dengue tipo 4 (DENV-4) (Hammon et al., 1960).

No decorrer de muito tempo, grandes epidemias ocorriam apenas com intervalos de 10 a 40 anos, assim sendo, a dengue era considerada uma doença benigna (McSherry, 1982, Guzman et al., 2010). Somente após a Segunda Guerra Mundial, com o crescimento da população, a urbanização descontrolada, a falta de programas efetivos para o controle do vetor e o aumento das viagens comerciais, ficou evidente a mudança na epidemiologia da doença. Esses fatores colaboraram para expansão geográfica do mosquito transmissor e do vírus, proporcionando o estabelecimento de uma pandemia que persiste até os dias atuais (Gubler, 1998; Messina et al., 2014).

## **1.2 Epidemiologia da dengue**

No mundo, as doenças transmitidas por vetores estão presentes em mais de 100 países, com predomínio em países tropicais e em desenvolvimento, sendo as

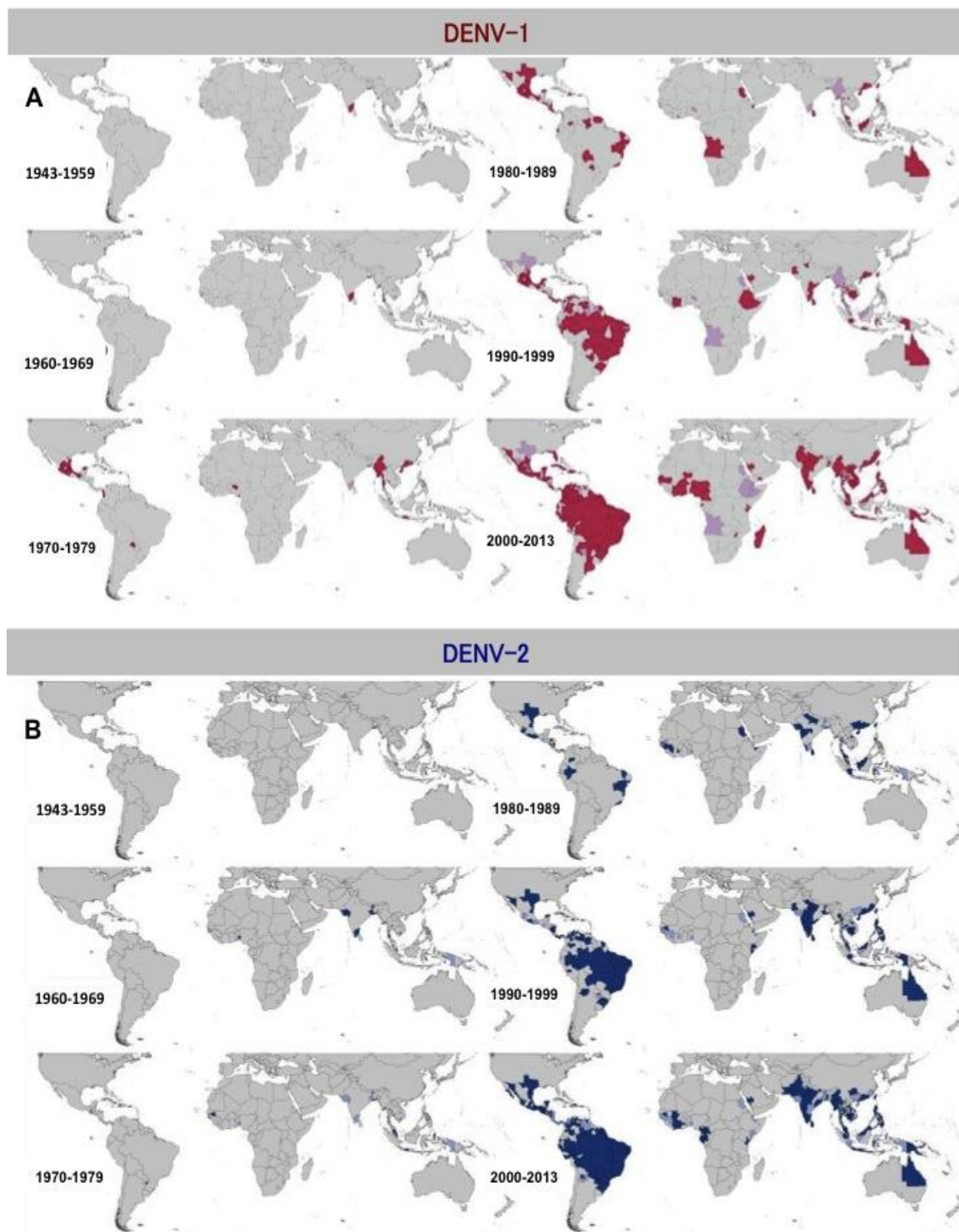
regiões das Américas, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental as mais afetadas (McGrall & O’Neil, 2013; Brady et al., 2015; WHO, 2016) (Figura 1).



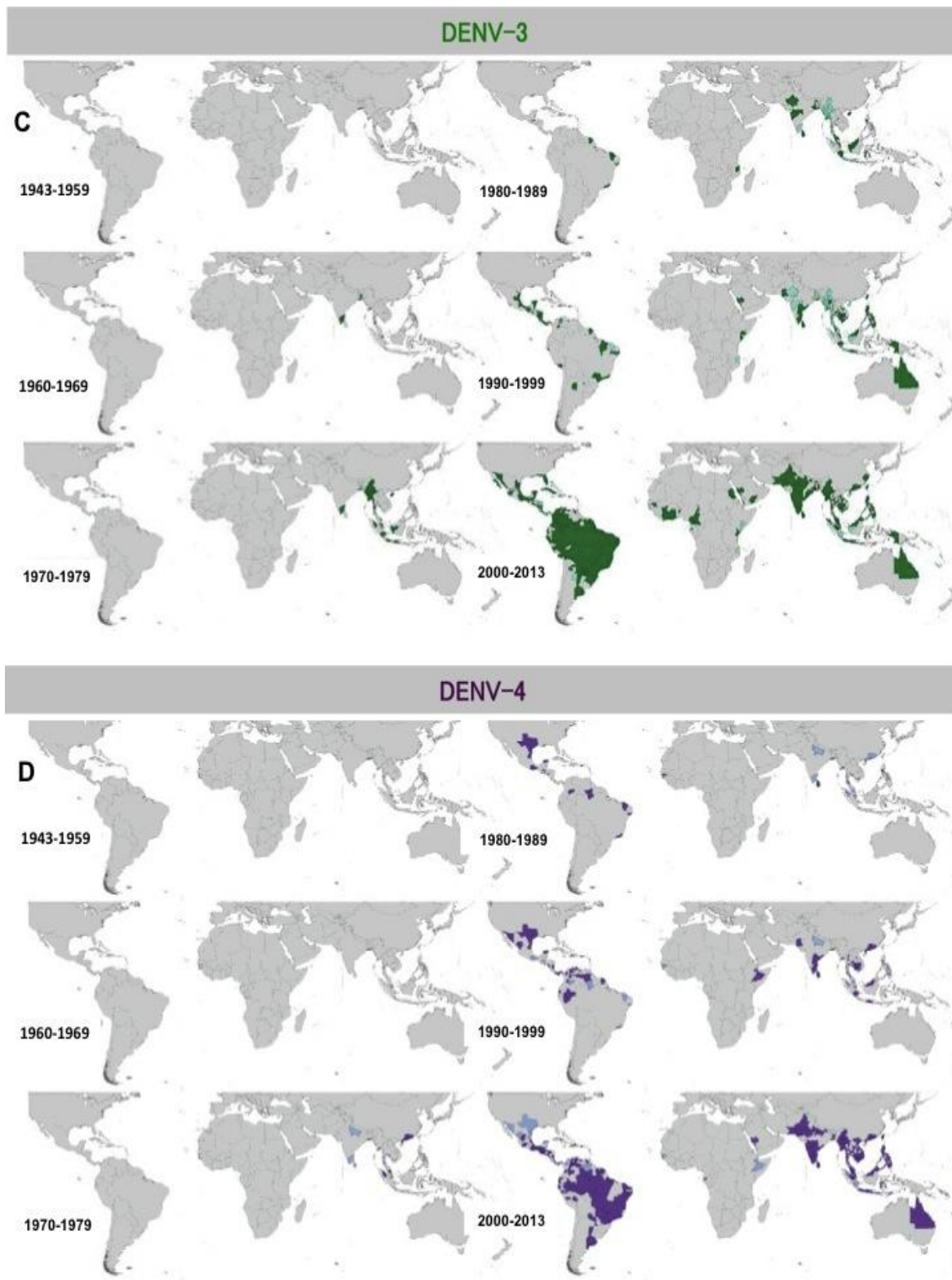
**Figura 1: Doenças transmitidas por vetores de impacto global.** A) incidência mundial de óbitos causados por doenças transmitidas por vetores; **b)** ano de vida ajustado por incapacidade) pelas principais doenças transmitidas por vetores relatadas no mundo. (Adaptado de MacGrall & O’Neil, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a dengue a doença viral transmitida por mosquitos mais importante atualmente, que passou de doença esporádica com epidemias ocorridas em intervalos longos, a um grave problema de saúde pública, de impacto social e econômico no mundo (Guzman & Harris, 2015; WHO, 2016).

Desde a primeira identificação de DENV-1 em 1943, os quatro sorotipos se dispersaram mundialmente (Messina et al, 2014) e nos últimos 50 anos a incidência global da doença aumentou 30 vezes (Guzman & Harris, 2015; Katzelnik et al., 2017), com as regiões tropicais e sub-tropicais tornando-se hiperendêmicas, com a co-circulação dos quatro sorotipos na maioria dos centros urbanos destas regiões (Gubler, 2011; Messina et al., 2014; Gyawali, 2016), Figura 2. De fato, a dengue e outras arboviroses, como chikungunya, Zika e febre amarela, emergiram de maneira sem precedentes nas últimas cinco décadas, resultantes de uma tríade do mundo moderno: urbanização, globalização e mobilidade internacional (Wilder-Smith et al., 2017).



**Figura 2: Distribuição espacial dos sorotipos de dengue (DENV-1 a 4) ao longo de 70 anos (1943-2013) no mundo. A- B: DENV-1 a DENV-4, respectivamente. Áreas escuras indicam casos confirmados na década em questão e áreas claras representam casos confirmados previamente, mas não na década em questão. (Adaptado de Messin et al., 2014).**

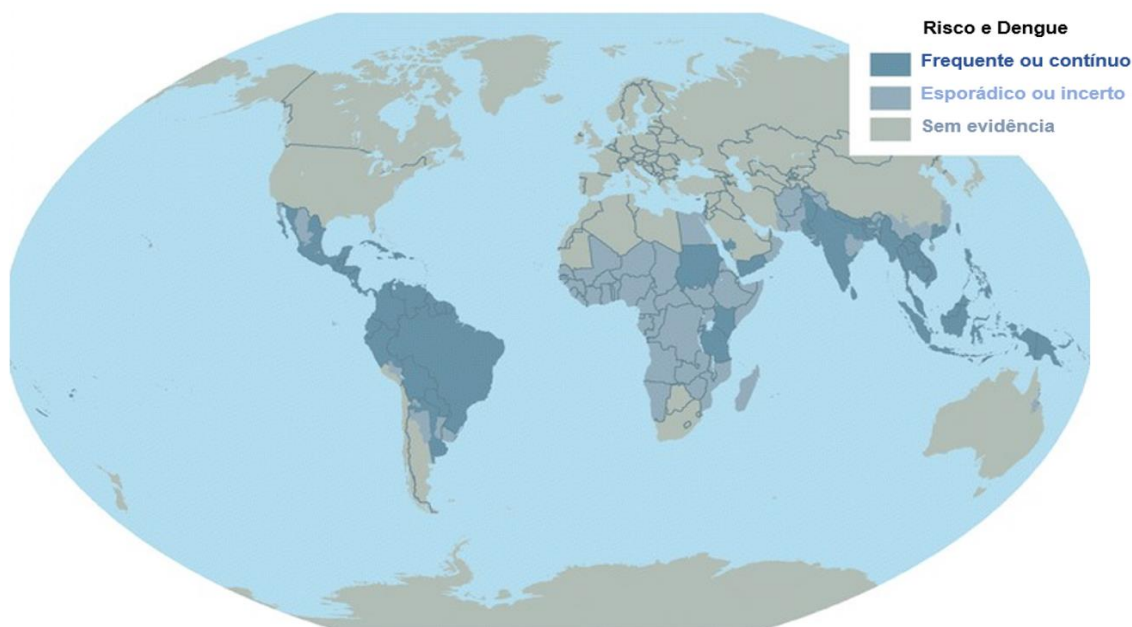


**Figura 2: Continuação - Distribuição espacial dos sorotipos de dengue (DENV-1 a 4) ao longo de 70 anos (1943-2013) no mundo. A- B: DENV-1 a DENV-4, respectivamente. Áreas escuras indicam casos confirmados na década em questão e áreas claras**



representam casos confirmados previamente, mas não na década em questão (Adaptado de Messina et al., 2014).

A dengue é endêmica em mais de 125 países e aproximadamente 3,6 bilhões de pessoas vivem em regiões onde a doença é potencialmente transmitida (Figura 3), com sua dispersão impulsionada pelas mudanças climáticas, evolução do vírus, por fatores sociais, como o crescimento populacional, urbanização descontrolada, circulação de pessoas e programas de controle de vetores insuficientes (Murray, 2013; Katzelnick, 2017).



**Figura 3: Distribuição mundial atual das infecções de dengue** (Adaptado de Sharp et al., 2017).

Estima-se que 390 milhões de casos (284 a 528 milhões) ocorram anualmente, dos quais 96 milhões (67 a 136 milhões) apresentem manifestações clínicas com alguma gravidade (Bhatt et al., 2013). Cerca de 500.000 pessoas são hospitalizadas a cada ano e 2,5% destas vão a óbito (WHO, 2016).

### 1.2.1 Dengue nas Américas

A primeira suspeita de epidemia de dengue nas Américas data de 1635 na Martinica e Guadalupe e, em 1699, no Panamá. No entanto, a história da dengue no

continente americano pode ser caracterizada em quatro fases distintas: a identificação da doença entre 1635 e 1639, o plano continental para erradicação do vetor *Ae. aegypti* pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) entre 1947 e 1970, objetivando a eliminação da febre amarela, a re-infestação pelo vetor associada à interrupção do programa de erradicação no período entre 1971 e 1999 e a migração de *Aedes* do Caribe para a América do Sul, especificamente para a Venezuela e subsequente infestação do Brasil (Brathwaite Dick et al., 2012).

O primeiro sorotipo isolado nas Américas foi o DENV-2, em 1953 em Trinidad e Tobago, mas o registro continuado deste sorotipo no continente só ocorreu entre o fim de 1960 e início de 1970 (Gubler, 2011; Messina et al., 2014; Brathwaite Dick et al., 2012; Cucunawangsi & Lugito, 2017).

Nos anos 70, com a tentativa fracassada de erradicação do vetor (Anderson et al., 1956; Gubler et al., 1997; Brathwaite Dick et al., 2012), o DENV-1 é introduzido nas Américas, primeiramente na Jamaica, em 1977. Contudo, sua rápida dispersão no continente americano causou epidemias em diversos países do Caribe e da América Central e, até o ano de 1980, mais de 700.000 casos da doença foram notificados (PAHO, 2004). Nas décadas seguintes, Brasil, México e Porto Rico, em particular, registraram casos de DENV-1 e, entre 1980 e 1990, Colômbia, Costa Rica, Guiana Francesa, Paraguai, Peru e Venezuela também registraram transmissão sustentada do vírus (Messina et al., Messina et al., 2014).

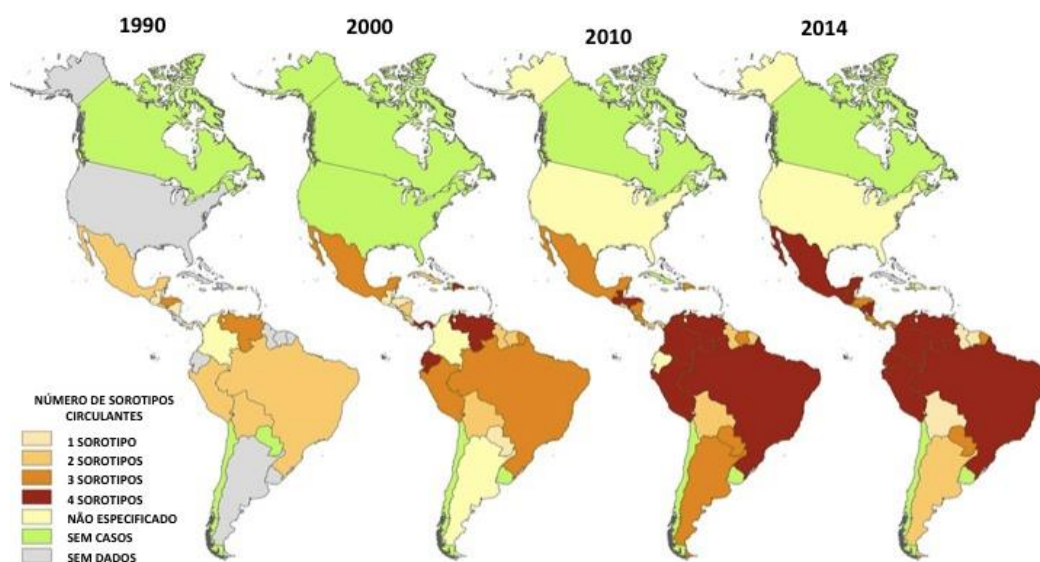
Os primeiros registros de DENV-3 nas Américas ocorreram em 1963, em Porto Rico e, em 1994, uma nova variante deste sorotipo foi introduzido na Nicarágua e no Panamá. Esta introdução foi associada às epidemias de FHD/Síndrome do Choque por dengue (SCD) no Sri Lanka e na Índia desde 1989. Desde então, DENV-3 se dispersou para os países da América Central e México em 1995, Porto Rico em 1998 e outras ilhas do Caribe, causando epidemias nestes, e em países da América do Sul, como Brasil e Colômbia (Messina et al., 2014; Brathwaite Dick et al., 2012; Cucunawangsi & Lugito, 2017).

O sorotipo 4 foi intruduzido nas Américas em 1981, na Ilha de Saint Bartolomeu, no entanto, naquele mesmo ano, a circulação de uma nova variante de DENV-2 foi evidenciada em Cuba, resultando na primeira epidemia de febre hemorrágica do dengue (FHD) (Gubler, 2006; Brathwaite Dick et al., 2012, Messina

et al., 2014; Cucunawangsi & Lugito, 2017). No período entre 1989 e 1990, a segunda maior epidemia de FHD foi reportada nas Américas, com cerca de 20 mil casos, na Venezuela, quando co-circularam DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (Malavige et al., 2004; WHO, 2008).

Atualmente, Brasil, Colômbia e México contribuem com 70% dos casos de dengue nas Américas, onde os quatro sorotipos de DENV circulam. Chile e Uruguai eram os únicos países sem transmissão autóctone de qualquer sorotipo, e desde a confirmação do primeiro caso em fevereiro de 2016, o Uruguai registrou 570 casos suspeitos da doença (Gyawali et al. 2016; WHO, 2016; OPAS, 2017).

De acordo com a OMS, a situação epidemiológica da dengue nas Américas continua extremamente complexa e instável com a contínua dispersão da doença deste a década de 1980 (Figura 4). Entre os anos 2000 e 2014, foram registrados mais de 14,2 milhões de casos de dengue, com 7.000 óbitos (OPAS, 2015). Até a 24ª semana epidemiológica de 2017 (23 de Junho de 2017), 274.534 casos suspeitos já haviam sido reportados as Américas, representando uma redução comparada aos anos anteriores (WHO, 2017).



**Figura 4: Distribuição dos sorotipos de DENV nas Américas, 1980-2014** (Adaptado de OPAS, 2015).

### 1.2.2 Dengue no Brasil

No Brasil, os primeiros relatos de doença compatível com dengue, datam de meados do século XIX, com os primeiros surtos ocorridos entre 1846 e 1853 em São Paulo e no Rio de Janeiro mas, provavelmente, também nas regiões Sul, Nordeste e em outras cidades do Sudeste. Em 1917 foram relatados surtos em Curitiba e no estado do Rio Grande do Sul. Nos anos de 1922 e 1923 ocorreu um grande surto na cidade do Rio de Janeiro e cidades vizinhas (Figueiredo, 2000).

Os primeiros isolamentos de DENV no país ocorreram em julho de 1982, na cidade de Boa Vista em Roraima, quando DENV-2 e DENV-4 causaram surtos localizados e, na ocasião, não se dispersaram para o restante do país (Osana et al, 1983).

Após quatro anos sem novos casos, em 1986 foi isolado o DENV-1 em pacientes com quadro exantemático, durante epidemia ocorrida no município de Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro (Schatzmayr et al., 1986). Nos anos seguintes, a doença se tornou um problema de saúde pública em quase todo território nacional, com epidemias ocorrendo em diversos estados do país (Nogueira et al., 2007).

Em 1990, também no estado do Rio de Janeiro, mas no município de Niterói, foi registrada a introdução de DENV-2 (Nogueira et al., 1990), quando foi observado um agravamento dos quadros clínicos, sendo notificados os primeiros casos de FHD/SCD no país (Nogueira et al., 2007). A introdução do novo sorotipo causou novas epidemias em diversos estados brasileiros e naquele ano, foram notificados 40.279 casos, com 274 casos de FHD e oito óbitos (Nogueira et al., 1995). Em 1991, uma nova epidemia ocorreu no país, com a confirmação de 104.399 casos (SVS/MS, 2002).

A introdução de um novo sorotipo (DENV-3) no município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, no final de 2000 (Nogueira et al, 2000), resultou no ano seguinte, na co-circulação de três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3), e na maior e, até então, a mais grave epidemia do país, no ano de 2002 (Nogueira et al, 2002; De Simone et al, 2004).

Entre 2002 e 2007, DENV-3 foi o sorotipo predominante, porém DENV-2 reemergiu em 2007, resultando em uma extensa epidemia no ano de 2008, com um

aumento significativo no número de FHD em menores de 15 anos, representando cerca de 50% dos casos de dengue e 86% das mortes ocorrendo em indivíduos nesta faixa etária (Teixeira et al., 2009). Naquele ano, 806.036 casos e 229 óbitos foram notificados (SVS/MS, 2016).

Em 2009, DENV-1 reemergiu e 529.237 casos de dengue e 298 óbitos foram notificados. No ano de 2010, este foi o sorotipo responsável pela maior epidemia até então conhecida no país, com mais de 1 milhão de casos e 356 óbitos confirmados. No ano seguinte houve uma diminuição no número de notificações, com 764.032 casos de dengue no país e 482 óbitos (SVS/MS, 2009).

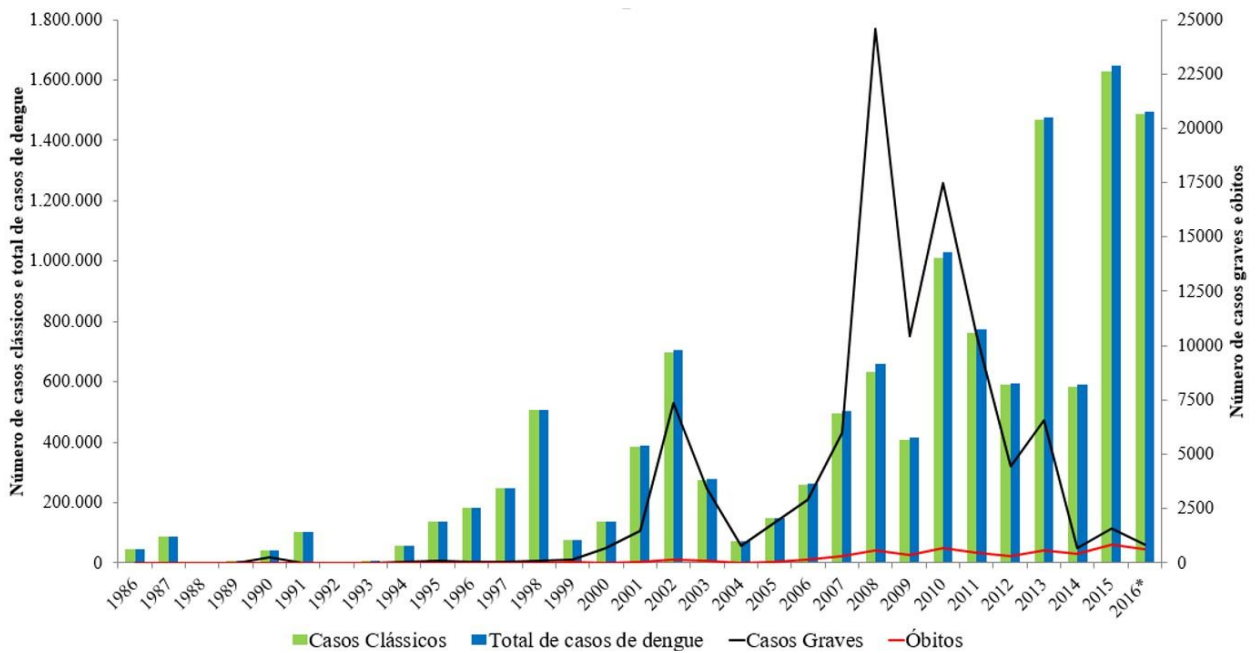
Até o ano de 2010 era relatada, principalmente, a co-circulação de DENV-1 e DENV-2, quando DENV-4 foi identificado em pacientes do estado de Roraima. Em julho de 2010 este sorotipo foi também isolado no Amazonas. Em janeiro de 2011 DENV-4 foi isolado no Pará, alcançando o estado do Rio de Janeiro em março de 2011 (Temporão et al., 2011; Nogueira, 2011).

Nos anos seguintes, DENV-4 e DENV-1 foram os sorotipos responsáveis por novas epidemias. Em 2012, 589.581 casos de dengue e 121 óbitos foram registrados e, em 2013, o maior número de casos foi notificado no país (1.452.289 casos e 235 óbitos), (SVS/MS, 2013).

O ano de 2014 foi marcado por uma queda nas notificações e 589.107 casos foram reportados. No entanto, em 2015, 1.688.688 casos prováveis de dengue e 839 óbitos foram reportados no Brasil, o que representou um aumento de 80,4% em comparação com o mesmo período de 2014 (SVS/MS, 2015).

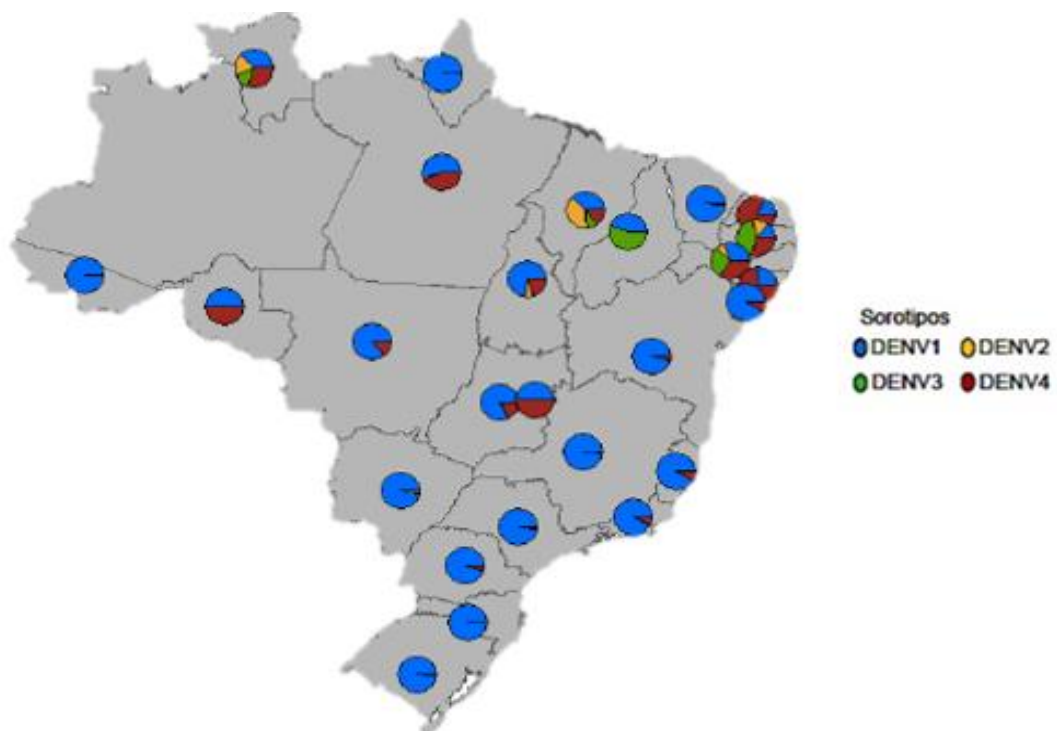
Em 2016, 1.500.535 casos prováveis de dengue foram registrados e, até a Semana Epidemiológica 19 (13/05/2017) de 2017, 144.326 casos prováveis de dengue no país foram registrados (SVS/MS, 2017).

Nos últimos 30 anos, extensas epidemias de dengue ocorreram no Brasil, caracterizadas por emergências e reemergências dos diferentes sorotipos, mudanças no perfil epidemiológico e aumento no número de casos e fatais, Figura 5.



**Figura 5: Casos de dengue, dengue grave e óbitos notificados no Brasil, 1986-2016** (dados coletados dos boletins epidemiológicos do MS).

Apesar da situação hiperendêmica do país com a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV, em 2016 uma maior prevalência de casos de DENV-1, seguido de DENV-4 foi reportada (Sinan, 2016), Figura 6.



**Figura 6: Circulação dos sorotipos de dengue no Brasil, ano 2016** (SINAN, 2016).

### 1.3 O vírus Dengue

O DENV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, onde estão inseridos vírus de mais de 70 espécies em grupos sorologicamente associados, entre eles o vírus da febre amarela (YFV), o vírus Zika (ZIKV) e o vírus do Oeste do Nilo (WNV) (Westaway *et al.*, 1985; Sashili & Lescar, 2017).

Os quatro sorotipos do vírus (DENV-1 a 4) possuem propriedades antigênicas distintas que podem influenciar o desfecho da doença, a proteção à vacina, magnitude da epidemia e evolução viral (Katzelnick *et al.*, 2015).

Um possível quinto sorotipo (DENV-5) foi identificado na Malásia, por Vasilakis em 2007, a partir de amostra de soro de paciente (Normile, 2013; Silva Voorham *et al.*, 2014; Mustafa *et al.*, 2015), no entanto, apesar da aparente distinção antigênica dos outros quatro sorotipos, o DENV-5 permanece não descrito até o momento.

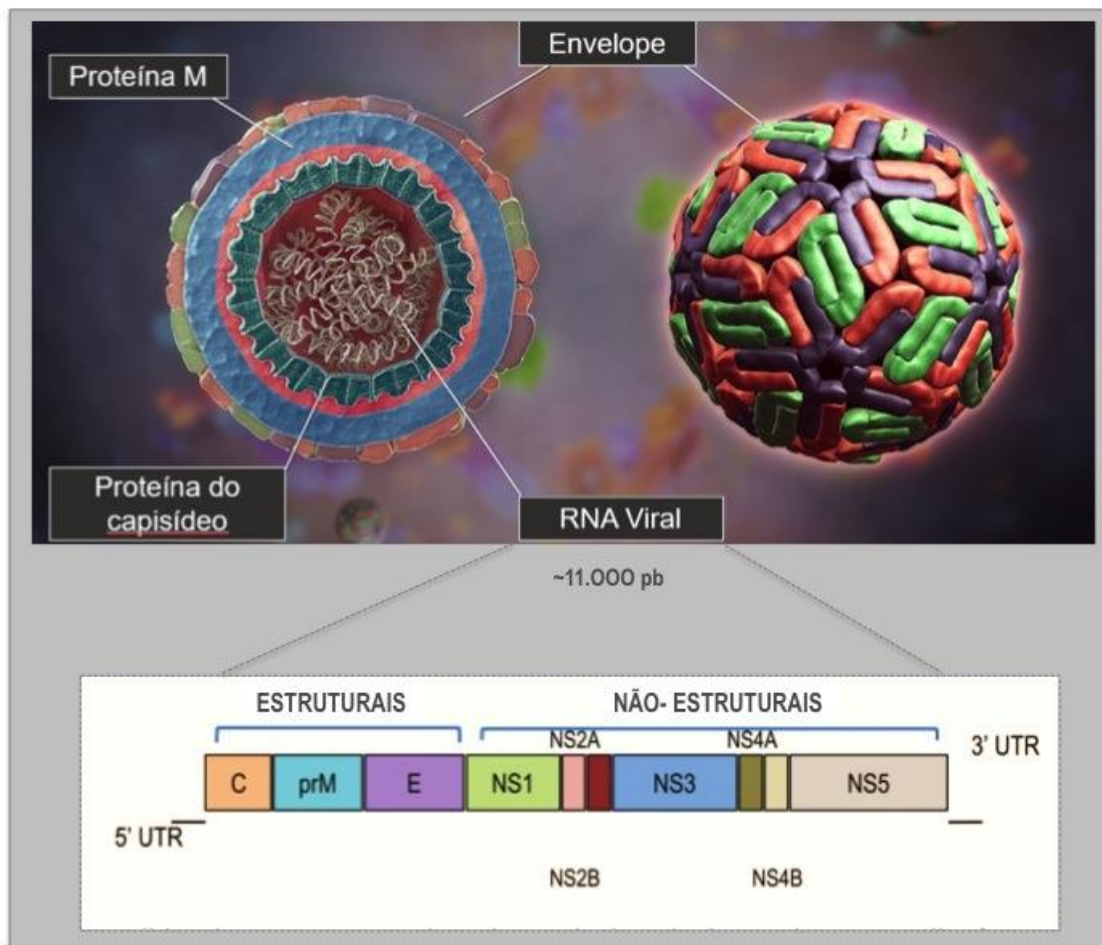
Os DENV são classificados como arbovírus, ou seja, vírus mantidos na natureza através de um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados, como primatas não humanos e humanos, e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, sendo o *Ae. aegypti* o principal vetor, devido aos seus hábitos domésticos (Gubler, 2002; Roundy *et al.*, 2017).

Os DENV são vírus esféricos, envelopados, com aproximadamente 40-60 nm de diâmetro, com genoma constituído de RNA de fita simples (ssRNA) com polaridade positiva e aproximadamente 11kb, contendo regiões não traduzidas nas extremidades de 5' e 3' (UTR). O RNA viral codifica para três proteínas estruturais: proteínas do capsídeo (C), de membrana (M) e do envelope (E); e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O vírus maduro é composto pelas proteínas estruturais, enquanto as proteínas não estruturais são expressas na célula infectada (Lindebach & Rice, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Back, 2013; Sashili & Lescar, 2017) (Figura 7).

A proteína estrutural do capsídeo (C) é a primeira a ser sintetizada, apresenta fita única de polaridade positiva e encapsula o RNA viral (Chambers *et al.*, 1990; Idrees & Ashfal, 2012).

O nucleocapsídeo tem simetria icosaédrica e é envolto por lipídeos derivados da célula hospedeira, onde estão ancoradas as proteínas de membrana (M) e do envelope (E). A proteína E é glicosada, possui 3 domínios estruturais (DI-III), que

são necessários para neutralização, fusão e interação com os receptores presentes na célula hospedeira e é o principal alvo para os anticorpos neutralizantes, sendo de grande importância na virulência (Wengler et al., 1987; Clyde et al., 2006; Yacoub et al., 2016). Por sua vez, a proteína M é um fragmento resultante da proteólise da proteína pré membrana (prM) e forma o envelope viral, juntamente com a proteína E (Ligon, 2004; Rodenhuis-Zybert et al., 2010).



**Figura 7: Representação esquemática da morfologia do DENV.** Crioletromicrografia da partícula viral com sua estrutura icosaédrica, com projeções representando proteínas estruturais de membrana (M) e de envelope (E). Adaptado de Cucunawangsih & Lugito, 2017.

A primeira proteína não estrutural é a NS1 relacionada com a ativação do sistema complemento, levando à perda extravascular do paciente (Dussart et al., 2006; Lima et al., 2010; Sashili & Lescar, 2017). Estudos demonstraram que níveis solúveis de NS1 podem indicar uma doença grave, onde pacientes com DHF



demonstram níveis maiores de NS1 circulantes do que pacientes com dengue clássico (Dussart et al., 2006; Lima et al., 2010).

A proteína NS1 de todos os flavivírus partilham um elevado grau de homologia, com 1.056 nucleotídeos que codificam um polipeptídeo de 352 aminoácidos (Mackow et al, 1987; Mandl et al, 1989) e, dentre os sorotipos de DENV, sua similaridade é superior a 70%. Apresenta 12 resíduos de cisteína conservados (com exceção do DENV-4), dois sítios de N-glicosilação invariáveis (com exceção de alguns membros, como Vírus da Encefalite transmitida por Carrapato, TBEV), assim como regiões de alta homologia entre as sequências de diversos flavivírus (Chambers et al., 1990). É uma glicoproteína, cujo monômero possui peso molecular entre 46 e 55 kDa, dependendo do seu estado de glicosilação. Pode ser encontrada em várias formas oligoméricas e encontra-se em diferentes localizações celulares: associada à membrana da célula (mNS1), apesar de não possuir nenhuma região altamente hidrofóbica ou típica de âncora de membrana; dentro da célula em compartimentos vesiculares, onde sua forma dimérica parece interagir com outras proteínas não estruturais e com o RNA do vírus, estando envolvida na montagem do complexo da replicase viral (Winkler et al, 1989; Costa et al, 2007) e uma forma hexamérica extracelular secretada (sNS1) (Mason, 1989; Flamand et al., 1999). Frente a esta última forma, pode-se explicar a produção de anticorpos contra esta proteína, detectada em soro de pacientes, na fase aguda da doença (Young et al, 2000; Alcon et al., 2002; Chung & Diamond, 2008).

A forma hexamérica da proteína NS1 é altamente conservada nos quatro sorotipos e foi encontrada circulando no soro de pacientes do primeiro ao nono dia após o início da febre (Flamand et al., 1999, Young et al., 2000, Alcon et al., 2002, Xu et al., 2006). Aproveitando-se destas características, ensaios imunoenzimáticos para a detecção específica da proteína NS1 foram desenvolvidos e avaliados para a confirmação de casos agudos primários e secundários de dengue (Dussart et al., 2006; Kumarasamy et al, 2007; Sekaran et al, 2007; Lapphra et al., 2008; Chuansumrit et al, 2008; Phuong et al., 2009; Guzman et al, 2010; Duong et al, 2011; Blacksell et al, 2012; Huang et al, 2013; Sánchez-Vargas et al, 2014). Durante a infecção por DENV, a sNS1 pode acumular níveis muito elevados, podendo ser

detectado até 50µL/mL em alguns soros de pacientes (Young et al, 2000; Libraty et al, 2002; Alcon-LePoder et al, 2006).

A proteína NS2A é uma proteína de membrana, está relacionada com o transporte do RNA viral no sítio de replicação e também com a montagem no vírus. Apesar de ter sido pouco caracterizada, possivelmente, estimula a produção de interferon (IFN) agindo como antagonista deste (Jones et al., 2005; Sashili & Lescar, 2017). Por sua vez, a proteína NS2B, junto com a proteína NS3 funcionam como cofator para ativação estrutural do vírus (Jones et al., 2005).

A NS3 é uma proteína não-estrutural e a segunda maior proteína viral, altamente conservada. Ela possui dois domínios, o primeiro denominado NS3Pro é essencial para a replicação viral, este domínio trabalha junto com um cofator peptídico, a NS2B. O segundo domínio é ATPase/helicase localizado na porção C-terminal que participa na replicação viral, independente do primeiro domínio (Chamers et al., 1990; Luo et al., 2008; Aguilera-Pesantes, 2016).

A proteína NS4A colabora para o complexo de replicação viral e pode induzir alterações da membrana, também atua como inibidor da transcrição do IFN (MuñozJórdan et al., 2003) e colabora com a replicação viral (Lindenbach & Rice, 2001; Sashili & Lescar, 2017). A NS4B interage com o domínio helicase da NS3 modulando a replicação viral (Umareddy et al., 2006).

Por fim, a NS5 é a maior e mais conservada das proteínas (com similaridade de sequência de 70% entre os quatro sorotipos) e é expressa durante a infecção pelo vírus. Possui dois domínios, um domínio de metiltransferase (MTase) na sua extremidade N-terminal e uma RAN polimerase (RdRp) dependente de RNA no seu terminal C. Estudos descrevem que a NS5 representa um alvo antiviral promissor para projetar inibidores específicos com baixa toxicidade (Chambers et al., 1990; Sashili & Lescar, 2017).

### **1.3.1 Replicação do Vírus Dengue**

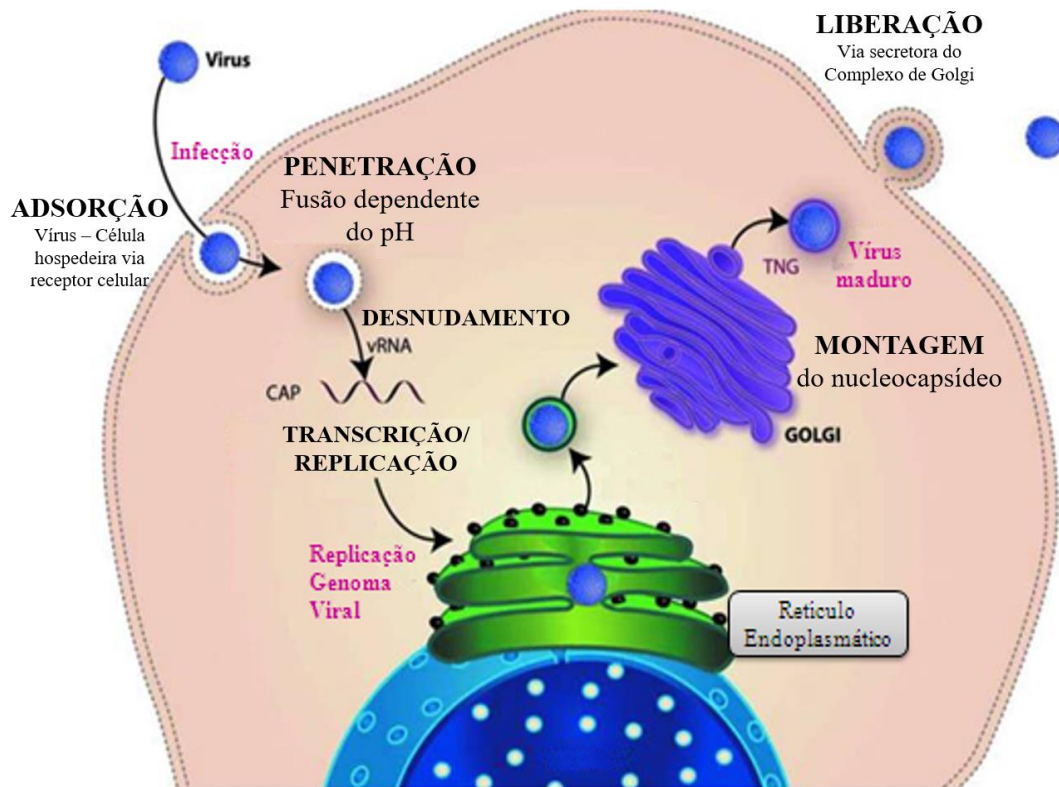
As células dendríticas, monócitos, macrófagos, células linfóides e hepatócitos são as principais células alvo para infecção pelos DENV (Jessie et al.,2004; Ross, 2010; Chawla et al., 2013).

Após a picada pelo mosquito vetor, durante o repasto sanguíneo, o DENV irá infectar, inicialmente, as células de Langerhans, que são as células dendríticas presentes da pele. Posteriormente, esses vírus se replicam no citoplasma das células musculares, fibroblastos e nos linfonodos (Figueiredo, 1999; Wu, 2000).

O ciclo do DENV na célula hospedeira se inicia com a ligação do vírus através da interação da proteína E com receptores de ligação na superfície celular do hospedeiro e, em seguida, são internalizados para a célula por endocitose, que é um processo ativo com invaginações na membrana plasmática (revisto em Boldescu et al., 2017). Associado com a fusão do envelope com a vesícula endocítica, o RNA viral é liberado no citoplasma, devido a uma acidificação do meio, com pH em torno de 6,0 à 6,2 (Back et al., 2013; Rastogi et al., 2016).

O RNA viral irá replicar em áreas focais perinucleares, que ocorre em duas fases. Na primeira fase, o genoma viral se comporta como RNA mensageiro, sendo traduzido por ribossomos celulares, para uma poliproteína que será processada por proteases virais e da célula hospedeira. Na replicação tardia, juntamente com as células do hospedeiro, as proteínas clivadas remodelam, amadurecem a poliproteína e replicam o RNA viral (Mukhopadhyay et al., 2005; Tmlinson et al., 2009; Shum et al., 2010; Sashili & Ilescar, 2017).

O RNA recém-sintetizado, brota para o lúmen do retículo endoplasmático (RE), a proteína do capsídeo e o RNA são envolvidos pela membrana do RE e glicoproteínas, formando as partículas virais imaturas. Em meio ácido do complexo de Golgi, os vírus imaturos passam pela etapa de maturação pela clivagem mediada por furina e em seguida o vírus maduro é liberado da célula (Mukhopadhyay et al., 2005; Back et al., 2013; Rastogi et al., 2016), Figura 8.



**Figura 8: Representação esquemática do ciclo de replicação dos vírus dengue** (Adaptado de Shum, 2010).

### 1.3.2 Diversidade genética dos DENV

Os vírus RNA apresentam um alto grau de variabilidade genética, devido ao alto grau de mutação vinculado a RNA polimerase viral RNA-dependente.

A falta de mecanismo de correção desta RNA polimerase durante a replicação, as rápidas taxas de replicação, o grande tamanho populacional e a pressão imunológica do hospedeiro levam a mutações do vírus (Holmes & Twiddy, 2003).

Inicialmente, a demonstração de diferentes cepas de DENV foi detectada sorologicamente com a utilização de anticorpos inoculados laboratorialmente em animais. Evidências genéticas para diferenciação entre os sorotipos só foram determinadas através da técnica de RNA *fingerprinting*, com enzimas para digestão do RNA, demonstrando a variação no número e no tamanho das fitas de acordo com a sequência do vírus, sendo estes, agrupados em topotipos (Sabin, 1952; Rico-Hesse, 2003; chen & Vasilakis, 2011).

No entanto, com o avanço das técnicas moleculares, como o sequenciamento genômico e análise filogenética, foi possível a classificação dos DENV em grupos geneticamente distintos (Lewis et al., 1993; Lanciotti et al., 1994; Rico-Hesse, 2003; Fatima et al., 2011). Definiu-se como “genótipos”, grupos de vírus que apresentam uma divergência nucleotídica  $\geq 6\%$  dentro de uma determinada região do genoma viral (Rico-Hesse, 1990).

Estudos baseados no sequenciamento parcial ou completo do genoma, caracterizaram cinco genótipos para DENV-1, seis genótipos para DENV-2, cinco genótipos para DENV-3 e três genótipos para DENV-4 (Weaver & Vasilakis, 2009; Chen & Vasilakis, 2011), Quadro 1. A identificação dos diferentes genótipos pode ser realizada pela análise completa do genoma, no entanto o gene E é, geralmente o alvo comumente utilizado (Klungthong et al., 2008).

**Quadro 1:** Classificação genotípica baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Weaver e Vasilakis (2011).

<b>SOROTIPO</b>	<b>GENÓTIPOS</b>	<b>DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA</b>
<b>DENV-1</b>	<b>I</b>	Sudeste Asiático, China, Leste da África
	<b>II</b>	Tailândia (1950-1960)
	<b>III</b>	Malásia (cepas selvagens)
	<b>IV</b>	Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália
	<b>V</b>	Américas, Oeste da África Africano, Ásia
<b>DENV-2</b>	<b>Asiático I</b>	Malásia e Tailândia
	<b>Asiático II</b>	Vietnã, da China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	<b>Cosmopolita</b>	Austrália, Leste e Oeste Africano, Ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	<b>Americano</b>	América Latina, Caribe (1950-1960), Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico
	<b>Sudeste Asiático/Americano</b>	Tailândia, Vietnã, Américas (últimos 20 anos)
<b>DENV-3</b>	<b>I</b>	Indonésia, Malásia, Filipinas e Sul da Ilhas do Pacífico
	<b>II</b>	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	<b>III</b>	Sri Lanka, Índia, África, Samoa, Tailândia (1962)
	<b>IV</b>	Porto Rico, Américas Latina e Central, Taiti (1965)
	<b>V</b>	Filipinas (1956), Japão (1973), China (1980) América do Sul (2002-2004)
<b>DENV-4</b>	<b>I</b>	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão (provenientes do Sudeste Asiático)
	<b>II</b>	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	<b>III</b>	Tailândia (cepas recentes)
	<b>IV</b>	Malásia (cepas selvagens)

No Brasil, atualmente circula o genótipo V (Américas/África) de DENV-1, porém linhagens distintas dentro deste genótipo já foram descritas (Dos Santos et al., 2011; Carneiro et al., 2012; Drummond et al., 2012; de Bruycker-Nogueira et al., 2015; Dutra et al., 2017).

Linhagens distintas também foram descritas para o genótipo do Sudeste Asiático/Americano de DENV-2 (Oliveira et al., 2010; Faria et al., 2013; Drummond et al., 2013; Mir et al., 2014) e do genótipo III de DENV-3 circulantes no Brasil

(Miagostovich et al., 2006; de Araújo et al., 2012). No entanto, o genótipo V foi identificado em Porto Velho e Belo Horizonte (Aquino et al., 2009) e a co-circulação dos genótipos III e V, foi reportada em Rondônia (Nogueira et al., 2008).

Mesmo com a recente introdução de DENV-4 no país, dois genótipos (I e II) já foram identificados em circulação (de Souza et al., 2011; Nunes et al., 2012; Figueiredo et al., 2013; Fares et al., 2015; Dutra et al., 2017; Ramos-Castaneda et al., 2017).

A análise das variantes genéticas de DENV é de grande relevância, pois pode permitir a reconstrução da história de epidemias no tempo e espaço, complementando dados epidemiológicos (Costa et al., 2012) e auxiliar no entendimento da evolução e transmissão dos diferentes sorotipos.

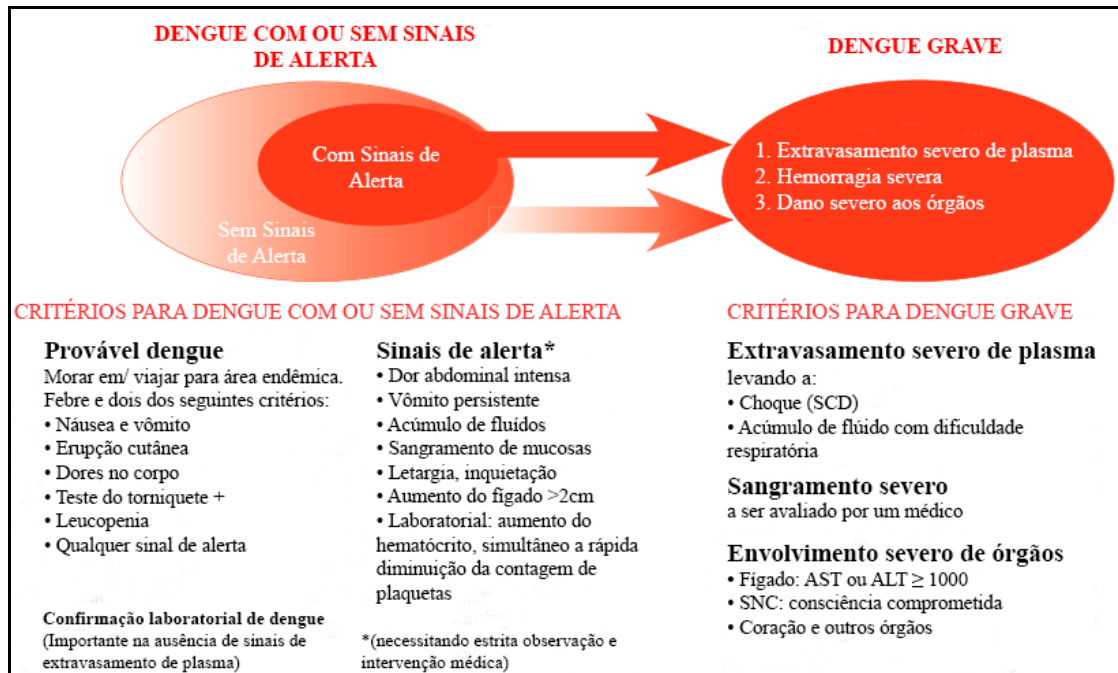
#### **1.4 Manifestações clínicas**

Caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas, a dengue pode apresentar uma evolução imprevisível. Tais manifestações podem variar desde febre branda, auto-limitada, com recuperação espontânea a um quadro muito grave com extravasamento de plasma, concomitante com um quadro de hemorragia.

A necessidade de caracterização adequada dos casos, de modo a permitir a abordagem apropriado de pacientes e um tratamento eficaz, fez com que a OMS, em 2009, reformulasse a escala de classificação da doença (OMS, 2009).

Os casos de dengue são atualmente caracterizados como (i) Dengue sem sinais de alerta – caracterizada por apresentar, além de febre, até dois sintomas brandos, entre náusea, vômito, erupção cutânea, dor localizada, teste do torniquete positivo e leucopenia, (ii) Dengue com sinais de alerta – com sinais que incluem dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluidos, sangramento de mucosas, letargia ou inquietação, aumento do fígado e diminuição da contagem de plaquetas – ambos podendo progredir para um quadro mais grave, classificado como (iii) Dengue Grave (DG), caracterizado por grave extravasamento de plasma (que pode evoluir para choque), hemorragia intensa e falência de órgãos (WHO, 2009), Figura 9.

A nova classificação foi reavaliada e expandida pela OMS em 2012, e vem sendo utilizada em diversos países para diagnóstico de infecções por DENV (WHO, 2012).



**Figura 9: Classificação dos casos dengue sugerida pela OMS em 2009** (Adaptado de WHO, 2009). SCC: Síndrome do choque por dengue, AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase.

### 1.5 Patogenia das infecções por dengue

De um modo geral, os mecanismos associados à patogênese do DENV ainda não são totalmente compreendidos, principalmente devido à inexistência de um modelo animal que reproduza adequadamente a infecção como ocorre em pacientes humanos (Thein et al., 1997; Simmons et al., 2012; Zubair et al., 2016). Portanto, diversas teorias são propostas, na tentativa de se explicar o amplo espectro de variação das manifestações clínicas causadas por DENV (Halstead e Cohen, 2015).

As variações genéticas e antigênicas das cepas virais são consideradas umas das hipóteses, sugerindo que sejam responsáveis pela intensidade do quadro clínico. A evolução genética do vírus dentro de cada sorotipo pode originar cepas mais virulentas ou epidêmicas (Rosen et al., 1977; Gubler et al., 1978).



Dentre os sorotipos de DENV, o DENV-2 tem sido o sorotipo frequentemente associado com casos de FHD/SCD (Burke et al., 1988; Thein et al., 1997; Guzman et al., 2002; Balmaseda et al., 2006), seguido de DENV-1 e DENV-3 (Graham et al., 1999; Harris et al., 2000; Messer et al., 2003; Guzman et al., 2006; Balmaseda et al., 2006), enquanto que DENV-4 parece ser o sorotipo associado a quadros clínicos mais brandos, embora possa causar doença grave (Nisalak et al., 2003).

De fato, DENV-2 e DENV-4 têm sido associados com um aumento na gravidade da doença quando ocorrem durante a infecção secundária, enquanto que, em alguns estudos, DENV-1 e DENV-3 parecem causar uma doença mais grave do que os outros sorotipos em infecção primária (Vaughn et al., 2000; Nisalak et al., 2003; Balmaseda et al., 2006). Contudo, a infecção secundária por qualquer um dos quatro sorotipos de DENV tende a ser um fator de risco para o desenvolvimento de um quadro mais grave da doença (Halstead, 2007).

Apesar de não existirem fatos que demonstrem uma clara correlação entre a gravidade com um genótipo específico, existem indicativos que alguns genótipos estão associados à evolução da doença. Estudos evolutivos descrevem que as cepas de origem asiática sejam mais virulentas do que os genótipos de origem nas Américas e do Pacífico Sul (Rico-Hesse et al., 1997; Messer et al., 2003; Clyde et al., 2006; Rico-Hesse, 2010).

A teoria da facilitação dependente de anticorpo ou ADE, “antibody dependent enhancement”, preconiza uma associação entre infecções secundárias e o desenvolvimento de formas mais graves da doença. Nesta teoria, ocorre a formação de imunocomplexos entre o sorotipo viral infectante e anticorpos heterólogos da classe IgG de uma infecção anterior em níveis sub-neutralizantes, que facilitarão a nova infecção. Estes complexos, ao serem reconhecidos e internalizados por fagócitos mononucleares, resultariam na infecção celular e replicação viral, que liberariam na corrente sanguínea, mediadores vasoativos capazes de aumentar a permeabilidade vascular, ativação do sistema complemento e da tromboplastina tissular (Halstead, 1988; Sreaton et al., 2015).

Na teoria do “Pecado Original”, a infecção secundária por um sorotipo distinto de DENV resultaria na ativação e expansão de células T CD4+ e CD8+, com baixa avidéz e de reatividade cruzada para o sorotipo da infecção secundária (Mentor &

Kurane, 1997; Remy 2014). Estas células não realizariam o “clearance” viral, e produziriam mediadores inflamatórios como IFN-gama que podem agir diretamente sobre o endotélio vascular e resultar no extravasamento de plasma, característico das infecções graves por DENV (Mongkolsapaya et al.,2003; Pang et al., 2007; Weiskopf et al., 2013; Screatton et al., 2015).

No entanto, apesar das diferentes teorias propostas, acredita-se que a patogênese da dengue seja multifatorial, envolvendo aspectos nutricionais e genéticos do hospedeiro, idade, sexo, estado imunológico, variações genéticas entre os sorotipos e genótipos viral infectantes estariam atuando no desenvolvimento de um quadro mais grave (Gúzman & Kouri, 2002; Malavige et al., 2004).

## **1.6 Resposta Imune nas Infecções por Dengue**

Após a picada do mosquito infectado, a doença passa por um período de incubação de 4 a 7 dias, podendo variar de 3 a 15 dias. O vírus permanece detectável no sangue durante a fase febril aguda por até 3-5 dias, partículas viáveis podem ser detectadas no sangue por até 5 dias após o início da doença e desaparecem após a produção de anticorpos específicos para o vírus (Vordam & Kuno, 1997; Kao et al., 2005; Moreli & Costa, 2013). A infecção em humanos por um sorotipo confere imunidade permanente contra re-infecções subsequentes pelo mesmo sorotipo, mas apenas proteção parcial e temporária contra os demais (Martinez, 2008).

A resposta imune adquirida na infecção por DENV consiste na produção de anticorpos (IgM, IgG e IgA) específicos, principalmente, contra a proteína E (Guzman, 2010; Peeling et al., 2010).

A resposta adaptativa na dengue pode apresentar dois padrões, diferentes quando ocorre uma infecção primária ou uma infecção secundária (Figura 10). Na infecção primária por qualquer sorotipo de DENV, a resposta é lenta e com baixo título de anticorpos. Os anticorpos da classe IgM são os primeiros a aparecer, e a maior parte dos pacientes apresenta níveis de IgM que podem ser detectáveis a partir do sexto dia após o aparecimento dos sintomas, mas ainda cerca de 8% dos pacientes apresentam IgM detectável já nos primeiros dias da doença. Por volta de duas semanas após, os níveis de IgM atingem o pico, e se mantém detectável

durante 2-3 meses (Nogueira et al., 1992; Guzman, 2010). Ainda na infecção primária, os anticorpos de classe IgG começam a aparecer a partir do quinto dia após o primeiro sintoma, seus níveis aumentam e pode ser detectado a partir da primeira semana de infecção e permanecem detectáveis por toda a vida (Innis et al., 1989; Shu & Huang, 2004; Guzman, 2010).

Já na infecção secundária, a IgM pode aparecer mais cedo, mas apresentam títulos mais baixos do que na infecção primária. O IgG aumenta rapidamente, podendo ser detectado na fase aguda da doença, apresentando alto nível de reação cruzada com diferentes sorotipos e outros flavivírus (Innis et al., 1989; Vaugh et al., 1997; Guzman, 2010; Zhang et al, 2015).

A detecção de anticorpos IgA presentes na saliva de indivíduos com infecção por DENV já foi avaliada, entretanto não são marcadores frequentemente utilizados no diagnóstico da doença (Andreis et al, 2016).

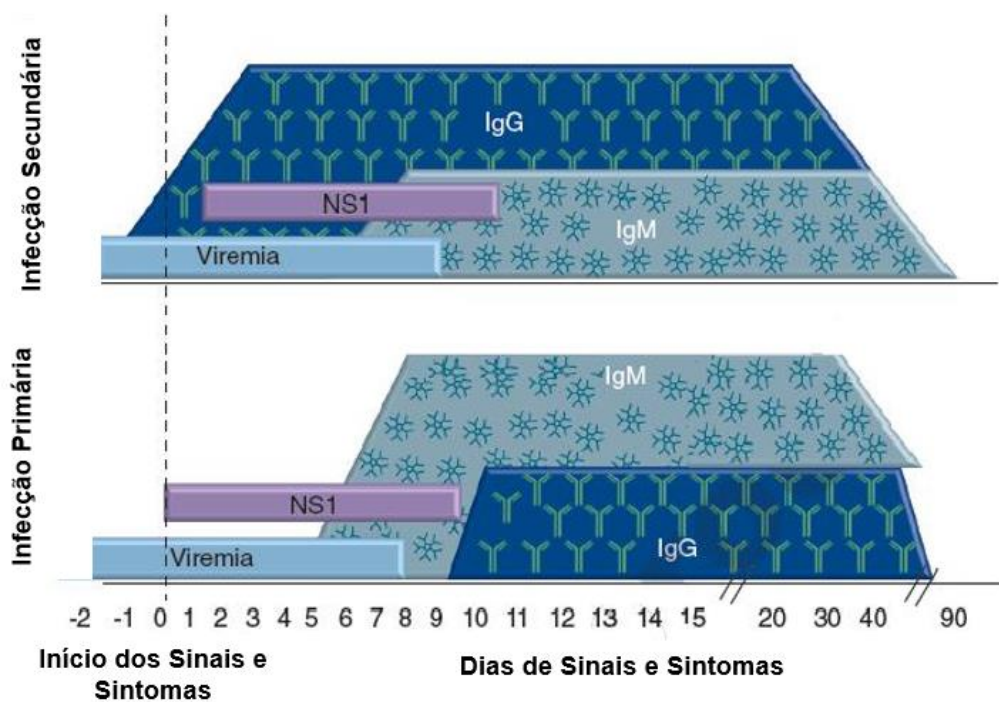


Figura 10: Cinética antígeno e anticorpo nas infecções por DENV (Adaptado de Lima et al., 2014).

## 1.7 Diagnóstico laboratorial das infecções por dengue

Estima-se que, para cada 1 indivíduo sintomático, 6 a 7 possam ser assintomáticos (Chen, 2005). Neste cenário, o diagnóstico da doença baseado exclusivamente em sintomas clínicos, pode ser comprometido pela presença destas infecções assintomáticas ou subclínicas, que podem variar de 0,7% a 87% dependendo da população estudada (Ooi et al., 2006; Bhatt et al., 2013; Chatchen et al., 2017).

Além disso, os sinais e sintomas das infecções por DENV podem, ainda, ser confundidos com os de outras doenças febris acompanhadas ou não de exantema, como as causadas pelo vírus *Epstein-Barr*, vírus do herpes tipo 6, parvovirus B19, rubéola, sarampo, leptospirose (Oliveira et al., 2008; Dircio et al., 2012) e principalmente, outras arboviroses emergentes, como febre amarela, zika e chikungunya (Muller et al., 2017), tornando o diagnóstico laboratorial diferencial necessário para a abordagem dos pacientes.

O diagnóstico laboratorial da dengue pode ser alcançado através do isolamento viral, detecção do vírus, detecção do antígeno viral e do ácido nucléico e pela sorologia para pesquisa de anticorpos específicos. Atualmente, os métodos mais utilizados para diagnóstico, na maioria dos laboratórios, são o isolamento viral, amplificação de ácido nucléico e detecção de anticorpos específicos, cada um com aplicabilidade associada às diferentes fases da doença (Shu & Huang, 2004; Lima et al., 2014; Chatchen et al., 2017; Muller et al., 2017).

A escolha do método para o diagnóstico laboratorial das infecções por DENV depende da fase clínica, do momento da coleta do material biológico, além dos padrões quantitativos prováveis e das vantagens e limitações de cada metodologia.

A pesquisa direta do vírus, na fase aguda da doença, pode ser utilizada para identificação precoce, concreta e identificação do sorotipo infectante e, tanto o vírus e componentes virais (RNA ou antígenos) podem ser encontrados no soro, plasma, sangue total e tecidos, durante o período de viremia (Shu & Huang, 2004; Kao et al., 2005; Simmons et al., 2015; Muller et al., 2017). No final da fase aguda, a sorologia é o método de escolha para o diagnóstico da infecção, e os testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e IgG, são os mais utilizados, por serem menos

custosos, mais acessíveis e disponíveis (WHO, 2009; Peeling et al., 2015; Muller et al., 2017).

### **1.7.1 Isolamento viral**

O isolamento viral dá evidência direta da infecção pelo vírus e por esse motivo é considerado “padrão ouro”, embora venha sendo gradualmente substituído pelo método molecular de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR). Aplica-se ao diagnóstico na fase aguda da doença, quando os anticorpos ainda não atingiram níveis detectáveis. Pode ser realizado com a inoculação em camundongos ou mosquitos e em cultura de células (Shu & Huang, 2004; Nisalak, 2015; Muller et al., 2017) e a tipagem do sorotipo infectante pode ser determinada pela técnica de imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais específicos (Igarashi, 1978; Peeling et al., 2010).

Apesar de poder ser propagado em diversas linhagens de células, de mosquitos ou mamíferos, o isolamento de DENV em linhagens celulares de mosquito, são as mais sensíveis do que as de mamíferos (Rosen & Gubler, 1974; Guzman, 1996). As linhagens celulares provenientes de mosquitos mais comumente utilizadas são a AP-61 de *Ae. pseudoscutellaris*, a C6/36 de *Ae. albopictus* e a TRA-284 da *Tx. amboinensis* (Igarashi, 1978; Kuno, 1982). No entanto, atualmente, as células C6/36 de *Ae. albopictus* são as mais utilizadas para isolamento viral rotineiro, em virtude da facilidade de manuseio e maior disponibilidade (Shu & Huang, 2004; Peeling et al., 2010. Muller et al., 2017).

### **1.7.2 Métodos moleculares para detecção do vírus**

O diagnóstico molecular é fundamental, pois também permite a identificação dos sorotipos virais circulantes e detecção precoce de um novo sorotipo, contribuindo de maneira importante para o sistema de vigilância epidemiológica da doença (Drosten et al, 2002; Jhonson et al., 2005). É um método de detecção mais sensível e mais rápido, quando comparado ao isolamento viral (Shu & Huang, 2014).

O RNA viral pode ser detectado em tecidos, sangue total ou soro de pacientes na fase aguda da doença e um resultado de PCR positivo é uma prova definitiva da infecção atual. Atualmente, os ensaios possuem sensibilidade de 80 a 90% e

especificidade em torno de 95%, e têm sido satisfatórios para o diagnóstico das infecções por DENV (CDC, 2017; Muller et al., 2017).

O protocolo mais utilizado, é o descrito por Lanciotti et al. (1992) sugerido pela OMS, que detecta os quatro sorotipos de DENV simultaneamente em um procedimento “*semi-nested*”, gerando produtos amplificados com tamanhos específicos em pares de base para cada sorotipo. Em uma primeira etapa, são utilizados oligonucleotídeos iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos de DENV, complementares as seqüências dos genes C e prM. No procedimento *nested*, são utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para DENV-1 a 4, respectivamente. Os produtos obtidos após a amplificação por RT-PCR são submetidos a eletroforese, em gel de agarose, para a diferenciação, pelo peso molecular, permitindo a visualização, através de moléculas intercalantes de DNA, como o brometo de etídeo, revelados em luz ultravioleta (Guzman et al., 2004; Chua et al., 2011).

No entanto, avanços no diagnóstico molecular também permitiram o desenvolvimento RT-PCR em tempo real, realizado em uma única etapa, capaz de fornecer medidas quantitativa e uma menor taxa de contaminação (Mackay et al., 2002; Muller et al., 2017).

A PCR em tempo real permite que a detecção dos fragmentos amplificados de forma simultânea à reação de amplificação e, o monitoramento da presença do amplicon em tempo real é possível graças à marcação de sondas, iniciadores ou do próprio produto de PCR com moléculas fluorogênicas (Mackay et al., 2002). Diversos protocolos utilizando essa abordagem para o diagnóstico ou para a quantificação do RNA de DENV já foram descritos (Callahan et al., 2001; Drosten et al., 2002; Johnson et al., 2005; Kong et al., 2006; Lai et al., 2007; Pok et al., 2010; Hue et al., 2011; Waggoner et al., 2013).

### **1.7.3 Sorologia**

O diagnóstico sorológico pode ser utilizado para detecção do antígeno viral, em fase aguda da doença, ou de anticorpos específicos e incluem o teste de fixação do complemento, western blot, ensaios de inibição de hemaglutinação (HI), teste de neutralização por redução de placas (PRNT) e testes imunoenzimáticos (ELISA).

Destes, a detecção de anticorpos (IgM e IgG) e de antígeno NS1, são os mais utilizados para o diagnóstico em laboratórios de rotina devido à facilidade de uso, quando comparados às técnicas de cultura de células ou de detecção de RNA viral (Shu & Huang, 2004; Kao et al., 2005; Zhang et al. 2015; Muller et al., 2017).

#### **1.7.3.1 Teste de Inibição de hemaglutinação**

O teste IH descrito por Clarke e Casals (1958) é considerado “padrão ouro” para a quantificação de anticorpos IgM e IgG anti-DENV, permitindo a caracterização do tipo de infecção em primária ou secundária. O aparecimento, aumento ou diminuição de quatro vezes no título de anticorpos anti-DENV entre amostras pareadas de um mesmo paciente, confirma a soroconversão sorológica e, portanto, a infecção. No entanto, esse método é trabalhoso e necessita de coletas pareadas para uma correta interpretação dos resultados (Nogueira & dos Santos, 2015).

#### **1.7.3.2 Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRNT)**

O PRNT é considerado “padrão ouro” e a ferramenta mais específica para a determinação de imunidade sorotipo específica para DENV (Calisher et al., 1989), sendo o teste recomendado pela OMS para os estudos de eficácia das vacinas em desenvolvimento (Hombach & Barrett, 2008). No entanto, diante das características laboriosas desses testes, atualmente, na grande maioria dos casos, sua utilização está restrita a poucos laboratórios (Chatchen, 2017).

#### **1.7.3.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

A resposta imune induzida pela infecção por DENV depende da produção de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgA), principalmente específicas para a proteína E.

Dentre os testes sorológicos, o ELISA de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA), tem sido, o método eleito para o diagnóstico das infecções por DENV (Innis, 1989, Nogueira et al., 1993; Kao et al., 2005). O teste baseia-se na detecção de anticorpos IgM específicos para DENV no soro, capturados por anticorpos anti-IgM aderidos a uma fase sólida. É um método rápido, fácil de ser executado e tem se

mostrado extremamente útil, tanto para o diagnóstico individual da dengue como para estudos epidemiológicos (Guzmán & Kouri, 2004).

O ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA) também pode ser utilizado para classificar o tipo de infecção em primária ou secundária, de acordo com os títulos obtidos no teste em relação aos dias de doença, e foi desenvolvido em substituição ao teste de HI (Miagostovich et al, 1999).

#### **1.7.3.3.1 Captura do antígeno NS1**

A proteína NS1, está ausente na partícula viral, porém, além de produzida associada à membrana, também é produzida na forma secretada (Young et al., 2000; Alcon et al., 2002; Libraty et al., 2002). Baseando-se nesta característica, ensaios imunoenzimáticos para a detecção específica deste antígeno foram desenvolvidos e avaliados para a confirmação de casos agudos primários e secundários de dengue, logo após o início dos sintomas e até o novo dia de doença (Kumarasamy et al., 2007; Lapphra et al., 2008; Phuong et al., 2009; Lima et al., 2010; 2014; Muller et al., 2017).

Além do formato em ELISA, testes imunocromatográficos rápidos também foram desenvolvidos e encontram-se comercialmente disponíveis (Peeling et al., 2010; Hunsperger et al., 2014). No Brasil, o Ministério da Saúde disponibiliza testes de NS1 ELISA para triagem das amostras para isolamento viral em unidades sentinelas (SVS/MS, 2010).

### **1.8 Prevenção e Controle**

As opções de controle e prevenção da dengue são ainda limitadas e continuam sendo uma problemática em todo mundo. Baseiam-se na vigilância epidemiológica para um bom planejamento e resposta, redução da doença e mudança de conduta para melhorar o controle do vetor. Contudo, com o crescimento populacional, descontrole da urbanização e características particulares do vetor, os esforços para programas comunitários não têm sido eficazes (Machado et al., 2009; Gubler, 2011; Maciel-de-Freitas, 2012).

A OMS estabeleceu, então, uma estratégia global para controle da doença, que começou a ser implementada desde 2012, para obtenção de resultados satisfatórios



em 2020 e que requer harmonizar a prevenção, gestão de casos e as vigilâncias entomológica e epidemiológica (WHO, 2012).

Atualmente, a estratégia mais utilizada para o controle vetorial continua sendo o tratamento químico com a utilização de inseticidas nas casas. No entanto, devido às desvantagens de uma manipulação química, outras estratégias têm sido estudadas. Uma delas, é o controle biológico com a utilização de predadores naturais ou patógenos contra os mosquitos (McGrall & O'Neil, 2013).

Estudos mais promissores têm demonstrado o uso de *Wolbachia*, uma bactéria intracelular que vive naturalmente em alguns insetos e que é transmitida da fêmea para prole, afetando a reprodução. A *Wolbachia* wMelPop possui esta característica e, atualmente, tem sido utilizada em estudos de controle vetorial (Hoffmann et al., 2011; Macgrall & O'Neil, 2013; Schmidt, 2017).

A Secretaria de Saúde do RJ, adotou em 2013, o uso do peixe *Poecilia reticulata*, também conhecido como barrigudinho para o controle vetorial em criadouros, uma vez que estes evitam o desenvolvimento das larvas do mosquito, se alimentando de matéria orgânica (Portal Brasil, 2016).

### **1.8.1 Vacinas**

O desenvolvimento de uma vacina tornou-se prioritário, devido às dificuldades para o controle do mosquito vetor e o crescente número de casos de dengue no mundo. Porém, a existência de quatro sorotipos e a falta de um modelo animal que reproduza a doença, têm sido fatores limitantes o desenvolvimento de uma vacina eficaz (Beaumier et al., 2013).

Diversas abordagens para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, estão sendo utilizadas, como as vacinas de vírus vivo atenuado, de vírus inativados, vacinas recombinantes, quiméricas e de DNA (Clements et al., 2010; Schmitz et al., 2011; Coller et al., 2011; Osorio et al., 2015; Kirkpatrick et al., 2015; Sreaton et al., 2016; Guy et al., 2016).

Até fevereiro de 2017, a vacina Dengvaxia® ou CYD-TDV da Sanofi Pasteur, já havia sido licenciada para uso em 14 países endêmicos (Costa-Rica, El Salvador, Guatemala, México, Peru, Bolívia, Paraguai, Venezuela, Indonésia, Filipinas, Cingapura, Tailândia, Cambodia e Brasil) e para aplicação em indivíduos entre 9 e

45 anos. É uma vacina recombinante quimérica tetravalente atenuada, expressando os genes prM e E de cada um dos quatro sorotipos de DENV, inseridos no vírus vacinal de febre amarela (Guy et al., 2010).

Em estudos no Sudeste da Ásia com aproximadamente 10 mil crianças de 2 à 14 anos e na América Latina, com aproximadamente 21 mil crianças de 9 à 16 anos a eficácia, em ambos cenários, foi de 60% contra a doença sintomática. Na América Latina, a eficácia sorotipo-específica foi de 50,3% para DENV-1, 42,3% para DENV-2, 74% para DENV-3 e 77,7% para DENV-4. Na Ásia, a eficácia global foi de 56,5%, com seu maior impacto na prevenção na evolução de quadros mais graves e hospitalização (Dayan et al., 2013; Capending et al., 2014; Villar et al., 2015; Ferguson et al., 2016; Torresi et al., 2017). No entanto, um estudo de “follow-up” com 35 mil crianças nesta mesma faixa etária destas mesmas regiões, reportou um aumento inesperado na incidência de hospitalizações por dengue grave (Hadinegoro et al., 2016), indicando que novas avaliações relacionadas à esta vacina, ainda se fazem necessárias (Liu et al., 2016; Torresi et al., 2017).

## 2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, DENV-4 reemergiu em 2010 em Boa Vista, Roraima, 28 anos após o primeiro isolamento na mesma localidade (Temporão et al., 2010). No Rio de Janeiro, DENV-4 foi isolado em residentes em Niterói no ano de 2011 (Nogueira & Eppinhaus, 2011) e as atividades de monitoramento da circulação de DENV em 2011 e 2012 demonstram uma maior proporção de isolamento de DENV-4 no RJ e no país (SVS/MS, 2013). Além disso, um estudo realizado por Nunes et al. (2012), já confirmou a co-circulação de dois genótipos distintos de DENV-4 no Brasil.

O estado do RJ tem sido de grande importância epidemiológica para a introdução e a dispersão de DENV e, nos últimos 30 anos, foi marcado por extensas epidemias. A vigilância virológica visa detectar e monitorar a circulação dos sorotipos de DENV no estado, onde já co-circulam DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A dispersão de DENV no RJ e no território brasileiro, com o aumento nas notificações de casos de dengue, dengue grave e óbitos, ressalta a importância da vigilância destes agentes no país.

A presença dos quatro sorotipos virais durante uma epidemia em áreas densamente populosas no Brasil é preocupante e já foi descrita em países asiáticos, com consequente estabelecimento de regiões hiperendêmicas (Chakravarti et al., 2012). De fato, a detecção dos quatro sorotipos de DENV sugere hiperendemicidade em centros urbanos no Brasil (Villabona-Arenas et al., 2014).

Diante de uma situação hiperendêmica, uma mudança no padrão epidemiológico é esperada e crianças menores de 16 anos irão apresentar um maior risco de infecção por DENV (Innis, 1995). No Brasil, esta mudança na faixa etária pode ser explicada, em parte, pela imunidade adquirida pelos adultos aos múltiplos sorotipos do vírus (Rodriguez-Barraquer et al., 2011) e, desta forma, as infecções por dengue em crianças tem um potencial maior de resultar em hospitalizações e óbitos (Villabona-Arenas et al., 2014) e já foi reportada durante a emergência de DENV-2 em 2007-2008 (Teixeira et al., 2008; Rodriguez-Barraquer et al., 2011).

O monitoramento de DENV através de um programa de vigilância ativo que considera os aspectos clínicos, epidemiológicos, virológicos e laboratoriais, principalmente em períodos inter-epidêmicos, pode permitir a detecção da circulação viral em período hábil para que sejam evitadas extensas epidemias (Gubler, 1989).

Neste contexto, ficou demonstrado que o diagnóstico laboratorial possui um papel fundamental no Sistema de Vigilância Epidemiológica, através do monitoramento contínuo das infecções.

O Laboratório de Flavivirus (LABFLA) IOC/ FIOCRUZ, estabelecido desde 1986 como Centro de Referência Regional de Dengue e Febre Amarela, recebe continuamente amostras biológicas de casos suspeitos de dengue durante períodos epidêmicos e inter-epidêmicos e tem demonstrado que a introdução e emergência dos sorotipos podem impactar as populações atingidas (Schatzmayr et al., 1986; Nogueira et al., 1993, 2002; 2005; PAHO, 2008; SVS, 2009).

Com a introdução do novo sorotipo, e devido à susceptibilidade dos indivíduos, gerou-se no país um risco de ocorrência de novas epidemias causadas pelo DENV-4. Neste contexto, estudos sobre esse sorotipo são de grande relevância para uma melhor compreensão do impacto deste sobre a população, na ocorrência de casos graves e fatais e na sensibilidade do diagnóstico laboratorial. Estudos filogenéticos podem revelar a origem geográfica dos vírus e determinantes moleculares de virulência em potencial. Dado que a introdução ou re-emergência de novos sorotipos/genótipos pode acarretar na ocorrência de epidemias, estudos filogenéticos e evolutivos são de grande relevância para avaliar o impacto na população. Portanto, neste estudo visamos investigar os aspectos epidemiológicos, laboratoriais, clínicos e genéticos de DENV-4, desde a sua emergência à sua endemicidade no estado do RJ.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Descrever aspectos epidemiológicos, laboratoriais, clínicos e virais do DENV-4, desde a sua emergência à sua endemicidade no estado do Rio de Janeiro.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Descrever a emergência de DENV-4 no RJ durante a co-circulação com os demais sorotipos de DENV entre 2010 e 2012;
- Estabelecer uma estratégia para o aperfeiçoamento da sensibilidade do teste de captura de NS1 para o diagnóstico precoce de DENV-4;
- Avaliar a sensibilidade do teste de captura de NS1 para o diagnóstico precoce de DENV-4 em um estudo prospectivo realizado no RJ;
- Descrever as alterações clínicas e laboratoriais de casos de DENV-4 em comparação à casos de DENV-2 relacionadas à gravidade da doença;
- Analisar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de casos confirmados de DENV-4 após a sua introdução em área endêmica do RJ;
- Identificar os genótipos de cepas de DENV-4 isoladas no RJ no período estudado.

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente tese, serão apresentados sob a forma de artigos científicos publicados em revistas científicas indexadas, conforme a seguir:

**4.1 Artigo 1:** Impact of the emergence and re-emergence of different dengue viruses' serotypes in Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012. (Publicado em *Trans R Soc Trop Med Hyg* 109(4):268-74, 2015. doi: 10.1093/trstmh/trv006).

**4.2 Artigo 2:** A simple heat dissociation method significantly increases the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in dengue type-4 virus infected patients (Publicado em *J Virol Methods* 204:105-8, 2014. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.031).

**4.3 Artigo 3:** Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute dengue 4 cases (Publicado em *BMC Infect Dis* 17: 204, 2017. doi: [10.1186/s12879-017-2306-z](https://doi.org/10.1186/s12879-017-2306-z)).

**4.4 Artigo 4:** Analysis of Clinical and Laboratory Alterations Related to Dengue Case Severity: Comparison between Serotypes 2 and 4 in Brazil (Publicado em *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2017. doi: [10.4269/ajtmh.16-0227](https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0227)).

**4.5 Artigo 5:** Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: case characterization following its introduction in an endemic region (Publicado em *BMC Infectious Diseases* 17:410, 2017. doi: 10.1186/s12879-017-2488-4).

## **Artigo 1: Impact of the emergence and re-emergence of different dengue viruses serotypes in Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012.**

- **Objetivo específico:** Descrever a emergência de DENV-4 no RJ durante a co-circulação com os demais sorotipos de DENV entre 2010 e 2012.

**Situação do Manuscrito:** Artigo publicado na revista *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

**Classificação Qualis:** Área de Medicina II - B1.

**Referência:** Manoela Heringer, Rita Maria R. Nogueira, Ana Maria B. de Filippis, Monique R. Q. Lima, Nieli R. C. Faria, Priscila C. G. Nunes, Fernanda B. Nogueira e Flávia B. dos Santos.

**Resumo:** O estado do Rio de Janeiro (RJ) tem sido de grande importância para a epidemiologia dos vírus dengue (DENV) no Brasil. Após as introduções de DENV 1-4 em 1986, 1990, 2000 e 2011, respectivamente, o estado sofreu epidemias explosivas. Pretendemos descrever os aspectos laboratoriais, epidemiológicos e clínicos, durante a emergência e re-emergência de distintos sorotipos de DENV em um período de 2 anos. Neste estudo, casos suspeitos de dengue (n = 2833), incluindo 190 casos fatais, foram submetidos ao isolamento viral, RT-PCR e ELISA de captura de antígeno NS1, captura de anticorpos IgM (MAC) -ELISA e IgG-ELISA. A confirmação de caso foi de 47,5%. O MAC-ELISA confirmou 32,6% dos casos, a RT-PCR confirmou 56,3%, DENV foi recuperado em 33,1% das amostras inoculadas e NS1 ELISA confirmou 27,5% dos casos. DENV-2 prevaleceu em 2010, DENV-1 em 2011 e DENV-4 em 2012, após sua introdução em 2011. Indivíduos infectados por DENV-3 e maiores de 65 anos e crianças menores de 15 anos e infectadas por DENV-2, tiveram significativamente, um maior risco de desenvolver uma doença grave. Os casos fatais confirmados (n = 67) foram devidos a DENV-1 (26,8%), DENV-2 (14,9%), DENV-3 (2,9%) e DENV-4 (7,4%). Nosso estudo demonstrou que, as emergências ou re-emergências de sorotipos virais distintos, podem desempenhar papéis diferentes na epidemiologia da doença, especialmente quando muitos sorotipos co-circulam.



## Impact of the emergence and re-emergence of different dengue viruses' serotypes in Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012

Manoela Heringer, Rita Maria R. Nogueira, Ana Maria B. de Filippis, Monique R. Q. Lima, Nieli R. C. Faria, Priscila C. G. Nunes, Fernanda B. Nogueira and Flávia B. dos Santos\*

Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21045-360, Brazil

\*Corresponding author: Tel: +55 21 2562 1920; Fax: +55(21) 2562 1779; E-mail: flaviab@ioc.fiocruz.br

Received 25 September 2014; revised 30 December 2014; accepted 30 December 2014

**Background:** Rio de Janeiro (RJ) has been of major importance for the epidemiology of dengue viruses (DENVs) in Brazil. After the DENV 1–4 introductions in 1986, 1990, 2000 and 2011, respectively, the state has suffered explosive epidemics. We aimed to describe laboratorial, epidemiological and clinical aspects due to the emergence and re-emergence of distinct DENV in a 2-year period.

**Methods:** Suspected dengue cases (n=2833), including 190 fatal cases, were submitted to virus isolation, RT-PCR and non-structural 1 (NS1) antigen capture ELISA, IgM antibody-capture (MAC)-ELISA and IgG-ELISA.

**Results:** Case confirmation was 47.5%. MAC-ELISA confirmed 32.6% of the cases, RT-PCR confirmed 56.3%; DENV was recovered in 33.1% of samples inoculated and NS1 ELISA confirmed 27.5% of the cases. DENV-2 was prevalent in 2010, DENV-1 in 2011 and DENV-4 in 2012. Individuals infected by DENV-3 and over 65 years-old, and children 15 years-old and under infected by DENV-2 had a significantly higher risk of developing a severe disease. Fatal cases confirmed (n=67) were due to DENV-1 (26.8%), DENV-2 (14.9%), DENV-3 (2.9%) and DENV-4 (7.4%).

**Conclusions:** It has been shown here that viral emergences or re-emergences may play different roles in the disease epidemiology, especially when many serotypes co-circulate.

**Keywords:** Brazil, Dengue, Fatal cases, Laboratorial diagnosis, Surveillance

### Introduction

Dengue viruses (DENV 1–4) belong to the family *Flaviviridae* and the genus *Flavivirus*.<sup>1</sup> WHO estimates that between 70 and 500 million people are infected with DENV annually worldwide.<sup>2</sup> In Brazil, reinfestation by vectors in the 1970s led to epidemics in 1981–1982 in Boa Vista, Roraima.<sup>3</sup> In 1986, dengue became a public health problem in the country, when the DENV-1 was identified in the serum of patients in an epidemic in the state of Rio de Janeiro (RJ).<sup>4</sup> The introduction of DENV-2 in 1990, also in the state of RJ,<sup>5</sup> led to an increase in the disease severity and the first dengue hemorrhagic fever (DHF) cases were reported in the country.<sup>6</sup> The introduction of DENV-3 occurred in the municipality of Nova Iguaçu, RJ and the emergence of this new serotype caused one of the most severe epidemics reported in the country.<sup>7,8</sup> In 2007–2008, the country experienced the most severe epidemic in terms of morbidity and mortality and severe cases in children due to the re-emergence of DENV-2. A total of 255 818 cases were reported in RJ.<sup>9–11</sup> In 2009, DENV-1 re-emerged in the south-east region of the country and it was this serotype detected in

50.4% of the viral isolations, displacing DENV-2 and DENV-3.<sup>12</sup> In July 2010, DENV-4 was isolated in Roraima,<sup>13</sup> 28 years after its first detection in that same state and soon this serotype spread to other states, including RJ.<sup>14</sup> Despite the epidemic caused by DENV-1, DENV-4 could be isolated during the disease surveillance supported by the laboratorial diagnosis performed.

Dengue has become a major public health problem in RJ due to many factors such as the human host susceptibility, virus emergences, re-emergences and serotype shifts, vector abundance and environmental factors. Since the establishment of dengue activity in Brazil, the laboratorial diagnosis has proven to be imperative for disease surveillance and in many occasions playing a role as an early warning tool. The existence of an ongoing program of virological surveillance aims to detect and monitor the activity of DENV serotypes in the state, where the four serotypes co-circulate.

This study aimed to evaluate the epidemiological, laboratorial and clinical impact of the emergence and re-emergence of different DENV serotypes in the state of RJ, from suspected dengue cases received by the Laboratory of Flavivirus-Regional Reference



Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ at RJ from 2010 to 2012.

## Materials and methods

### Dengue suspected cases

The specimens analyzed in this study comprised the period of January 2010 to December 2012. Dengue suspected case samples ( $n=2833$ ) were received during a Surveillance Program performed by the Laboratory of Flavivirus, IOC/FIOCRUZ, Regional Reference Laboratory for the Brazilian Ministry of Health, located in RJ. Acute serum samples (up to the 7th day after the onset of the symptoms) stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  were submitted to virus isolation, RT-PCR and NS1 antigen capture ELISA. Convalescent samples (more than 7 days after the onset of the symptoms) stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  were tested by MAC-ELISA and IgG-ELISA.

### Dengue cases classification

Dengue cases were classified as dengue (cases with or without warning signs) and severe dengue, according to the WHO classification,<sup>15</sup> with modifications due to the lack of information in some cases. The clinical manifestations described in the epidemiological records from each patient were analyzed and positive dengue cases presenting fever with one or more of the following symptoms: hemorrhagic manifestations, central nervous system involvement, shock and transaminases alterations, were considered as severe dengue cases in this study.

### Virus isolation

Virus isolation was performed by inoculation into C6/36 *Aedes albopictus* cell line<sup>16</sup> and isolates were identified by indirect fluorescent antibody test (IFAT) using serotype-specific monoclonal antibodies.<sup>17</sup>

### Serological diagnostics

MAC-ELISA: The Panbio dengue IgM Capture ELISA (E-DEN01M) was used for the qualitative detection of anti-DENV IgM antibodies in serum for case confirmation according to the manufacturer's instructions.

IgG antibody detection ELISA (IgG-ELISA): The IgG-ELISA previously described was performed for the characterization of dengue immune response as primary or secondary infections,<sup>18</sup> in dengue cases previously confirmed by virus isolation, RT-PCR and/or MAC-ELISA.

NS1 antigen capture ELISA: For the NS1 antigen capture, the Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA kit (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) was used according to the manufacturer's protocol.

### Molecular Methods

Viral RNA extraction: Viral RNA was extracted from sera using QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for DENV typing.

RT-PCR for detecting and typing DENV was performed as described previously.<sup>19</sup>

Statistical analysis: The  $\chi^2$  and/or Fisher exact tests were used to assess the significance by using Epi Info 7.0.9.34 (CDC, Atlanta, GA, USA).

## Results

The highest percentage of the 2833 cases analyzed in this study were from the metropolitan region of RJ (67.2%), and the counties most affected by DENV activity in 2010–2012 were RJ and Niterói, followed by Campos dos Goytacazes located in the north region of the state.

Dengue was confirmed in 47.5% (1323/2833) of the cases analyzed considering any method used for diagnosis. By RT-PCR, 56.3% (1022/1814) of the cases were confirmed; viral isolation confirmed 33.1% (520/1569) of the cases inoculated, MAC-ELISA confirmed 32.6% (376/1153) and NS1-ELISA 27.5% (547/1989). DENV 1–4 were identified by virus isolation and/or RT-PCR in 362 (27.3%), 238 (17.9%), 11 (0.83%) and 423 (31.9%) cases, respectively, out of the 752 samples tested.

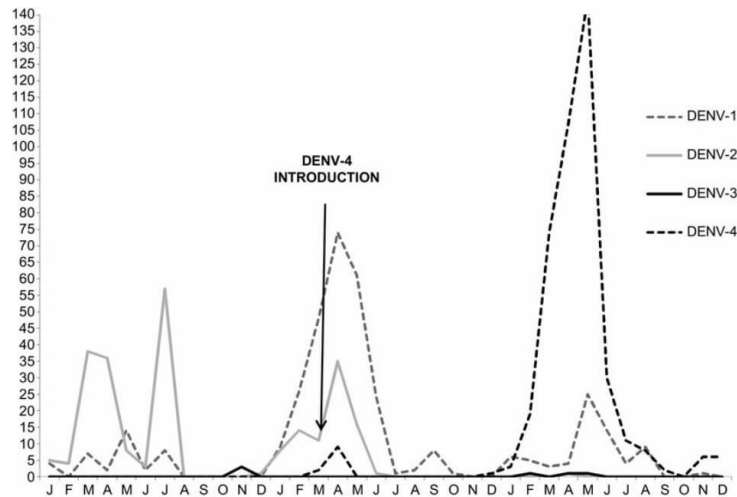
In 2010, DENV-2 was the prevalent serotype identified (153/216, 70.8%), however, in 2011 DENV-1 re-emerged and became the serotype responsible for most cases confirmed (253/514, 49.2%). In April of that same year, the first DENV-4 isolations were reported in the state, from cases occurring in the city of Niterói, located in the Metropolitan Region. The introduction of DENV-4 in 2011 in RJ resulted in the emergence of this serotype in 2012; it was responsible for 67.9% (411/605) of dengue confirmed cases and, for the first time, the co-circulation of the four serotypes was reported in the state (Figure 1).

A significant increase ( $p<0.05$ ) was observed in children under 15 years-old among the dengue suspected cases as well as in the confirmed cases (131/247, 52.9%), mainly from 2010 to 2011. An increased case confirmation was also reported in the age group over 65 years ( $p<0.001$ ) from 2011 to 2012 (Table 1).

Overall, dengue classification was performed in 1265 confirmed cases: 6.9% (88) were characterized as severe dengue and 93.1% (1177) as dengue fever. There were fewer severe dengue cases observed among young adults, regardless of the year analyzed. However, a higher number of severe cases among children under 15 years-old was observed in 2010, and in 2011 in the age group over 55 years (Figure 2).

A relationship between the disease severity and type of infection (primary or secondary) was shown (Table 2). Individuals infected by DENV-3 and over 64 years-old had a significantly higher risk of developing severe disease. Furthermore, children 15 years-old and under also had a higher risk for severe disease among patients infected with DENV-2 ( $p<0.05$ , Table 3).

During the study, the fatal cases of confirmed dengue ( $n=67$ ) were due to DENV-1 in 26.8% (18) of the cases, to DENV-2 in 14.9% (10), to DENV-3 in 2.9% (2) and to DENV-4 in 7.4% (5). Moreover, fatal cases were more frequently observed in children 15 years and under in 2010 and 2011 (Table 4). Immune response characterization was possible in 67.1% (45/67) fatal cases and 40.0% (18) were due to primary infections and 60% (27) due to secondary ones. In the 18 fatal cases due to DENV-1, eight were



**Figure 1.** Monthly distribution of dengue viruses serotypes detected by viral isolation and/or RT-PCR in the State of Rio de Janeiro, Brazil, from 2010 to 2012.

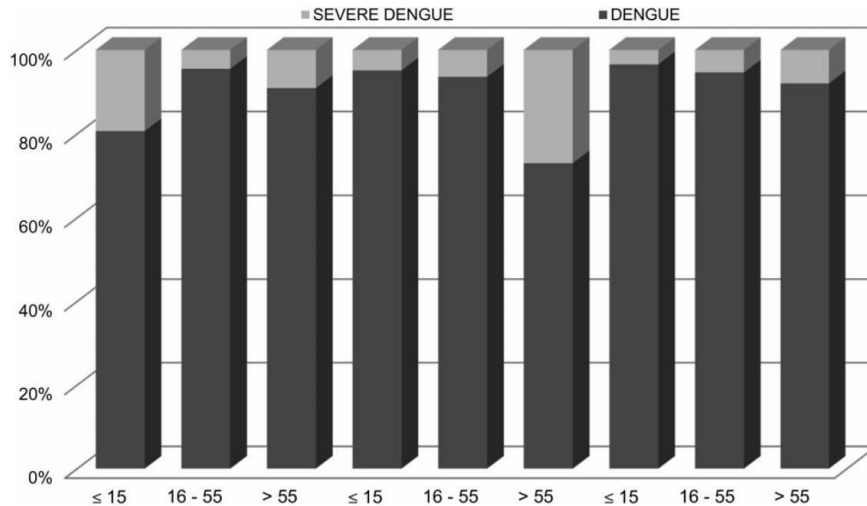
**Table 1.** Age distribution of dengue suspected cases analyzed and confirmed by any methodology used in the laboratory, Rio de Janeiro, Brazil, 2010–2012

Age group (years)	2010		2011		2012	
	Positive cases/Total analyzed (%)					
0–5	6/24	(25)	29/87	(33.3)	21/58	(36.2)
6–10	10/30	(33.3)	53/84	(63.9)	30/55	(54.5)
10–15	15/32	(26.8)	49/76	(64.4)	69/117	(58.9)
16–20	13/33	(39.3)	49/105	(46.6)	51/98	(52.0)
21–25	18/35	(51.4)	53/111	(47.7)	58/122	(47.5)
26–30	11/32	(34.3)	46/104	(44.2)	57/121	(47.1)
31–35	13/39	(33.3)	37/87	(42.5)	46/107	(42.9)
36–40	11/27	(40.7)	25/81	(30.8)	59/110	(53.6)
41–45	10/33	(60.6)	35/79	(44.3)	44/90	(48.8)
46–50	26/36	(55.5)	35/66	(53.0)	44/87	(50.5)
51–55	15/31	(48.3)	34/65	(52.3)	31/60	(51.6)
56–60	8/21	(38.0)	14/35	(40.0)	32/57	(56.1)
61–65	8/18	(44.4)	13/26	(50.0)	18/37	(48.6)
>65	6/21	(28.5)	10/24	(41.6)	27/52	(51.9)
Total	174/412	(42.2)	482/1030	(46.7)	587/1111	(52.8)

from primary infections and six from secondary ones. In nine fatal DENV-2 cases, three were characterized as the primary infection and six as secondary. Fatal cases of DENV-3 and DENV-4 (one each) were due to secondary infections. In 19 cases (42.2%), the infecting serotype identification was not possible, but the immune response was characterized as secondary infection in 13 of those.

### Discussion

The Laboratory of Flavivirus at the Oswaldo Cruz Institute, as a Regional Reference Laboratory for Dengue Diagnosis for the Brazilian Ministry of Health, has supported the dengue surveillance program in the state of RJ, since the first dengue case confirmation in April 1986, when DENV-1 was first isolated during an



**Figure 2.** Yearly distribution of dengue and severe dengue cases by age group and year of occurrence, Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012.

**Table 2.** Analysis of factors associated to dengue cases severity in Rio de Janeiro, Brazil from 2010–2012

Factors	Dengue		Severe dengue		p-value	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
<b>Age group (years)</b>						
≤15	261	91.3	25	8.7	NS	0.77 (0.47–1.26)
>15–64	839	94.2	52	5.8		
≥65	45	84.5	7	13.5	0.02	2.51 (0.98–6.15)
<b>Serotype</b>						
DENV-1	339	95.0	18	5.0	NS	1.96 (0.87–4.50)
DENV-2	196	94.7	11	5.3	NS	2.07 (0.82–5.23)
DENV-3	6	75.0	2	25.0	0.02	12.3 (1.52–80.98)
DENV-4	406	97.4	11	2.6	NS	0.77 (0.47–1.26)
<b>Type of infection</b>						
Primary	19	79.2	5	20.8		
Secondary	14	32.6	29	67.4	<0.001	7.87 (2.15–30.50)

NS: not significant.

outbreak of exanthematic disease in the city of Nova Iguaçu.<sup>4,20</sup> Since then, RJ has been important to the epidemiology of dengue, with the introduction of DENV-2 in 1990<sup>5</sup> and DENV-3 in 2000.<sup>7,8</sup>

Despite the introduction of DENV-4 in Roraima in 2010 and its subsequent spread to other states of the country, DENV-1 was the most prevalent serotype and responsible for epidemics with more than 2 million cases reported in Brazil in 2010 and 2011. However, in RJ, 2010 was characterized by low activity compared to subsequent years, with 29 824 notifications. In 2011, the number of cases increased by over 100% (76 404 cases) and in 2012, an

increase of over 200% compared to 2010, was observed with 184 123 cases reported.<sup>21</sup> As observed in other biennia epidemics, most cases occurred in the first months of the year, during the warmer and rainy season.

In 2010, dengue suspected cases received by the Laboratory of Flavivirus, IOC/FIOCRUZ constituted 1.6% of reported cases in the state. In 2011 and 2012, 1.4% and 0.6% of the reported cases in the state of RJ, respectively, were analyzed in the laboratory and this sampling reflected the characteristics of the epidemics.

**Table 3.** Age and infecting serotype paired analysis and its association to the disease severity in cases studied in Rio de Janeiro, Brazil, 2010–2012

Age group (years)/infecting serotype	Dengue		Severe dengue		OR	(95% CI)	p value
	n	%	n	%			
≤15							
DENV-1	79	93.0	6	7.0	2.08	0.44–10.0	NS
DENV-2	32	86.5	5	13.5	4.27	0.82–24.2	0.04
DENV-3	1	100	NA	NA	NA	NA	NA
DENV-4	82	96.5	3	3.5	NA	NA	NA
16–65							
DENV-1	230	96.2	9	3.8	1.05	0.52–4.33	NS
DENV-2	153	96.8	5	3.2	1.06	0.38–3.21	NS
DENV-3	5	83.3	2	16.7	15.30	1.74–114.1	<0.01
DENV-4	306	98.0	8	2.0	NA	NA	NA
>65							
DENV-1	12	85.7	2	14.3	0.38	0.03–4.32	NS
DENV-2	5	100	NA	NA	NA	NA	NA
DENV-4	15	100	NA	NA	NA	NA	NA

NA: not available; NS: not significant.

**Table 4.** Age and dengue infecting serotype distribution in fatal cases occurring from 2010 to 2012 in the state of Rio de Janeiro, Brazil

	2010	2011	2012
	Confirmed deaths/deaths analysed (%)		
Age group (years)			
≤15	6/18 (33.3)	10/14 (71.4)	3/12 (25)
16–65	6/33 (18.1)	17/38 (44.7)	14/45 (31.1)
>65	1/5 (20.0)	3/5 (60.0)	2/20 (10.0)
Serotype	Deaths with serotype identified (%)		
DENV-1	3/14 (21.4)	15/33 (45.4)	NI
DENV-2	6/14 (42.8)	3/33 (9.0)	1 (5.0)
DENV-3	NI	1 (3.0)	1 (5.0)
DENV-4	NI	NI	5 (25.0)

NI: not identified.

The metropolitan area was responsible for most cases occurring during the studied period, mainly in the municipalities of RJ and Niterói. This region has a high population density and high-traffic, which partly explains the concentration of the cases studied.<sup>22</sup>

Almost half of the suspected dengue cases analyzed in this study (47.5%; 1323/2833) were confirmed by using any of the methods performed in the laboratory for dengue diagnosis. There was a significant increase ( $p < 0.001$ ) in the rate of confirmation of these cases during the study period, mainly in the municipalities of RJ and Niterói, accompanying the increase in notifications during the whole period in the state. In 2011, the

number of cases in the state accounted for 21.6% of the number of notified cases in the country.

In a retrospective study, confirmation of dengue cases by the Laboratory of Flavivirus, IOC/FIOCRUZ over a period of 25 years, using any of the methods available, was 33.8%.<sup>23</sup>

Serological methods are still the most useful tool for the diagnosis of the disease during epidemics, as observed since its establishment in 1986 in RJ. In that year, 68.7% of cases tested by MAC-ELISA were confirmed.<sup>24</sup> In this study, 32.6% were confirmed between 2010 and 2012. In the study by Macedo et al. performed in suspected cases occurring between 2004 and 2008, the test confirmed 23% of the cases analyzed.<sup>25</sup>

In 33.1% of the cases analyzed this study, the four DENV serotypes were identified by virus isolation using mosquito cell cultures. In 1986/1987 when the first DENV-1 outbreak in virgin soil was characterized, the percentage of virus isolation was 41.2%. The co-circulation of this serotype with DENV-2 in 1990/1991 was identified by virus isolation in 16.7% of the cases tested. In 1995/1996 and 1998, DENV-1 and DENV-2 were the serotype isolated in 9.8% and 18.4% of the patients, respectively.<sup>26</sup>

Between 2004 and 2006, the low activity of DENV was characterized by the low percentage of viral isolation (from 0.35 to 1.1%). However, the re-emergence of DENV-2 resulted in a higher percentage of viral isolation in 2007 and 2008 (5.7% and 10%, respectively).<sup>25</sup> Despite the emergence of DENV-1 in 2009, this study demonstrated that DENV-2 was still the prevalent serotype isolated in 70.8% of the cases tested in 2010. The re-emergence of DENV-1 was evident in 2011, when this serotype was responsible for 49.2% of confirmed cases.

The introduction of DENV-4 in the state of Roraima in 2010 warned of the possibility of a new outbreak of dengue in Brazil.<sup>13</sup> In 2011, the first isolation of DENV-4 in RJ, from cases that occurred in the city of Niterói resulted in the emergence of this serotype in the state in 2012, characterized by isolation of this serotype in 69.3% of confirmed cases. That same year, the co-circulation of the four DENV serotypes was reported for the first time in the state.

Although the virus isolation method is considered the gold standard for diagnosis of dengue fever, the sensitivity of molecular detection of the viral genome offers a great advantage in epidemic periods, as shown by the results presented here. It allowed the viral detection in 56.3% of cases tested in the period, with 91.0% (183/201) of case confirmation in 2010. However, it is noteworthy that the high positivity rate obtained in this study may be the result of the selection criteria of the samples currently adopted in LABFLA/IOC, FIOCRUZ for performing RT-PCR, which includes the samples testing in the acute febrile phase (up to the 5th day of symptoms) and in many cases, previously screened and positive for NS1 antigen. However, previous studies have demonstrated the usefulness of RT-PCR in confirming cases and identifying the infecting serotype when virus isolation was not possible.<sup>25,27,28</sup>

The NS1 antigen capture test is a more recently developed serological method which enables the early diagnosis of DENV infections, during the initial stage of the disease, even in laboratories with limited human resources and equipment.<sup>29</sup> The hexameric form of the NS1 protein is highly conserved in the four serotypes and found circulating in the serum of patients from the first to ninth day after the onset of fever.<sup>30–32</sup> In the Laboratory at FIOCRUZ, this test was first introduced in 2007 and evaluated as an alternative diagnostic method presenting a sensitivity of 89.6% in confirmation of DENV 1–3 cases.<sup>32</sup> In 2008, the Brazilian Ministry of Health established the NS1 antigen capture test in sentinel units for early identification of suspected cases in several states. That same year, the ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA confirmed 49% (27/55) of the cases analyzed in LABFLA / IOC, FIOCRUZ, however in this study, the confirmation of cases were 36.5, 29.8 and 25% in 2010, 2011 and 2012, respectively.

The introduction of a new serotype of DENV is associated with the occurrence of major epidemics and increased proportion of severe cases,<sup>33</sup> more frequent in individuals susceptible to the

new serotype circulating. Due to the lack of information on some patients' records, the classification of cases according to the new WHO criteria<sup>15</sup> was not possible. In this study, hemorrhage, shock, increased transaminases levels and central nervous system involvement was considered for severe case classification. From 2010 to 2012, 6.9% of the cases confirmed were classified as severe dengue cases and this observation is in agreement with those reported for the state of RJ.

Our results suggested a significantly higher risk for developing severe disease among children 15 years-old and under in 2010, and individuals over 65 years-old in 2011, while in 2012 there was a more homogeneous distribution among age groups. However, disregarding the period studied there was a significant difference between age groups. It has been demonstrated that individuals infected with DENV-3 had a greater chance of presenting signs and symptoms associated with severity (OR=12.30, 95% CI 1.52–80.98,  $p<0.05$ ), however this should be carefully addressed due to the small number of DENV-3 cases represented in this study. It also demonstrated an increased risk of severity in individuals older than 64 years (OR=2.51, 95% CI 0.98–6.15,  $p<0.05$ ). Additionally, it demonstrated an increased risk of severe dengue in secondary cases.

The higher fatal case confirmation in this study was observed in 2011, when a prevalent circulation of DENV-1 was observed in the state. Despite this, an increased number of deaths from secondary infections and due to DENV-2 were reported. However, an increase in deaths due to primary infection was also described.

As previously described, the four DENV serotypes were reported simultaneously for the first time in RJ, however one of the limitations of the study was the low number of DENV-3 cases identified during the period.

Dengue has become a major public health problem in RJ due to many factors such as the susceptibility of the human host, emergence and re-emergences with alternating circulation of serotypes, high rate of infestation of mosquito vectors and environmental factors. In this scenario, it also became evident that laboratory diagnosis has a major role in disease surveillance, both in inter-epidemic periods and epidemics, and acting preventively as a tool for early detection of dengue cases. Furthermore, it has been shown here that viral emergences or re-emergences may play different roles in the disease epidemiology, especially when many serotypes co-circulate.

**Authors' contributions:** FBS, RMRN, AMBP designed the study. MH, MRQL, NRCF, PCGN, FBN, implemented the study. FBS, MH, RMRN and AMBP analyzed the data and FBS and MH wrote the paper. All authors read and approved the final version of the paper. FBS is the guarantor of the paper.

**Acknowledgements:** To Eliane S. M. Araújo, Simone A. Sampaio, Dinair C. Lima, Jaqueline B. S. Simões, Bianca S. Gonçalves, José da Costa Farias Filho and Leda Maria dos Santos for technical support.

**Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq [grant number 305333/2012–7], Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde /PAPES VI-FIOCRUZ [grant number 407690/2012–3], Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro /FAPERJ [grant number 210.026/2014 to RMR], Oswaldo Cruz

Foundation/FIOCRUZ and Brazilian Ministry of Health. MH, MRQL and NRCF were fellows from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and PCGN and FBN were fellows from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** The samples belong to a collection from an ongoing Project approved by resolution number CSN196/96 from the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (CEP 274/05), Ministry of Health-Brazil.

## References

- Lindenbach B, Rice C. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (Editors). *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001, p. 991–1041.
- WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013, p. 140.
- Claro L, Tomassini H, Rosa M. Dengue prevention and control: a review of studies on knowledge, beliefs, and practices. *Cad Saude Publica* 2004;20:1447–57.
- Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986;81:245–6.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:253.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E et al. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect* 1993;111:163–70.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:925–6.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1376–81.
- Teixeira M, Costa M, Coelho G, Barreto M. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1663.
- Teixeira MG, Costa MaC, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 2009;25(Suppl 1):S7–18.
- Ministério da Saúde. Dengue- Situação Epidemiológica. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue> [accessed 8 July 2014].
- SVS/MS. Informe Epidemiológico da Dengue: Semanas de 1 a 52 de 2009. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. <http://www.paho.org/bra> [accessed 7 January 2013].
- Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2011;17:938–40.
- 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;106:255–6.
- WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. New ed. Geneva: World Health Organization; 2009, p. 147.
- Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978;40:531–44.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984;33:158–65.
- Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB et al. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol* 1999;14:183–9.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:545–51.
- Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95(Suppl 1):179–81.
- SES/SINAN. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Dengue-classica-at-2013.pdf> [accessed 10 April 2014].
- Teixeira T, Medronho RA. Socio-demographic factors and the dengue fever epidemic in 2002 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica* 2008;24:2160–70.
- dos Santos FB, De Filippis AMB, Araújo ESM 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.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP et al. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83:219–25.
- Macedo GA, de Araújo JM, Schatzmayr HG et al. Virological surveillance for early warning of dengue epidemics in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2013;107:141–6.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986–1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:297–304.
- Miagostovich MP, dos Santos FB, de Araújo ES et al. Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92:595–9.
- De Paula SO, Pires Neto RJ, Corrêa JA et al. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96:266–9.
- Andries AC, Duong V, Ngan C et al. Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1993.
- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M et al. 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;40:376–81.
- Xu H, Di B, Pan Y et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol* 2006;44:2872–8.
- Lima MaR, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e738.
- Rigau-Pérez JG, Ayala-López A, García-Rivera EJ et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:355–62.

**Artigo 2:** A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4

- **Objetivo específico:** Estabelecer uma estratégia para o aperfeiçoamento da sensibilidade do teste de captura de NS1 para o diagnóstico precoce de DENV-4.

**Situação do Manuscrito:** Artigo publicado na revista *Journal of Virological Methods*.

**Classificação QUALIS:** Área Medicina II - B1.

**Referência:** Monique da Rocha Queiroz Lima, Rita Maria Ribeiro Nogueira, Ana Maria Bispo de Filippis, Priscila Conrado Guerra Nunes, Carla Santos de Sousa, Manoela Heringer da Silva e Flavia Barreto dos Santos.

**Resumo:** A forma secretada da glicoproteína não estrutural-1(NS1) do vírus dengue (DENV) tem sido proposta como sendo útil ao diagnóstico das infecções por DENV em amostras de soro de pacientes. Neste estudo, 471 amostras positivas para DENV-4, de pacientes de fase aguda, foram coletadas no período de março de 2011 a outubro 2012 e analisadas. Os casos primários (n= 228) e secundários (n= 238) de DENV-4 foram caracterizados utilizando ELISA de captura de IgM e IgG. A sensibilidade do teste ELISA de detecção da NS1 para DENV foi avaliada em amostras de soro que não foram pré-tratadas e que foram pré-tratadas por dissociação por ácido e térmica, antes da análise, a dissociações ácidas e térmicas realizadas nas amostras agudas de infecções primárias e secundárias de DENV-4 aumentaram significativamente a sensibilidade da detecção da NS1 de 54,4% para 77,2% e 82% e de 39% para 63,9% e 73,1%, respectivamente. O tratamento de amostras de soro de pacientes infectados com DENV utilizando a dissociação térmica (100°C durante 5 minutos), demonstrou ser, portanto, útil o aumento na sensibilidade do teste NS1 no diagnóstico precoce de DENV-4, principalmente na ocorrência de infecções secundárias.



## Short communication

## A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4



Monique da Rocha Queiroz Lima, Rita Maria Ribeiro Nogueira,  
Ana Maria Bispo de Filippis, Priscila Conrado Guerra Nunes, Carla Santos de Sousa,  
Manoela Heringer da Silva, Flavia Barreto dos Santos\*

Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

## A B S T R A C T

## Article history:

Received 21 October 2013

Received in revised form 18 February 2014

Accepted 21 February 2014

Available online 18 April 2014

## Keywords:

Dengue diagnosis

NS1 ELISA

Immune-complex dissociation

DENV-4

secondary infections

The secreted form of the dengue virus (DENV) nonstructural-1 (NS1) glycoprotein has been shown to be useful for the diagnosis of DENV infections in patients' serum samples. In a number of studies, the sensitivity of the commercially available DENV NS1 glycoprotein detection assays was higher against some DENV serotypes (DENV-1 > DENV-3 > DENV-2 = DENV-4) than others and were also lower using patients' serum samples with secondary versus primary DENV infections. In this study, 471 DENV-4 positive acute phase patients' serum samples were selected from a large panel collected in Brazil from March 2011 to October 2012 by RT-PCR and/or virus isolation followed by serotype determination. The sera from primary ( $n=228$ ) and secondary ( $n=238$ ) DENV-4 infections were identified using IgM and IgG capture ELISAs. The sensitivity of a commercial DENV NS1 glycoprotein detection ELISA was then assessed when these serum samples were not pre-treated or pre-treated by acid or heat dissociation prior to being tested. Acid and heat dissociation of patients' serum samples with primary and secondary DENV-4 infections increased significantly the sensitivity of the DENV NS1 glycoprotein detection ELISA from 54.4% to 77.2% ( $p < 0.05$ ) and 82% ( $p < 0.05$ ) and from 39.1% to 63.9% ( $p < 0.05$ ) and 73.1% ( $p < 0.05$ ), respectively. Treatment of DENV infected patients' serum samples using simple and rapid heat dissociation step (100 °C for 5 min) was, therefore, shown to be very useful for increasing the sensitivity of the DENV NS1 glycoprotein detection ELISA using serum samples from either primary or secondary DENV infected patients.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Dengue fever (DF) is a mosquito-borne viral disease of public health significance, caused by one of four dengue virus serotypes (DENV-1 to DENV-4) and mainly transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes. Hyper-endemic DENV transmission of one or more serotypes occurs in most countries of the Americas (WHO, 2013). In Brazil, dengue became a public health problem after the introduction of DENV-1 in 1986. In July of 2010, DENV-4 was isolated in Roraima, 28 years after its first detection in that same State and soon this serotype spread other States of the country (Nogueira and Eppinghaus, 2011).

The DENV nonstructural-1 (NS1) glycoprotein, exists as membrane-associated protein and secreted form and was demonstrated to circulate in the acute phase of the disease by antigen capture ELISAs, up to the ninth day after the onset of the symptoms of primary and secondary infections (Alcon et al., 2002). The diagnostic sensitivity of the DENV NS1 glycoprotein detection ELISA could exceed 90% for serum samples from patients with primary DENV infections, and its circulation persisted for several days after the fever subsided (Chatterji et al., 2011; Dussart et al., 2008; Tricou et al., 2011). However, using serum samples from patients with secondary DENV infections, the DENV NS1 glycoprotein antigenaemia was shown to be shorter and the detection sensitivity using this ELISA was lower (60–80%) (Guzman et al., 2010). The anamnestic IgG responses generated against this glycoprotein during the primary DENV infection were hypothesized to account for these findings, since the formation of circulating immune complexes (CICs) which contained IgG-DENV NS1 glycoprotein would reduce

\* Corresponding author at: Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Av Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21045-360, Brazil. Tel.: +55 21 2562 1920; fax: +55 21 2562 1779.

E-mail address: [flaviab@ioc.fiocruz.br](mailto:flaviab@ioc.fiocruz.br) (F.B.d. Santos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.031>

0166-0934/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.



the ELISA detection by both masking epitopes and increasing clearance of this antigen.

In 2008, an evaluation of three commercial DENV NS1 glycoprotein detection assays using DENV-1, DENV-2 or DENV-3 infected patients' serum samples was performed in Brazil (Lima et al., 2010). Since DENV-4 subsequently re-emerged in 2010 (Nogueira and Eppinghaus, 2011), these assays were not tested on patients' serum samples infected with this serotype. Therefore aimed to evaluate the sensitivity and specificity of a commercial DENV NS1 glycoprotein detection assay using primary and secondary DENV-4 infected patients' serum samples and whether CIC dissociation methods could increase the DENV-4 NS1 glycoprotein sensitivity of this assay.

This study was performed as part of an on-going project approved by resolution number CSN196/96 from the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (CEP 274/05), Brazilian Ministry of Health, after the introduction of DENV-4 into the state of Rio de Janeiro. The DENV infected patients' serum samples ( $n = 471$ ), used for this study, were collected from day 1 to 7 after the onset of fever from March 2011 to October 2012. DENV-4 infections were confirmed by virus isolation using C6/36 cell culture and subsequent DENV serotype determination using indirect fluorescent antibody test (IFAT) with serotype-specific monoclonal antibodies (Gubler et al., 1984) and/or RT-PCR (Lanciotti et al., 1992). The Panbio dengue IgM Capture ELISA (Panbio Diagnostics, Queensland, Australia) was used for the qualitative detection of anti-DENV IgM antibodies in serum for case confirmation. The IgG-ELISA previously described (Miagostovich et al., 1999) was performed for the characterization of dengue immune response. The Platelia Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) was used for NS1 antigen capture according to the instructions by the manufacturer. In an effort to improve the Platelia Dengue NS1 Ag-ELISA test sensitivity, two antigen-antibody complex dissociation protocols were tested using the serum samples collected from the DENV-4 confirmed DF cases using virus isolation and/or RT-PCR, but which were negative using the DENV NS1 glycoprotein-detection ELISA ( $n = 250$ ).

The acid dissociation method was performed as described previously (Koraka et al., 2003). Briefly, 50  $\mu$ L of serum was added to 50  $\mu$ L of dissociation buffer (1.5 M glycine/hydrochloric acid, pH 2.8) and incubated at 37 °C for 1 h. The dissociation reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ L of neutralizing buffer (1.5 M Tris/hydrochloric acid, pH 9.7). The heat-mediated dissociation method was performed as described previously (Schüpbach et al., 1996). Briefly, 50  $\mu$ L of serum was added to 100  $\mu$ L of RNA/DNAse free water (Invitrogen, Carlsbad, USA) and heated in a boiling water bath for five minutes. DENV-4 positive patients' acute phase serum samples were subjected to immune-complex dissociation to assess whether these treatments could increase the sensitivity of the DENV NS1 glycoprotein detection ELISA. The derived data was evaluated by chi-square test using the Epi Info 7.0.9.34 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta).

A total of 2468 samples from suspected DF cases were obtained during the collection period, of which 47.6% (1174/2468) were confirmed to be infected with DENV. DENV-4 was identified as the infecting serotype in 40.1% (471/1174) of these positive cases. The overall DENV-4 NS1 glycoprotein detection sensitivity using the commercial ELISA was 46.9% (221/471). The sensitivity of DENV NS1 glycoprotein detection was therefore lower than that reported for the DENV-4 serotype (89.6%) using patients serum samples collected in French Guiana (Dussart et al., 2006) or from a multi-country study (67–91%) (Guzman et al., 2010).

Higher DENV confirmation rates were observed when the results from the DENV NS1 glycoprotein detection ELISA were combined with those obtained by either the MAC-ELISA (51.4%,  $p = 0.192$ ), DENV isolation (67.1%,  $p < 0.05$ ) or the RT-PCR (99.6%,

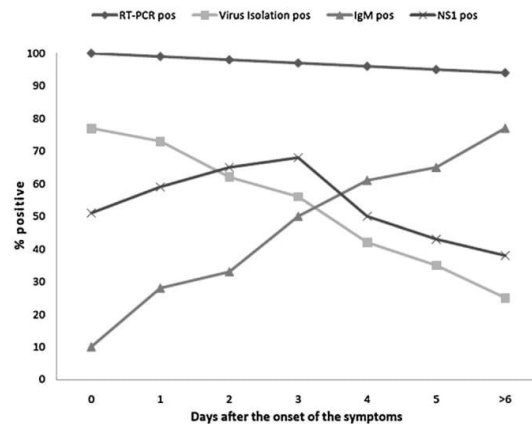


Fig. 1. Sensitivities of the different DENV detection assays used to identify the 466 DENV-4 infected patients using their serum samples collected from day 0 to 6 after the onset of fever.

$p < 0.05$ ) (data not shown). The DENV NS1 glycoprotein detection ELISA showed a progressively increased sensitivity using patients serum samples collected from day 0 (51.6%) to day 3 (68%, peak sensitivity) before it gradually declined to 38.2% using patients' serum samples collected on day 7 after the onset of fever (Fig. 1). By contrast, the ability to isolate DENV-4 progressively decreased from 77% to 24.1% using patients' serum samples collected from day 0 to day 7 after the onset of fever, while RT-PCR detection which was mainly used to select these DENV-4 infected patients' samples was, as expected, only reduced slightly from 100% to 94% over this same period. The sensitivity of the MAC-ELISA showed a gradual increase using patients serum samples collected on day 0 (28.3%) to day 7 (42.3%), with 50% of these patients being positive on day 3 after the onset of fever. From the 471 DENV-4 confirmed patients' serum samples, 48.9% (228/466) were classified as primary DENV infections, 51.1% (238/466) were classified as secondary DENV infections, while the samples from 5 other patients could not be classified (Table 1). DENV-4 NS1 glycoprotein-positive results were obtained using the ELISA in 54.4% (124/228) and 39.1% (93/238) of the serum samples from primary and secondary DENV infections, respectively and therefore the sensitivity was higher for samples from primary infections ( $p = 0.001$ ). Previously, higher DENV NS1 glycoprotein detection sensitivities were observed in both primary and secondary DENV patients' serum samples collected in a country where severe DENV infections were rare (Netherlands Antilles) compared to those collected from DENV infected patients in a country (Indonesia) where severe DENV infections (DHF/DSS) were common (Koraka et al., 2003). The DENV NS1 glycoprotein dot-blot detection assay had higher sensitivities using primary rather than secondary DENV infections in both patient cohorts (Koraka et al., 2003) as was also found using the Platelia NS1 glycoprotein detection ELISA with DENV infected patients' serum samples from another DHF/DSS-endemic area (Cambodia) (Duong et al., 2011). These results may be explained by the presence of Ab-DENV NS1 glycoprotein complexes in the serum samples from patients with secondary DENV infections. By contrast, the higher DENV NS1 glycoprotein sensitivities obtained using serum samples from Thai patients with secondary versus primary DENV-2 infections using another ELISA could be accounted for by the higher viraemia identified in these patients (Libraty et al., 2002).

Interestingly, acid treatment/neutralization steps performed on DENV infected patients' serum samples collected in Indonesia dramatically increased the DENV NS1 glycoprotein detection

**Table 1**  
DENV-4 NS1 glycoprotein ELISA detection sensitivities against 466 patients' serum samples with primary or secondary dengue infections.

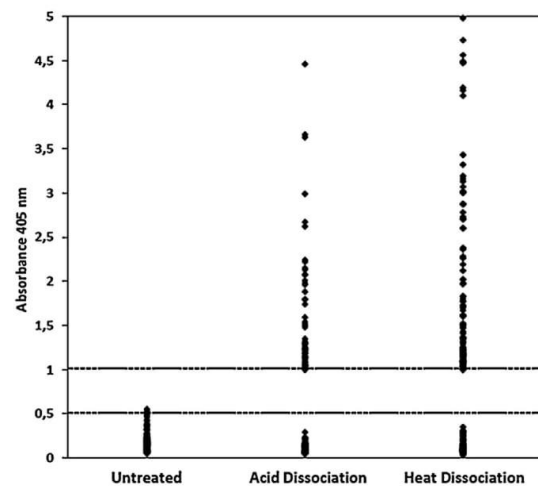
DENV-4 NS1 glycoprotein ELISA detection					
Primary (n = 228)			Secondary (n = 238)		
NS1 non-dissociated 54.4% (124/228)	NS1 dissociated Acid 77.2% (176/228) Heat 82.0% (187/228)	P value <0.05 <0.05	NS1 non-dissociated 39.0% (93/238)	NS1 dissociated Acid 63.9% (152/238) Heat 73.1% (174/238)	P value <0.05 <0.05

sensitivities of a dot-blot assay using samples from both primary and secondary infection from 64% to 91% and from 22% to 93% respectively (Koraka et al., 2003). In a subsequent study using patients' serum samples collected in Thailand, the sensitivity of the Platelia DENV NS1 glycoprotein detection ELISA was increased from 63.2% to 72% when the DENV infected patients' serum samples were subjected to the same acid treatment/neutralization steps (Lapphra et al., 2008). Moreover, acid treatment/neutralization steps performed on HIV-1 infected patients' serum samples was previously shown to increase dramatically the sensitivity of a HIV-1 p24 protein detection ELISA, but which could be further increased to higher than HIV-1 RNA detection after a simple heat denaturation step, performed to disrupt these patients' IgG-p24 protein immune complexes (Schüpbach et al., 1996). Since a higher anti-DENV E/prM glycoprotein IgG titres in patients' serum samples that tested negative for the DENV-4 NS1 glycoprotein was observed (data not shown), these samples were further tested to analyze whether either the acid/neutralization steps or the heat treatment steps could increase the NS1 glycoprotein detection sensitivity.

In this study, the sensitivity of the DENV NS1 glycoprotein detection ELISA was increased from 54.4% (124/228) to 77.2% (176/228),  $p < 0.05$ , after the patients' serum samples from primary DENV-4 infections were subjected to the acid dissociation and 82% (187/228),  $p < 0.05$ , after they had undergone heat dissociation (Table 1). As expected, the sensitivity of detection ELISA using patients' serum samples from secondary DENV-4 infections was also increased from 39.1% (93/238) to 63.9% (152/238),  $p < 0.05$ , after acid dissociation and to 73.1% (174/238),  $p < 0.05$ , after heat dissociation. Thus, there was a statistically significant difference between these sensitivities for samples from primary versus secondary DENV-4 patients when they were either non-dissociated ( $p = 0.001$ ), acid dissociated ( $p = 0.002$ ) or heat dissociated ( $p = 0.002$ ). The overall ELISA sensitivities, using the combined results for samples from primary and secondary DENV-4 infected patients, were increased significantly from 46.6% (217/466) to 70.4% (328/466) and 77.5% (361/466), ( $p = 0.017$ ) after acid dissociation and heat dissociation, respectively.

In this study, it has been shown further evidence that acid or heat dissociation methods, as previously used for the increased ELISA detection of the HIV-1 p24 protein (Schüpbach et al., 1996), could both significantly increase the sensitivity of a commercial ELISA for the detection of a soluble antigen of another virus (DENV-4 NS1 glycoprotein) and that heat dissociation was a superior method to acid dissociation. This was the first report to test the heat dissociation for the increased detection of the DENV NS1 glycoprotein and it has shown to be an ideal method since it can be more rapidly performed than the acid dissociation method. The absorbance values obtained using the DENV NS1 glycoprotein detection ELISA for each of the 250 DENV-4 NS1-negative patients' serum samples untreated (non-dissociated), acid or heat dissociated are shown on Fig. 2.

Interestingly, although to a significantly lower level than for patients' serum samples from secondary DENV infections, both the acid and heat dissociation methods also increased the sensitivity of the DENV-4 NS1 glycoprotein detection using samples from patients with primary DENV-4 infections (Table 1). These results are therefore unlikely to be accounted for by the disruption of the



**Fig. 2.** Absorbance values obtained using the DENV NS1 glycoprotein detection ELISA for each of the 250 DENV-4 NS1-negative patients' serum samples untreated (non-dissociated), acid or heat dissociated. The negative (<0.5) and positive (>1.0) cut-off values determined at a wavelength of 450 nm are shown.

patients' antibody-DENV-4 NS1 glycoprotein complexes, since the DENV NS1 glycoprotein is not an immuno-dominant DENV protein during primary DENV infections (Shu et al., 2003). Since both acid treatment and heat treatment are known to dissociate the native hexameric form of the DENV NS1 glycoprotein (Falconar and Young, 1990), these findings may be due to an increased ELISA detection sensitivity for the monomeric forms of the DENV-4 NS1 glycoprotein.

In this study, the usefulness of qualitative result of NS1 antigen detection assay in early recognition of dengue infection particularly in combination with others tests has been demonstrated. The evaluation of the Platelia NS1 Ag assay exhibited a quite low sensitivity in diagnosing DENV-4 cases. Therefore, the NS1 antigen results should be interpreted with caution when used alone due to the false negative results and high clinical awareness and close follow-up are still needed in patients with acute febrile illness in dengue endemic area. Based on the results obtained, that it is suggested the addition of a heat dissociation step on sera prior to the performance of the NS1 assay to improve the test sensitivity on endemic areas where secondary infections are more reported frequently.

#### Acknowledgments

We are grateful to Eliane S.M. de Araújo, Simone Alves Sampaio, Jaqueline Bastos Santos, Nieli Rodrigues da Costa Faria, Fernanda de Bruycker Nogueira and José Farias Filho for technical support. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, FAPERJ, FIOCRUZ and PAPES VI/FIOCRUZ. MRQL is a CAPES fellowship recipient.

## References

- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., Flamand, M., 2002. 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.* 40, 376–381.
- Chaterji, S., Allen, J.C., Chow, A., Leo, Y.S., Ooi, E.E., 2011. Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 224–228.
- Duong, V., Ly, S., Lorn Try, P., Tuiskunen, A., Ong, S., Chroeng, N., Lundkvist, A., Leparc-Goffart, I., Deubel, V., Vong, S., Buchy, P., 2011. 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.* 5, e1244.
- Dussart, P., Lavergne, A., Lagathu, G., Lacoste, V., Martial, J., Morvan, J., Cesaire, R., 2006. Reemergence of dengue virus type 4 French Antilles and French Guiana, 2004–2005. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1748–1751.
- Dussart, P., Petit, L., Labeau, B., Bremand, L., Leduc, A., Moua, D., Matheus, S., Baril, L., 2008. 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.* 2, e280.
- Falconar, A.K., Young, P.R., 1990. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *J. Virol. Methods* 30, 323–332.
- Gubler, D.J., Kuno, G., Sather, G.E., Velez, M., Oliver, A., 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 158–165.
- Guzman, M.G., Jaenisch, T., Gaczkowski, R., Ty Hang, V.T., Sekaran, S.D., Kroeger, A., Vazquez, S., Ruiz, D., Martinez, E., Mercado, J.C., Balmaseda, A., Harris, E., Dimano, E., Leano, P.S., Yoksan, S., Villegas, E., Benduzu, H., Villalobos, I., Farrar, J., Simmons, C.P., 2010. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e811.
- Koraka, P., Burghoorn-Maas, C.P., Falconar, A., Setiati, T.E., Djamiatun, K., Groen, J., Osterhaus, A.D., 2003. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4154–4159.
- 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.* 3, 545–551.
- Lapphra, K., Sangcharaswichai, A., Chokephaibulkit, K., Tiengrim, S., Piriyaakarnsakul, W., Chakorn, T., Yoksan, S., Wattanamongkolsil, L., Thamlikitkul, V., 2008. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 387–391.
- Libraty, D.H., Young, P.R., Pickering, D., Endy, T.P., Kalayanaroj, S., Green, S., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Ennis, F.A., Rothman, A.L., 2002. 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.* 186, 165–168.
- Lima, M.a.R., Nogueira, R.M., Schatzmayr, H.G., dos Santos, F.B., 2010. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e738.
- Miagostovich, M.P., Nogueira, R.M., dos Santos, F.B., Schatzmayr, H.G., Araújo, E.S., Vorndam, V., 1999. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J. Clin. Virol.* 14, 183–189.
- Nogueira, R.M., Eppinghaus, A.L., 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 255–256.
- Schüpbach, J., Flepp, M., Pontelli, D., Tomasik, Z., Lüthy, R., Böni F J., 1996. 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* 10, 1085–1090.
- Shu, P.Y., Chen, L.K., Chang, S.F., Yueh, Y.Y., Chow, L., Chien, L.J., Chin, C., Lin, T.H., Huang, J.H., 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 622–630.
- Tricou, V., Minh, N.N., Farrar, J., Tran, H.T., Simmons, C.P., 2011. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1309.
- WHO, 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases., pp. 25–29. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564540/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/) Dengue 1.3.

**Artigo 3:** Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute dengue 4 cases.

- **Objetivo Específico:** Analisar a sensibilidade do teste de captura de NS1 para o diagnóstico precoce de DENV-4 em um estudo prospectivo realizado no RJ.

Situação do Manuscrito: Artigo publicado na revista *BMC Infectious Diseases*

**Classificação QUALIS:** Área de Medicina II - B1

**Referência:** Sibelle Nogueira Buonora, Flavia Barreto dos Santos, Regina Paiva Daumas, Sonia Regina Lambert Passos, Manoela Heringer da Silva, Monique Rocha de Lima e Rita Maria Ribeiro Nogueira.

**Resumo:** A dengue é uma doença febril aguda considerada a principal arbovirose em termos de morbidade, mortalidade, impacto econômico e disseminação em todo o mundo. O Brasil responde pela maior taxa de notificação, com a circulação dos quatro sorotipos de dengue. O antígeno NS1 é uma glicoproteína solúvel específica altamente conservada de dengue, essencial para replicação viral e viabilidade, que pode ser detectada de 0 a 18 dias após o início da febre (pico dos primeiros 3 dias). Ela induz uma forte resposta humoral e é conhecida como um antígeno de fixação de complemento. A menor sensibilidade ao teste NS1 ocorre em infecções secundárias de dengue provavelmente devido à formação do complexo imune que prejudica a detecção de antígeno por ELISA. Neste estudo, comparamos a sensibilidade do ELISA NS1 em amostras dissociadas com calor e não dissociadas de 156 casos de DENV-4 aguda confirmados por RT-PCR e de 362 pacientes recrutados prospectivamente. As infecções secundárias por DENV-4, representaram 83,3% dos casos. O NS1 ELISA foi positivo em 42,5% e indeterminado em 10,2% dos casos de DENV-4. Após a dissociação térmica, 7 amostras negativas e 16 indeterminadas tornaram-se positivas, aumentando a sensibilidade geral do teste para 57,7%. Embora demorado, quando comparado aos testes imunocromatográficos rápidos e de requer o uso de equipamentos laboratoriais específicos, o ELISA NS1 combinado com dissociação térmica pode ser uma alternativa para o aperfeiçoamento da sensibilidade na triagem de casos suspeitos de DENV-4.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute dengue 4 cases

Sibelle Nogueira Buonora<sup>1\*</sup>, Flavia Barreto dos Santos<sup>2</sup>, Regina Paiva Daumas<sup>3</sup>, Sonia Regina Lambert Passos<sup>1</sup>, Manoela Heringer da Silva<sup>2</sup>, Monique Rocha de Lima<sup>2</sup> and Rita Maria Ribeiro Nogueira<sup>2</sup>

## Abstract

**Background:** Dengue is an acute febrile illness considered the major arboviral disease in terms of morbidity, mortality, economic impact and dissemination worldwide. Brazil accounts for the highest notification rate, with circulation of all four dengue serotypes. The NS1 antigen is a dengue highly conserved specific soluble glycoprotein essential for viral replication and viability that can be detected 0 to 18 days from the onset of fever (peak first 3 days). It induces a strong humoral response and is known as a complement-fixing antigen. Lower NS1 test sensitivity occurs in secondary dengue infections probably due to immune complex formation impairing antigen detection by ELISA.

**Methods:** We compared the sensitivity of NS1 ELISA in heat dissociated and non-dissociated samples from 156 RT-PCR confirmed acute dengue-4 cases from 362 prospectively enrolled patients.

**Results:** Secondary infections accounted for 83.3% of cases. NS1 ELISA was positive in 42.5% and indeterminate in 10.2% of dengue-4 cases. After heat dissociation, 7 negative and 16 indeterminate samples turned positive, increasing the overall test sensitivity to 57.7%.

**Conclusions:** Although it is time consuming and requires the use of specific laboratory equipment, NS1 ELISA combined with heat dissociation could be a slightly better alternative for triage in suspected dengue cases.

**Keywords:** NS1 ELISA, Accuracy, Dengue diagnosis, Immune complex dissociation, DENV-4

## Background

Dengue is an acute febrile illness considered the major worldwide arboviral disease, in terms of morbidity, mortality, economic impact and dissemination [1]. Dengue occurs in all non-polar continents [2] and is an important public health concern in tropical and subtropical regions mainly in Asia and Americas [3, 4]. Estimates account for 390 million dengue infections per year of which 96 million present clinical manifestations [5]. The disease is endemic in 100 countries and approximately 40% of the world population is at risk of dengue infection [1]. By the end of the 20<sup>th</sup> century, Brazil became the country with the highest notification rate, accounting for 98.5% of the American continent's reported cases and the highest fatality rate in the sub region [1]. Since 2008, all

four dengue serotypes (DENV-1 to DENV-4) can be found in the country [6].

NS1 Ag is a dengue highly conserved specific soluble glycoprotein essential for viral replication and viability that can be detected in dengue patients from day 1 up to 18 days after fever onset [7] with peak sensitivity in the first 3 days of fever onset [8]. It induces a strong humoral response and is known as a complement-fixing antigen [9].

Previous studies have evaluated the usefulness and the accuracy NS1 tests [10–14]. According to da Costa et al. the main factors influencing the diagnostic accuracy are the type of infection (primary versus secondary), viral serotype, geographical origins of samples, and the timing of sample collection [12].

Low NS1 test sensitivity in secondary dengue infections may be attributed to high levels of IgG in anamnestic response with immune complex formation impairing antigen detection by ELISA [9, 15]. Some studies have also noticed lower NS1 sensitivity in DENV-4 compared to

\* Correspondence: sibellebuonora@gmail.com

<sup>1</sup>National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Laboratory of Clinical Epidemiology, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil, 4036 sala 201 A – Mangueiras, Rio de Janeiro CEP: 21040-361, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

other serotypes, in both primary and secondary dengue [12, 13]. Furthermore, immune complex dissociation techniques have proven to be important for the early diagnosis of HIV infections and most recently DENV [9, 16]. A study conducted in Rio de Janeiro with DENV-4 cases analyzed acid treatment/neutralization and heat dissociation, with a better performance for the latter [9]. In the present study, we compared the sensitivity of NS1 ELISA in heat dissociated and non-dissociated samples from acute DENV-4 patients.

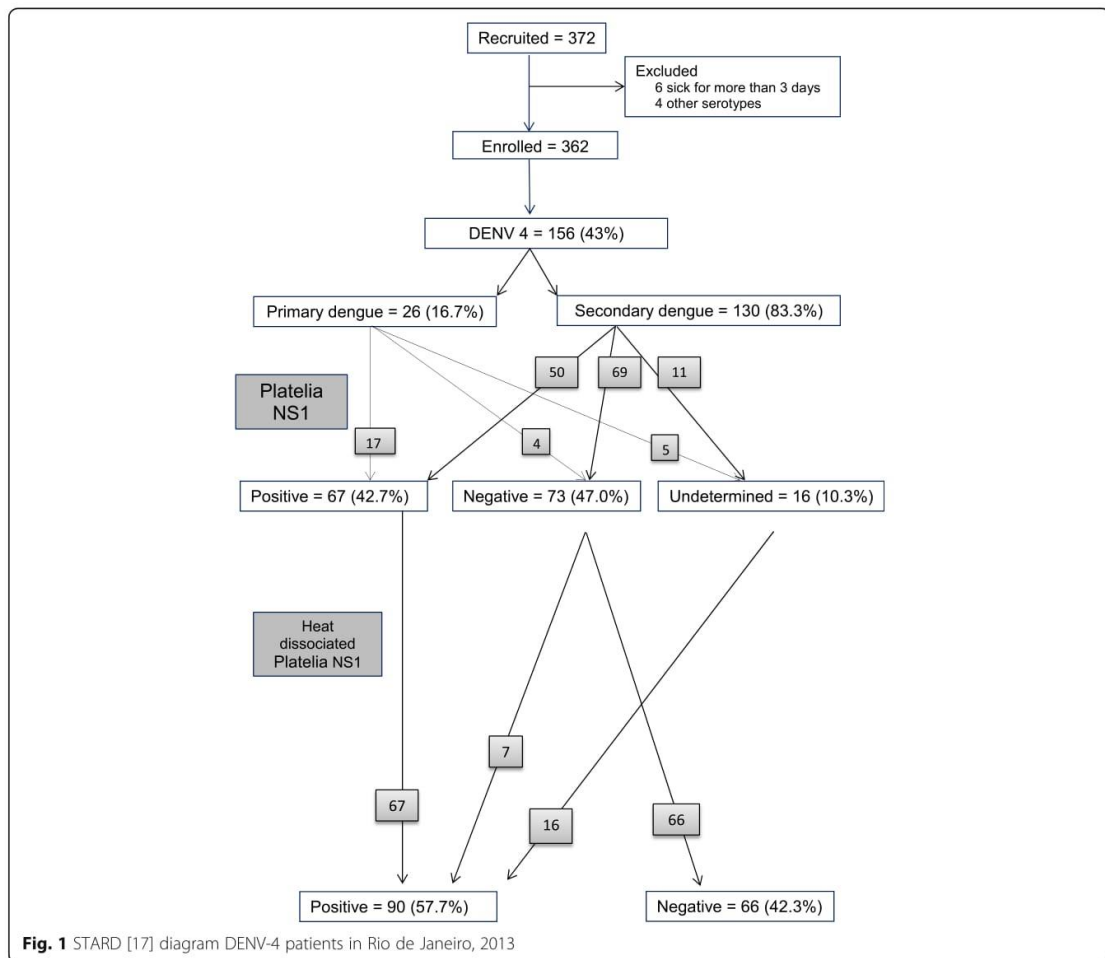
**Methods**

This study is part of a prospective cross-sectional pragmatic diagnostic study of clinical and diagnostic algorithms for dengue diagnosis conducted at Rio de Janeiro, Brazil during the 2013 dengue epidemic season (March and April). We used the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Study (STARD)

Guideline [17]. Eligible adult patients who presented to a public outpatient unit (Unidade de Pronto Atendimento-UPA 24H) within 72 h of a febrile illness without an evident source of infection were interviewed and examined by the investigators. At the time the study was carried out there were no evidences that other Flaviviruses, such as Zika were circulating in Rio de Janeiro [18].

Blood samples were collected and sera stored at -70 °C until the tests. The index test (Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA), specific IgG and confirmatory RT-PCR were all performed at the Flavivirus Regional Reference Laboratory, IOC, FIOCRUZ.

The Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) was performed in all samples according to the manufacturer's instructions and described elsewhere, briefly the test is based on a one-step sandwich format microplate enzyme



**Fig. 1** STARD [17] diagram DENV-4 patients in Rio de Janeiro, 2013

**Table 1** DENV-4 NS1 performance according to type of infection and method, Rio de Janeiro, 2013

Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA	Results	Type of infection		Total N = 156
		Primary N = 26	Secondary N = 130	
Non-dissociated	Positive	17 (65.4%)	50 (38.4%)	67 (43.0%)
	Negative	4 (15.3%)	69 (53.3%)	73 (46.8%)
	Indeterminate	5 (19.2%)	11 (8.3%)	16 (10.2%)
Heat dissociated	Positive	22 (84.6%)	68 (52.3%)	90 (57.7%)
	Negative	4 (15.4%)	62 (47.7%)	65 (42.3%)

immunoassay to detect DENV NS1 antigen in human serum [10].

The same samples were further submitted to the heat dissociation method when 50 µL of the serum was added to 100 µL of RNA/DNase free water and heated in a boiling water bath for five minutes, as described previously [9].

We defined as secondary cases those patients who presented positive IgG results within 72 h onset of disease [19]. The Dengue Virus IgG DxSelect™ ELISA (Focus Diagnostics, California, USA) was performed according to the manufacturer’s instructions in all samples to diagnose secondary dengue cases.

The viral RNA detection by RT-PCR was performed according to the technique described elsewhere [20]. Laboratory personnel were blinded to other laboratory data such as Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA, IgG and RT-PCR when executing a specific test. DENV infections by other serotypes were excluded. Exploratory analysis was performed using SPSS® v 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). The MedCalc® 14.8.1 program was used to calculate 95% confidence intervals (CI) for the Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA sensitivity.

**Results**

A total of 372 ambulatory patients were enrolled, with 10 exclusions (six presenting symptoms for more than 3 days and four due to infections to other DENV serotypes). The remaining 362 patients had their clinical profile previously described [21]. Briefly, 55.6% were female, the median age was 33 years old (ranging from 18 to 83) and the median time from the onset of illness was two days.

The RT-PCR identified DENV-4 in 42.8% (156/362) of the cases. From those, 16.7% (26/156) were classified as primary infection cases and 83.3% (129/156), as secondary ones, Fig. 1.

The NS1 ELISA performance as described by the manufacturer’s protocol in the 156 DENV-4 cases resulted in 43.0% (67/156) of positive cases, 46.8% (73/156) negative and 10.2% (16/156) indeterminate (Table 1). After the heat dissociation process, all 67 DENV-4 positive cases remained positive; 7 negative all 16 indeterminate cases became positive, as also described by Lima et al [9]. These results could jeopardize the theory of IgG immune complex formation; however the increase in sensitivity in those cases might occur due to an increased detection of monomeric NS1 forms [22].

**Discussion**

In our study, the overall sensitivity of the NS1 test in DENV-4 cases was 47.8%, quite similar to the 46.6% obtained by Lima [9], but lower than the 58% sensitivity obtained in da Costa’s meta-analysis [12], Table 2. This low overall sensitivity may be caused by the South American virus polymorphism lower overall viremia and lower NS1 secretion [12, 13]. The differences in the sensitivities in primary and secondary infections in our case before heat dissociation 80.9% vs 42.0% were also found in da Costa’s meta-analysis (94.6% vs 66%) [12]. Even attenuating the influence of secondary infections by heat dissociation, the sensitivities obtained were still low.

**Table 2** Sensitivity of Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA in acute DENV-4, Rio de Janeiro, 2013

	Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA		Sensitivity (95% CI)	p-value
Overall sensitivity	Non-dissociated		47.8 (39.3 – 56.4)	p < 0.001
	Heat dissociated		57.7 (49.5 – 65.5)	
Type of infection	Primary	Non-dissociated	80.9 (58.1 – 94.6)	p < 0.001
		Heat dissociated	84.6 (65.1 – 95.6)	
	Secondary	Non-dissociated	42.0 (33.0 – 51.4)	p < 0.001
		Heat dissociated	52.3 (43.3 – 61.1)	

We demonstrated significant sensitivity increases after dissociation in both types of DENV-4 infections in agreement with other studies that used unspecific dengue serotype acid dissociated NS1 samples [15, 23].

This study has advantages since it was prospectively executed, the samples were clinically and laboratorially well characterized, and collected during a single outbreak in one outpatient unit increasing the chance of genotypic similarity, quite different from the previous study which was carried out during a 17 month period when genotypic heterogeneity is possible [9]. We were able to demonstrate the advantages of incorporating heat dissociation to the Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA kit in order to increase its sensitivity, mostly in settings where circulating DENV-4 can be an issue. The study limitation was the lack of heterogeneity of viral strains that impairs the generalization of the results in other epidemic settings.

## Conclusions

Although time expending and the requirement of specific laboratory equipment the NS1 ELISA combined to heat dissociation could be a slightly better alternative for accurate dengue diagnosis.

## Abbreviations

CI: Confidence interval; CNPq: Brazilian National Council of Scientific and Technological Development; DENV-1: Dengue virus serotype 1; DENV-4: Dengue virus serotype 4; DNA: Deoxyribonucleic acid; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; FIOCRUZ: Oswaldo Cruz Foundation; IgG: Immunoglobulin G; IOC: Instituto Oswaldo Cruz; NS1: Nonstructural protein-1; RNA: Ribonucleic acid; RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; STARD: Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Study; UPA 24H: Unidade de Pronto Atendimento

## Acknowledgements

We wish to acknowledge the assistance of the following: Diana Rodrigues and Fernanda Quintella, graduate students for data collection and analysis. We would also like to thank Cleber do Carmo for statistical assistance.

## Funding

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq through CNPq/PROEP 402068/2012-2 grant and CNPq/REBRATS 401366/2013 grant. SRLP is funded through CNPq 311414/2013-3 grant. The sponsors were not involved in the design, sample collection and handling, analysis, data interpretation or conclusions.

## Availability of data and materials

The authors confirm that all data and materials underlying the finding are fully available without restriction with the Corresponding Author upon request.

## Authors' contributions

SNB, SRLP and RPD conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. RMRN, MRL, MHS and FBS carried out the immunoassays, rapid immunochromatographic test, viral characterization and writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Ethics approval and consent to participate

The Research Ethics Committee of the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas – Fiocruz approved the study, CAAE 0066.0.009.000-11, on March 23, 2012. All patients signed an informed consent form.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Laboratory of Clinical Epidemiology, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil, 4036 sala 201 A – Manguinhos, Rio de Janeiro CEP: 21040-361, Brazil. <sup>2</sup>Oswaldo Cruz Institute, Instituto Oswaldo Cruz – Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro CEP: 21040-900, Brazil. <sup>3</sup>Germano Sinalva Faria Teaching Primary Care Center, National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Bonsucesso, Rio de Janeiro CEP: 21041-210, Brazil.

Received: 11 November 2016 Accepted: 7 March 2017

Published online: 11 March 2017

## References

- WHO. Dengue: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva; 2009. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/resources/9789241547871/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241547871/en/). Accessed 15 Jan 2015.
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012; 366(15):1423–32.
- Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore*. 1998; 27(2):227–34.
- Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95 Suppl 1:179–81.
- 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.
- Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*. 2014;22(3):138–46.
- Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2872–8.
- 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.
- Lima MR, 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.
- Lima MR, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7), e738.
- Lima MR, Nogueira RM, de Filippis AM B, dos Santos FB. Comparison of two generations of the Panbio dengue NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(6):1031–3.
- da Costa VG, Marques-Silva AC, Moreli ML. A meta-analysis of the diagnostic accuracy of two commercial NS1 antigen ELISA tests for early dengue virus detection. *PLoS One*. 2014;9(4), e94655.
- Pal S, Dauner AL, Mitra I, Forshey BM, Garcia P, Morrison AC, et al. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. *PLoS One*. 2014;9(11), e113411.
- Sea VR, Cruz AC, Gurgel RQ, Nunes BT, Silva EV, Dolabella SS, et al. Underreporting of Dengue-4 in Brazil due to low sensitivity of the NS1 Ag test in routine control programs. *PLoS One*. 2013;8(5), e64056.
- 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.



16. Schüpbach J, Böni J. Quantitative and sensitive detection of immune-complexed and free HIV antigen after boiling of serum. *J Virol Methods*. 1993;43(2):247–56.
17. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy. The STARD initiative. *Am J Clin Pathol*. 2003;119(1):18–22.
18. Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4), e0004636.
19. Lima MRQ, Nogueira RM, Santos FB. Dengue diagnosis: commercially available kits and laboratory support. In: *Clinical insights: dengue: transmission, diagnosis & surveillance*. 1st ed. London: Future Medicine Ltd; 2014. p. 27–47.
20. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(3):545–51.
21. Buonora SN, Passos SR, do Carmo CN, Quintela FM, de Oliveira DN, dos Santos FB, et al. Accuracy of clinical criteria and an immunochromatographic strip test for dengue diagnosis in a DENV-4 epidemic. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):37.
22. Falconar AK, Young PR. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *J Virol Methods*. 1990;30(3):323–32.
23. 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.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



**Artigo 4:** Analysis of Clinical and Laboratory Alterations Related to Dengue Case Severity: Comparison Between Serotypes 2 and 4 in Brazil

- **Objetivo Específico:** Descrever as alterações clínicas e laboratoriais de casos de DENV-4 em comparação à casos de DENV-2 relacionadas à gravidade da doença.

**Situação do Manuscrito:** Artigo publicado na revista *J Virological Methods*.

**Qualificação QUALIS:** Área de Medicina II - B1

**Referência:** Nieli Rodrigues da Costa Faria, Victor Edgar Fiestas Solorzano, Luiz José de Souza, Rita Maria Ribeiro Nogueira, Fernanda de Bruycker-Nogueira, Thaís Chouin-Carneiro, Jaqueline Bastos Santos Simões, Monique da Rocha Queiroz Lima, Luzia Maria de Oliveira Pinto, Claire Fernandes Kubelka, Manoela Heringer, Elzinandes Leal de Azeredo e Flavia Barreto dos Santos.

**Resumo:** O aumento dos casos graves de dengue causou grande impacto na saúde pública e tem preocupado as autoridades dos países onde a doença é endêmica e as epidemias atingem altas proporções. O reconhecimento dos sinais de progressão desta doença grave durante a fase febril inicial pode ser difícil, uma vez que os sintomas são frequentemente indistinguíveis de outras doenças febris. O objetivo deste estudo foi avaliar as manifestações clínicas e os achados laboratoriais em pacientes de dois surtos de dengue, um causado, prevalentemente por DENV-2 e um por DENV-4, e sua associação com a gravidade da doença. O estudo foi realizado em pacientes (n = 153) com sinais e sintomas consistentes com a dengue, durante, 2010 e 2013, na cidade de Campos dos Goytacazes, no Rio de Janeiro, Brasil. De acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde de 2009, os pacientes foram classificados como dengue sem sinais de alerta ([DsSA] 60,6%, 57/94), dengue com sinais de alerta ([DcSA] 30,9%, 29/94) e DG (4,25% 4/94). Pacientes com DcSA / DG apresentaram menor contagem de plaquetas e leucócitos e maiores níveis de transaminases quando comparados aos DsSA. Curiosamente, os pacientes da epidemia de 2010 causados por DENV-2 apresentaram menor contagem de plaquetas do que pacientes da epidemia de 2013 causada por DENV-4. Além disso, extravasamento plasmático, sangramento gastrointestinal e derrame pleural, características para uma doença mais grave, também foram observados

mais frequentemente nesses casos. Embora estudos anteriores tenham relatado amplamente a ampla gama de aspectos clínicos da dengue, a caracterização de DENV-4 é desejável, considerando o custo da doença durante as epidemias, especialmente para as unidades de saúde e os hospitais que realizam a abordagem do paciente.

## Analysis of Clinical and Laboratory Alterations Related to Dengue Case Severity: Comparison between Serotypes 2 and 4 in Brazil

Nieli Rodrigues da Costa Faria,<sup>1,2</sup> Victor Edgar Fiestas Solorzano,<sup>2</sup> Luiz José de Souza,<sup>3</sup> Rita Maria Ribeiro Nogueira,<sup>1</sup> Fernanda de Bruycker-Nogueira,<sup>1</sup> Thais Chouin-Carneiro,<sup>1</sup> Jaqueline Bastos Santos Simões,<sup>1</sup> Monique da Rocha Queiroz Lima,<sup>1</sup> Luzia Maria de Oliveira Pinto,<sup>2</sup> Claire Fernandes Kubelka,<sup>2</sup> Manoela Heringer,<sup>1</sup> Elzinandes Leal de Azeredo,<sup>2,†</sup> and Flavia Barreto dos Santos<sup>1,\*†</sup>

<sup>1</sup>Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>2</sup>Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>3</sup>Hospital dos Plantadores de Cana, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract.** The increase in severe dengue (SD) cases has caused great impact on public health and has concerned authorities of countries where the disease is endemic and epidemics reach high proportions. The recognition of progression signs of this severe disease during the initial febrile phase can be difficult, since the symptoms are often indistinguishable from other febrile diseases. The aim of this study was to evaluate the clinical manifestations and laboratory findings in patients from two dengue outbreaks and their association with the disease. The study was conducted in patients ( $n = 153$ ) with signs and symptoms consistent with dengue occurred during two distinct epidemics, 2010 and 2013, in the city of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. According to the 2009 World Health Organization criteria, patients were classified as dengue without warning signs ([DwoWS]) 60.6%, 57/94, dengue with warning signs ([DwWS]) 30.9%, 29/94, and SD (4.25%, 4/94). Patients with DwWS/SD presented lower platelet and leukocyte counts and higher transaminase levels when compared with the DwoWS ones. Interestingly, patients from the epidemic of 2010 caused by dengue virus 2 (DENV-2) had lower platelet counts than patients of the 2013 epidemic caused by DENV-4. Furthermore, plasma leakage, gastrointestinal bleeding, and pleural effusion, hallmarks for a more severe disease, were also more frequently observed in those cases. Although previous studies may have extensively reported the wide range of the clinical aspects of dengue, the characterization of DENV-4 is desirable considering the burden of the disease during epidemics, especially for the health units and hospitals performing patient's management.

### INTRODUCTION

Dengue is currently considered globally as the most important mosquito-borne viral disease, and the incidence has grown dramatically around the world in recent decades. It is estimated that 3.9 billion people in 128 countries are at risk of dengue infection.<sup>1</sup> One recent estimate indicates that 390 million dengue infections occur per year, of which 96 million manifest clinically with any disease severity.<sup>2</sup>

Demographic changes, urbanization, and international travel contribute to the expansion of geographical areas where transmission occurs, and all four dengue virus (DENV) serotypes are now circulating in Asia, Africa, and the Americas.<sup>3</sup> Not only is the number of cases increasing as the disease spreads to new areas, but explosive outbreaks are also occurring. Currently, Brazil accounts for approximately 70.0% of reported cases of dengue in the Americas.<sup>4</sup>

In Brazil, the first dengue epidemic with laboratory confirmation occurred in 1981 in Boa Vista, Roraima, in the North Region of Brazil, where DENV-1 and 4 were isolated.<sup>5</sup> However, it was only after DENV-1 was introduced in Rio de Janeiro (RJ) in 1986 that the disease became a nationwide public health problem.<sup>6</sup> In 2007–2008, the country experienced the most severe epidemic in terms of morbidity and mortality and severe cases in children due to the DENV-2 reemergence.<sup>7</sup> DENV-4 was reintroduced in Brazil in 2010, and in RJ, the first dengue cases were detected in Niteroi in 2011,<sup>8</sup> and despite the epidemic caused by DENV-1,

DENV-4 could be isolated during the disease surveillance supported by the laboratory diagnosis performed.<sup>9</sup>

In 2010 and 2013, a total of 1,011,548 and 1,452,489 dengue cases were reported in Brazil, with RJ representing 2.9% (29,824) and 14.7% (213,058) of those cases, respectively.<sup>10</sup>

Early diagnosis of dengue is critical, since some patients may progress from a mild to a severe disease in a short period.<sup>11</sup> Although dengue pathogenesis is not completely clear, it is believed that multiple circulating serotypes; host factors such as secondary infection, comorbidities, genetic polymorphism; and factors related to the virus serotype or genotype would determine the evolution of the clinical forms of dengue.<sup>12</sup>

The white blood cell (WBC) count can reveal a leukopenia and neutropenia, lymphocytosis with lymphocytic atypia, and monocytosis. Signs and symptoms such as severe abdominal pain and continuous, persistent vomiting, postural hypotension, hepatomegaly, mucosal bleeding, increased hematocrit, or abrupt drop of platelets, are considered as potential hallmarks of the disease severity.<sup>13</sup> Repeated monitoring of the platelet count and hematocrit is recommended, as an abrupt decrease in platelet counts is an alarm sign and a significant hematocrit increase is an indirect sign of plasma leakage.<sup>14</sup> In this study, we aimed to analyze the laboratory and clinical findings during two distinct epidemics that occurred in 2010 and 2013, caused by DENV-2 and DENV-4, respectively, in Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

### MATERIALS AND METHODS

**Ethics statement.** The samples were collected as part of an ongoing project approved by resolution number

\* Address correspondence to Flavia Barreto dos Santos, Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045-360, Brazil. E-mail: flaviab@ioc.fiocruz.br

† These authors contributed equally to this work.

TABLE 1

Laboratory confirmation of dengue-suspected cases analyzed from epidemics that occurred in 2010 and 2013, in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

Dengue laboratory diagnostic methods	Year	
	2010 (n = 24)	2013 (n = 70)
	Positive/tested (%)	Positive/tested (%)
MAC-ELISA	16/24 (66.7)	44/70 (62.8)
NS1 ELISA	11/24 (45.8)	27/70 (38.5)
RT-PCR (serotypes)	16/24 (66.7) (DENV-2; 16/16)	34/70 (48.5) (DENV-4; 34/34)

DENV = dengue virus; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; MAC = IgM antibody capture; NS1 = nonstructural protein 1; RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction.

CSN196/96 from the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (CEP 274/05 and CEP100/00) and by the Ethics Committee of Plataforma Brasil, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ; CAAE 13318113.7.0000.5248). All participants provided a written consent.

**Enrollment, data and specimen collection.** The specimens (serum and plasma) analyzed in this study were collected during ongoing epidemics that occurred in 2010 and 2013, in the city of Campos dos Goytacazes. Patients were assisted at the Hospital Plantadores de Cana, where an infectious disease physician collected data on demographic characteristics, symptoms, and physical signs using a structured questionnaire. Dengue-suspected cases (n = 153, 49 in 2010 and 104 in 2013) were obtained during an active surveillance performed by the Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ. Laboratory diagnosis was performed by the Flavivirus Laboratory, Regional Reference Laboratory for the Brazilian Ministry of Health, located in RJ. Acute serum samples (up to the 7th day after the disease onset) were subjected to reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and nonstructural protein 1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (NS1 ELISA). Convalescent samples (after the 7th day after the onset of the symptoms) were tested using IgM antibody capture ELISA (MAC-ELISA) and IgG-ELISA. Both acute and convalescent serum samples were stored at -70°C. Non-specific laboratory investigations for all patients were obtained in the hospital in which they were treated and included hemoglobin test, WBC count, platelet count, liver function tests (aspartate aminotransferase [AST] and alanine aminotransferase [ALT]), renal function tests, and ultrasonography of abdomen. Each sample was accompanied by an identification form containing demographic information, vital signs, physical examination, complete blood count, liver enzymes, ultrasounds and X-rays findings, history of the previous diseases, and medication use.

**Inclusion criteria for World Health Organization dengue case definition.** Dengue-confirmed cases were classified according to the 2009 World Health Organization (WHO) classification<sup>13,15</sup> and grouped as follows: dengue without warning signs (DwoWS)—patients living in and/or traveling to dengue-endemic area, presenting fever, and two of the following symptoms: nausea, vomiting, rash, aches, pain, positive tourniquet test, and leukopenia; dengue with warning signs (DwWS)—dengue patients with any of the following warning signs: abdominal pain or tenderness, persistent vomiting, clinical fluid accumulation, mucosal bleeding, lethargy or restlessness, liver enlargement > 2 cm, and an increase in hematocrit concurrent

with rapid decrease in platelet count; severe dengue (SD)—dengue patients presenting at least one of the following: severe plasma leakage (leading to shock and fluid accumulation with respiratory distress), severe bleeding evaluated by clinicians, severe involvement of liver by AST or ALT > 1,000 U, central nervous system with impaired consciousness, and severe involvement of the heart and other organs. Non-dengue cases, excluded after a negative result by all dengue laboratory diagnosis, were considered in this study as other febrile diseases (OFD).

**Dengue infection laboratory diagnosis.** Laboratory-positive dengue infection was defined as patients experiencing a febrile illness consistent with dengue according to WHO criteria, and infection confirmed based on the results

TABLE 2

Characteristics of dengue-suspected cases from epidemics that occurred in 2010 and 2013, in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

	Epidemic year (total of cases analyzed)	
	2010 (n = 49)	2013 (n = 104)
	Positive/tested (%)	Positive/tested (%)
Case characteristics		
Dengue	24/49 (49.0)	70/104 (67.3)
Mean age (in years)	34	37
Gender (male:female)	29:20	23:62
Case classification*		
DwoWS	13/24 (54.0)	44/70 (63.0)
DwWS	5/24 (21.0)	24/70 (34.2)
SD	3/24 (12.5)	1/70 (1.4)
Infecting serotype		
DENV-2	16/24 (66.7)	0/70
DENV-4	0/24	34/70 (48.6)
Type of infection		
Primary	3/24 (8.9)	11/70 (15.7)
Secondary	18/24 (91.1)	59/70 (84.2)
Factors associated with a more severe disease		
Hospitalization	11/24 (45.8)	16/70 (22.9)
Abdominal pain	10/24 (41.6)	15/70 (21.4)
Plasma leakage	5/24 (20.8)	3/70 (4.3)
Bleeding	6/24 (25.0)	4/70 (5.7)
Pleural effusion	4/24 (16.6)	0/70
Increased hematocrit with rapid decrease of platelets	4/24 (16.6)	4/70 (5.7)
Comorbidity	10/24 (41.6)	27/70 (38.5)
Arterial hypertension	4/10 (40.0)	18/27 (66.7)
Diabetes mellitus	1/10 (10.0)	2/27 (7.4)
Other comorbidities	5/10 (50.0)	16/27 (59.2)

DENV = dengue virus; DwWS = dengue with warning signs; DwoWS = dengue without warning signs; SD = severe dengue.

\*Due to the lack of information for the 2009 World Health Organization clinical classification, three cases were not classified in 2010, and one case was not classified in the 2013 epidemic.

obtained by the laboratory diagnostic assays: RT-PCR, MAC-ELISA, NS1 ELISA, and IgG-ELISA.

**Serological diagnosis. Anti-DENV Ig.** The Panbio dengue IgM Capture ELISA (Brisbane, Australia) was used for the qualitative detection of anti-DENV IgM antibodies in serum for case confirmation according to the manufacturer's instructions.

The IgG-ELISA previously described by Miagostovich and others<sup>16</sup> was performed for the characterization of dengue immune response as primary or secondary infections in dengue cases previously confirmed by virus isolation, RT-PCR, and/or MAC-ELISA. Alternatively, the IgG Select Dx kit (Focus Diagnostics, Carlsbad, CA) was used for characterization of dengue immune response as primary and secondary. In brief, the acute samples presenting an NS1 and/or RT-PCR-positive result with a negative IgG detection were considered as primary infections, and acute samples presenting an NS1 and/or RT-PCR-positive result with a positive IgG detection were classified as secondary ones.

**NS1 ELISA.** For the NS1 antigen capture, the Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA Kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) was used according to the manufacturer's protocol. All NS1-negative samples were submitted to an NS1 immune complex dissociation protocol previously described.<sup>17</sup> All samples were tested between 1 and 9 days after disease onset.

**Molecular methods.** The viral RNA was extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

following the manufacturer's instructions and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for DENV detection and typing. The RT-PCR for detecting and typing DENV was performed as described previously.<sup>18</sup> Those samples (OFD) tested negative by all dengue laboratory diagnosis were also subjected to an RT-PCR for detection of other flaviviruses and alphaviruses according to a previously published protocol.<sup>19</sup> Aiming to further exclude DENV infection in all negative cases (OFD), samples were tested by using Simplexa™ Dengue Kit, a real-time RT-PCR assay (Focus Diagnostics, Cypress, CA), according to the manufacturer's protocol, for qualitative detection and typing of DENV.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The Kruskal-Wallis non-parametric test and Dunn's multiple comparison test were used to compare the differences between study groups (OFD, DwWS, and DwWS/SD). Fisher's test was used to compare clinical and laboratory characteristics between patient groups. Correlation was estimated by Spearman regression analysis. Values of  $P < 0.05$  were considered as significant for all statistical analysis.

## RESULTS

**The 2010 epidemic.** During the 2010 epidemic that occurred in Campos dos Goytacazes, a total of 49 dengue-suspected cases were investigated. DENV infection was

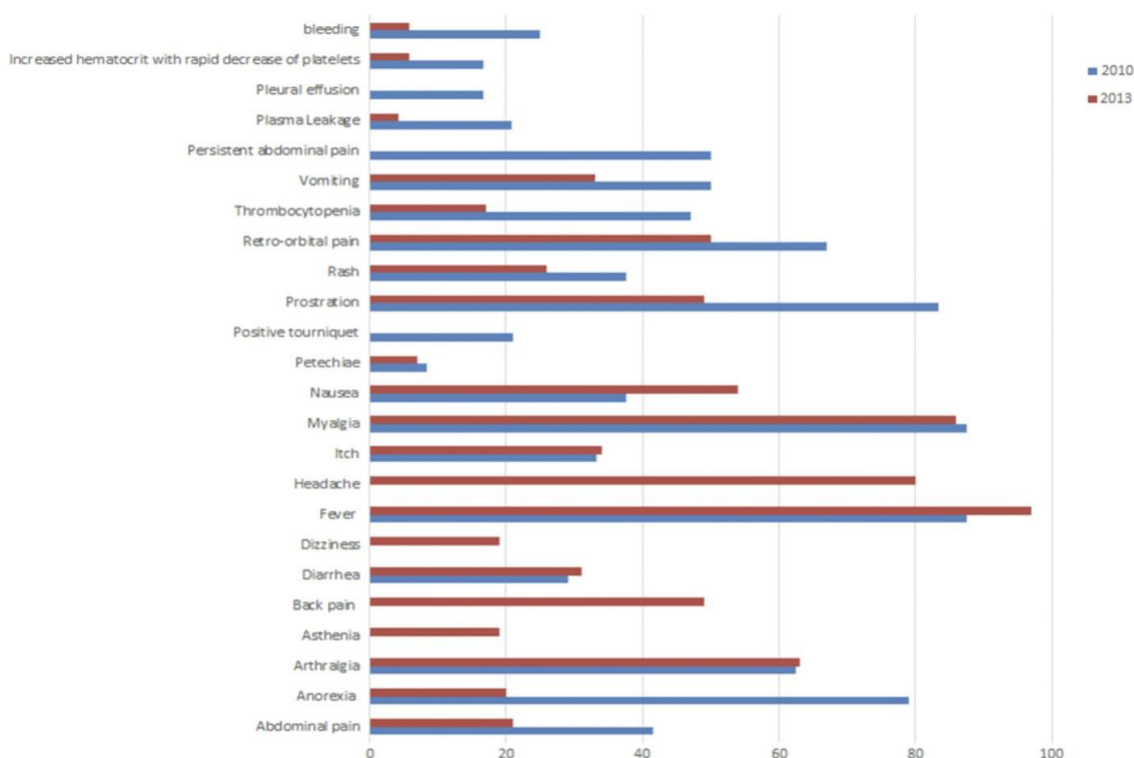


FIGURE 1. Major signs and symptoms of dengue cases. This figure appears in color at [www.ajtmh.org](http://www.ajtmh.org).

confirmed in 49.0% (24/49) of the cases, and 51.0% (25/49) were characterized as OFD. By RT-PCR and MAC-ELISA, 66.7% (16/24) of the cases were confirmed and 45.8% (11/24) by NS1 ELISA (Table 1).

All positive cases detected occurred between the 1st and 8th day of disease. According to the 2009 WHO clinical criteria, confirmed cases ( $n = 24$ ) were classified as DwoWS (54.0%, 13/24), DwWS (21.0%, 5/24), and SD (12.5%, 3/24) (Table 2). Males were more affected than females; however, irrespective of gender, the mean age of patients was 34 years. DENV-2 was the only infecting serotype identified in 66.7% (16/24) of the cases. Secondary infections were prevalent (91.1%, 18/24) when compared with the primary ones (8.9%, 3/24). Hospitalizations occurred in 45.8% (11/24) of the cases, and 41.6% (10/24) of the patients presented comorbidity (Table 2).

The main signs and symptoms of patients were fever (87.5%), myalgia (87.5%), prostration (83.3%), anorexia (79.1%), retro-orbital pain (67%), arthralgia (62.5%), vomiting (50.0%), thrombocytopenia (47.0%), nausea (37.5%), rash

(37.5%), itch (33.3%), diarrhea (29.1%), positive tourniquet (21.0%), and petechiae (8.3%). The most common warning signs of DwWS and SD patients were hemorrhagic manifestations (60.0%, 6/10), persistent abdominal pain (50.0%, 5/10), pleural effusion (40.0%, 4/10), and increased hematocrit with rapid decrease of platelets (40.0%, 4/10) (Figure 1).

It was observed that the DwWS/SD patients from the epidemic that occurred in 2010 and mainly caused by DENV-2 had significantly lower leukocytes and platelet counts ( $P < 0.001$ ) when compared with OFD patients; however, no statistically significant differences between monocyte count and hematocrit was observed (Figure 2). Thrombocytopenia was observed in 41.6% (10/24) of the total number of confirmed dengue cases, with 20.0% (2/10) occurring in DwoWS patients and 80.0% (8/10) in DwWS/SD ones. The platelet count  $< 50,000/mm^3$  was observed in 75% (6/8) of the DwWS/SD patients.

The analysis of the AST revealed high levels in 33.3% (8/24) of patients during the 2010 epidemic, of these,

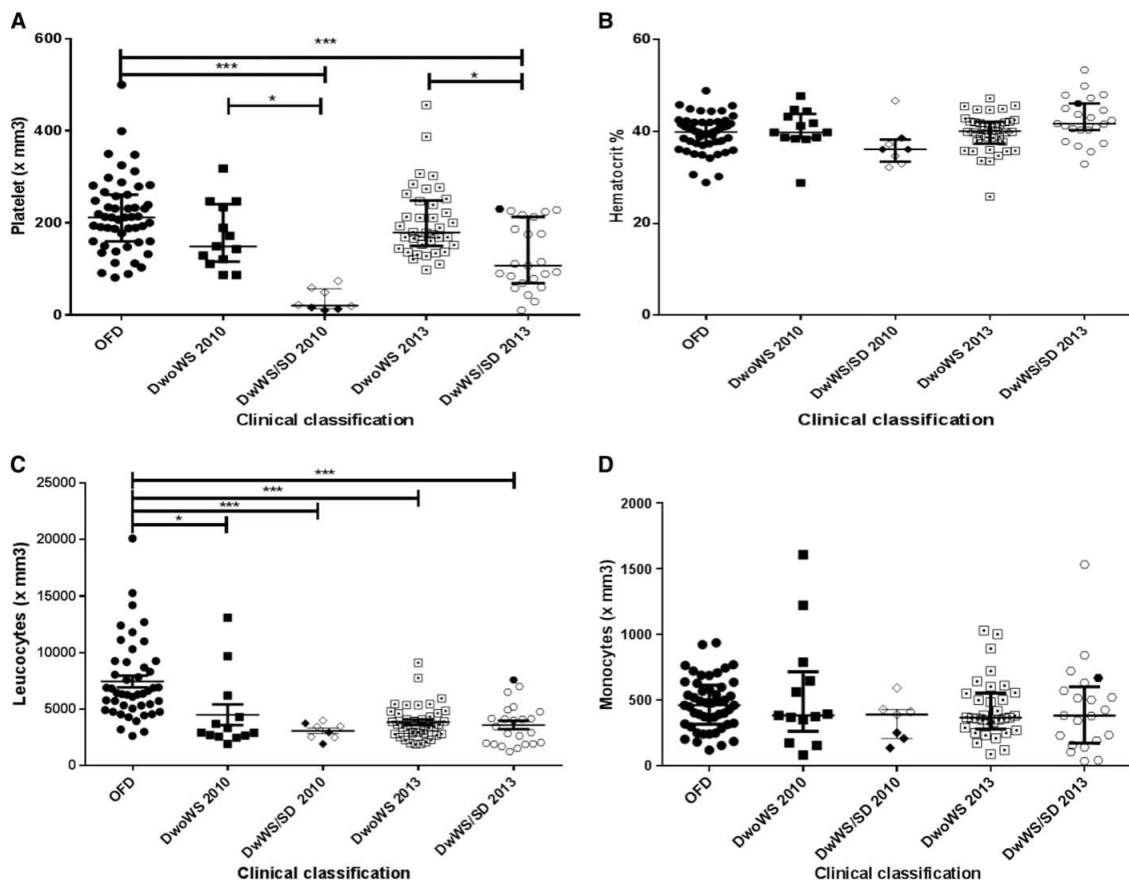


FIGURE 2. Hematological parameters of dengue-positive cases according to clinical classification and epidemic, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. (A) Platelet, (B) hematocrit, (C) leucocytes, and (D) monocytes. SD/2010 (◆) and SD/2013 (●). DwoWS = dengue without warning signs; DwWS = dengue with warning signs; OFD = other febrile disease; SD = severe dengue.  $P$  values \*  $< 0.05$ , \*\*  $< 0.01$ , and \*\*\*  $< 0.001$  were considered statistically significant.

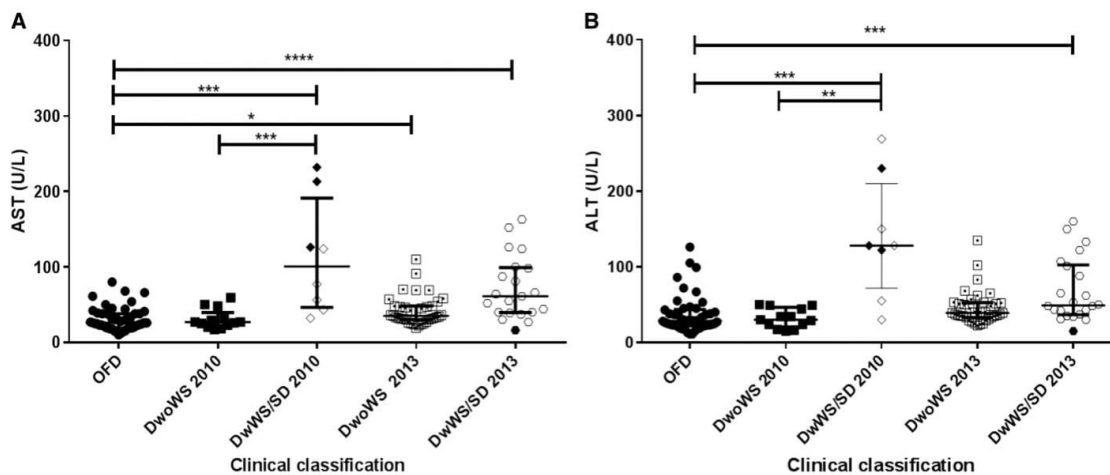


FIGURE 3. Biochemicals of dengue-positive cases according to the clinical classification and epidemic, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. (A) AST and (B) ALT. SD/2010 (◆) and SD/2013 (●). AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; DwoWS: dengue without warning signs; DwWS = dengue with warning signs; OFD = other febrile disease; SD = severe dengue.  $P$  values \*  $< 0.05$ , \*\*  $< 0.01$ , \*\*\*  $< 0.001$ , and \*\*\*\*  $< 0.0001$  were considered statistically significant.

62.5% (5/8) were DwWS/SD patients and 37.5% (3/8) were DwoWS ones. The high AST levels in DwWS/SD patients were statistically significant when compared with the OFD patients ( $P < 0.001$ ) (Figure 3). The ALT analysis revealed elevated levels in 37.5% (9/24) of the dengue cases, 50.0% (4/8) DwoWS patients and 50.0% (4/8) DwWS/SD, and no significant differences among the groups were observed.

**The 2013 epidemic.** In 2013, a total of 104 dengue-suspected cases were analyzed, and 67.0% (70/104) were confirmed and 33.0% (34/104) of the cases were considered as OFD. Using MAC-ELISA, 62.8% (44/70) of the infections were confirmed, and RT-PCR confirmed 48.5% (34/70) of the cases and the NS1 ELISA 38.5% (27/70) (Table 1). However, when the serum samples of DENV-4 cases negative by NS1 ELISA were heat dissociated, the test sensitivity increased in 18.5%. According to the 2009 WHO clinical criteria, confirmed cases ( $n = 70$ ) were classified as DwoWS (63.0%, 44/70), DwWS (34.2%, 24/70), and SD (1.4%, 1/70) (Table 2).

In the 2013 epidemic, females were more affected than males; however, irrespective of gender, the mean age of patients was 37 years. DENV-4 was the only infecting serotype identified in 48.6% (34/70) of the cases. Secondary infections were prevalent (84.2%, 59/70) when compared with the primary ones (15.7%, 11/70). Hospitalizations occurred in 22.9% (16/70) of the cases, and 38.5% (27/70) of the patients presented comorbidity. Moreover, abdominal pain, plasma leakage, bleeding, and pleural effusion, the signs involved in a more severe disease, were less frequently observed than in the 2010 epidemic (Table 2).

The main signs and symptoms of patients were fever (97%), myalgia (86%), headache (80%), arthralgia (63%), nausea (54%), retro-orbital pain (50%), back pain (49%), prostration (49%), abdominal pain (37%), itch (34%), vomiting (33%), diarrhea (31%), rash (26%), anorexia (20%), dizziness (19%), asthenia (19%), thrombocytopenia (17%), and petechiae (7%) (Figure 1).

DwoWS/SD patients from the epidemic that occurred in 2013 and mainly caused by DENV-4 had significantly lower platelet and leukocyte counts ( $P < 0.001$ ) when compared with OFD patients. Furthermore, the differences in the platelet counts between the DwoWS and DwWS/SD were also significant ( $P < 0.05$ ) (Figure 2).

Thrombocytopenia was observed in 17.1% (12/70) of the total number of dengue cases, of these, 8.3% (1/12) were DwoWS patients and 91.7% (11/12) were DwWS/SD ones. Low platelet counts were observed in 25.0% (3/12) of patients, all with DwWS. Both DwoWS and DwWS/SD patients presented lower counts than the OFD patients ( $P < 0.001$ ); however, no significant difference was observed in relation to the hematocrit and monocyte values (Figure 5).

During the 2013 epidemic, increased AST was observed in 42.8% (30/70) of dengue cases, 53.3% (16/30) were patients with DwoWS and 46.6% (14/30) were DwWS ones, whereas the increased ALT levels were also observed in 42.8% (30/70) of the cases, 50% (15/30) were DwoWS cases and 50% (15/30) were DwWS ones.

Both high AST levels observed in DwoWS and DwWS/SD patients in 2013 were statistically significant when compared with the OFD patients ( $P < 0.05$  and  $P < 0.0001$ , respectively); however, no significant differences were observed between DwoWS and DwWS/SD cases (Figure 3). Elevated levels of ALT were statistically significant on DwWS/SD patients on 2013 when compared with the OFD cases ( $P < 0.001$ ) (Figure 3).

In an overall overview, independently of the clinical classification, the lower platelet count observed in the 2010 epidemic caused by DENV-2 was statistically significant when compared with that observed in the cases occurred in the 2013 epidemic ( $P < 0.05$ ). Likewise, the lower leukocyte count observed in both epidemics was significant, when compared with the OFD cases ( $P < 0.001$ ). Moreover, in both epidemics, both AST and ALT levels were higher when compared with the OFD group (Figure 4). Independently of



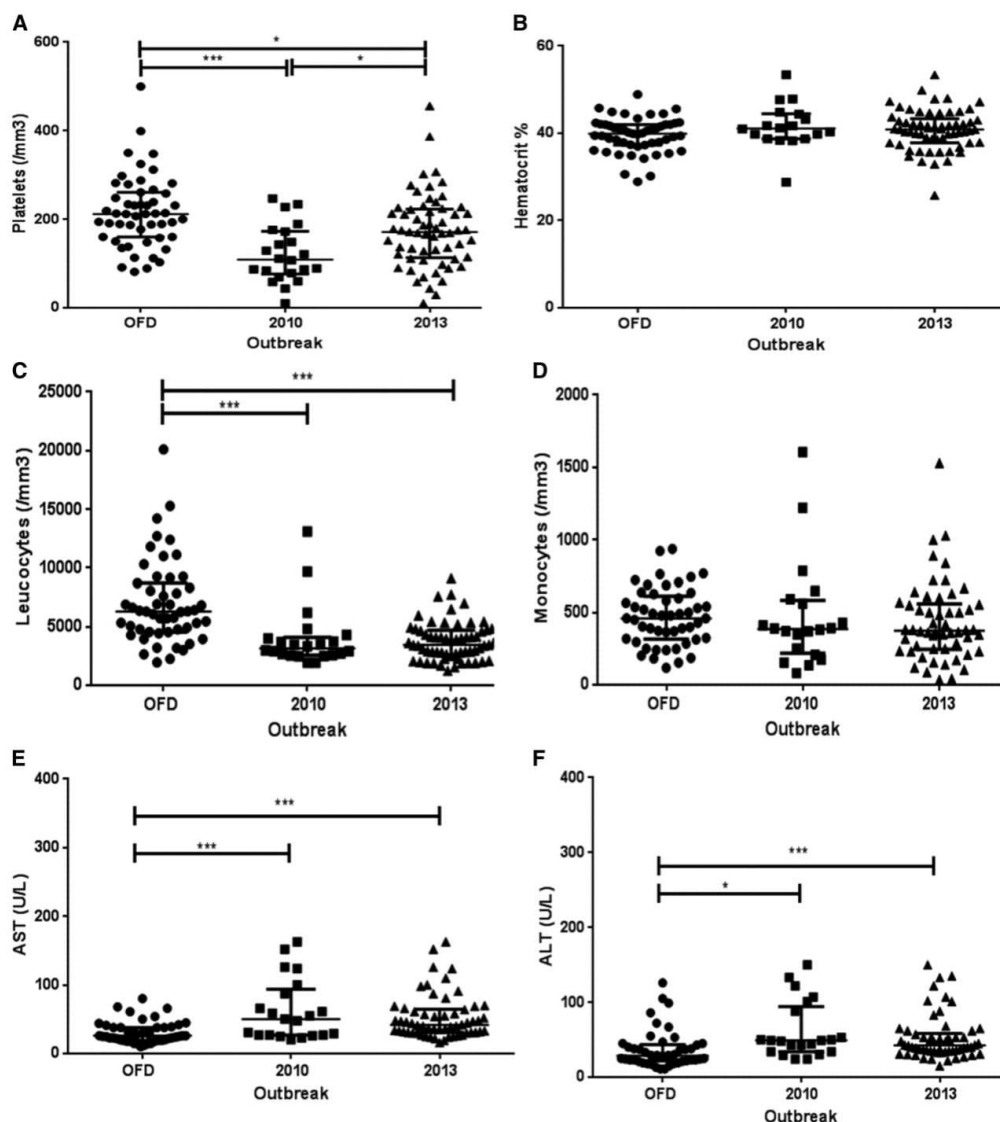


FIGURE 4. Hematological and biochemical findings of dengue-positive cases according to the epidemics, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. (A) Platelets, (B) hematocrit, (C) leucocytes, (D) monocytes, (E) AST and (F) ALT. AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; OFD = other febrile disease.  $P$  values \*  $< 0.05$ , \*\*  $< 0.01$ , and \*\*\*  $< 0.001$  were considered statistically significant.

the epidemic year, patients presenting DwWS/SD showed lower platelet and leukocyte counts considering both DwWS and OFD groups ( $P < 0.001$ ) and higher AST and ALT levels (Figure 5).

#### DISCUSSION

In Brazil, dengue transmission has been occurring continuously since 1986, with occurrence of outbreaks and

epidemics, usually associated with the introduction of new serotypes in previously unaffected areas or serotype re-emergences. The years of 2010 and 2013 were characterized by two of the largest dengue epidemics reported in the country, when about 1 and 1.4 million cases were reported, respectively. Moreover, despite the introduction of DENV-4 in 2010, this serotype was prevalent in 2013 and was responsible mostly for the mild cases.<sup>10</sup> In this study, dengue infection was confirmed in 61.4% (94/153) of suspected cases

2. 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.
3. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW, 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8 (Suppl): S7–S16.
4. Pan American Health Organization (PAHO), 2016. *Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country: Epidemiological Week/EW 5 February 3, 2016*. Washington, DC: PAHO.
5. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL, 1983. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report [in Portuguese]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 25: 53–54.
6. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP, 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro: 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 245–246.
7. Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML, 2009. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 25 (Suppl 1): S7–S18.
8. Nogueira RM, Eppinghaus AL, 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 255–256.
9. Heringer M, Nogueira RM, de Filippis AM, Lima MR, Faria NR, Nunes PC, Nogueira FB, dos Santos FB, 2015. Impact of the emergence and re-emergence of different dengue viruses' serotypes in Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 109: 268–274.
10. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS), 2014. *Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2014*. Brasília, Brazil: SVS/MS
11. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS), 2011. *Dengue: diagnóstico e manejo clínico—adulto e criança*, 4th edition. Brasília, Brazil: Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão/Ministério da Saúde.
12. Rothman AL, 2004. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113: 946–951.
13. World Health Organization (WHO), 2009. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. New edition. Geneva, Switzerland: WHO.
14. Teixeira MG, Barreto ML, 2009. Diagnosis and management of dengue. *BMJ* 339: b4338.
15. Faria NRC, Solorzano VEF, Nogueira RMR, Chouin-Carneiro T, Nunes PCG, Simoes JBS, Nogueira FB, Lima MRQ, Pinto LMO, Kubelka CF, da Cunha RV, de Azeredo EL, dos Santos FB, 2016. Dengue epidemics in two distinct periods reveal distinct epidemiological, laboratorial and clinical aspects in a same scenario: analysis of the 2010 and 2013 epidemics in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 110: 228–236.
16. Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ES, Vorndam V, 1999. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol* 14: 183–189.
17. Lima MRQ, Nogueira RMR, de Filippis AMB, Nunes PCG, de Sousa CS, da Silva MH, dos Santos FB, 2014. 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* 204: 105–108.
18. Lanciotti 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.
19. de Moraes Bronzoni RV, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Moraes Figueiredo LT, 2005. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol* 43: 696–702.
20. Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, Janisch T, Kroeger A, Lum LC, Martinez E, Siqueira JB, Thuy TT, Villalobos I, Villegas E, Wills B; European Union, World Health Organization (WHO-TDR) supported DENCO Study Group, 2011. Multicentre prospective study on dengue classification in four south-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health* 16: 936–948.
21. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, Jarman RG, Green S, Rothman AL, Cummings DA, 2010. 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* 4: e617.
22. Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, de Souza LJ, Guimaraes FR, de Araujo ES, De Simone TS, Baran M, Teixeira G, Miagostovich MP, 2005. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 11: 1376–1381.
23. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB, Feres VC, Rocha B, Levi JE, Souza VA, Boas LS, Pannuti CS, Martelli C, Césaire R, 2008. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis* 197: 817–824.
24. Honorio NA, Nogueira RMR, Codeco CT, Carvalho MS, Cruz OG, Magalhaes Mde A, de Araujo JM, de Araujo ES, Gomes MQ, Pinheiro LS, da Silva Pinel C, Lourenco-de-Oliveira R, 2009. Spatial evaluation and modeling of dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e545.
25. Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, Najjioullah 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.
26. Murgue B, Cassar O, Guigon M, Chungue E, 1997. Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *J Infect Dis* 175: 1497–1501.
27. Basu A, Jain P, Gangodkar SV, Shetty S, Ghosh K, 2008. Dengue 2 virus inhibits in vitro megakaryocytic colony formation and induces apoptosis in thrombopoietin-inducible megakaryocytic differentiation from cord blood CD34+ cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53: 46–51.
28. Tsai JJ, Jen YH, Chang JS, Hsiao HM, Noisakran S, Perng GC, 2011. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun* 3: 530–540.
29. Nakao S, Lai CJ, Young NS, 1989. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood* 74: 1235–1240.
30. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS, 2006. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol* 19: 127–132.
31. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza PT, Bozza FA, 2013. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost* 11: 951–962.
32. Jameel T, Mehmood K, Mujtaba G, Choudhry N, Afzal N, Paul RF, 2012. Changing haematological parameters in dengue viral infections. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 24: 3–6.
33. Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT, 1997. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res Virol* 148: 273–277.
34. Trung DT, Thao LTT, Hien TT, Hung NT, Vinh NN, Hien PT, Chinh NT, Simmons C, Wills B, 2010. Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 83: 774–780.
35. Lee LK, Gan VC, Lee VJ, Tan AS, Leo YS, Lye DC, 2012. Clinical relevance and discriminatory value of elevated liver aminotransferase levels for dengue severity. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1676.
36. Roy A, Sarkar D, Chakraborty S, Chaudhuri J, Ghosh P, Chakraborty S, 2013. Profile of hepatic involvement by dengue virus in dengue infected children. *N Am J Med Sci* 5: 480–485.
37. Itha S, Kashyap R, Krishnani N, Saraswat VA, Choudhuri G, Aggarwal R, 2005. Profile of liver involvement in dengue virus infection. *Natl Med J India* 18: 127–130.
38. Tanner L, Schreiber M, Low JG, Ong A, Tolfvenstam T, Lai YL, Ng LC, Leo YS, Thi Puong L, Vasudevan SG, Simmons CP, Hibberd ML, Ooi EE, 2008. Decision tree algorithms predict the diagnosis and outcome of dengue fever in the early phase of illness. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e196.

**Artigo 5:** Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: case characterization following its introduction in an endemic region.

- **Objetivos Específicos:** Descrever os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de casos confirmados de DENV-4 após a sua introdução em área endêmica do RJ; e os genótipos de cepas de DENV-4 isoladas no RJ no período estudado.

**Situação do Manuscrito:** Artigo publicado na revista *BMC Infectious Diseases*

**Classificação QUALIS:** Área de Medicina II – A1.

**Referência:** Manoela Heringer, Thiara Manuele A Souza, Monique da Rocha Q Lima<sup>1</sup>, Priscila Conrado G Nunes, Nieli Rodrigues da C Faria, Fernanda de Bruycker-Nogueira, Thaís Chouin-Carneiro, Rita Maria R Nogueira e Flavia Barreto dos Santos.

**Resumo:** Devido à susceptibilidade das populações, a introdução de DENV-4 em 2010, levou à ocorrência de epidemias explosivas nos anos seguintes no Brasil. Em 2011, DENV-4 foi identificado no Rio de Janeiro (RJ) e prevaleceu em 2012 e 2013. Neste estudo, visamos caracterizar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos casos de DENV-4, após esta introdução do sorotipo em um cenário endêmico. Métodos: casos com suspeita de dengue (n = 3727) foram recebidos e analisados de janeiro de 2011 a dezembro de 2013, durante os surtos ocorridos em RJ, no Brasil. As amostras foram submetidas a métodos virológicos, sorológicos e moleculares para confirmação laboratorial. Casos de DENV-4 (n = 705) foram caracterizados de acordo com o tipo de infecção, gravidade da doença, viremia e antigenemia de NS1. Cepas representativas foram sequenciadas parcialmente para genotipagem. Resultados: DENV-4 foi identificado em 44,2% (705/1593) de casos de dengue, e o vírus foi isolado em 48,7% dos casos. A IgM anti-DENV foi detectada em 39,4% dos casos, porém uma maior detecção foi observada em casos com  $\geq 4$  dias de sintomas (57,0%). O antígeno NS1 foi identificado em 41,5% dos casos de DENV-4, no entanto, após a dissociação de imune complexos, a detecção aumentou significativamente (87,6%). As mulheres foram mais afetadas do que os homens, assim como as crianças entre 11 e 15 anos de idade. Os casos primários foram mais frequentemente observados do que os secundários e a maioria deles foi classificada

como dengue sem sinais de alerta. Não foram observadas diferenças na antigenemia NS1 e na viremia dentre os grupos. Apesar da maior frequência de doença grave em indivíduos com 65 anos de idade, não foram observadas diferenças entre os grupos e o tipo de infecção. No entanto, os casos fatais de DENV-4 foram mais frequentes em infecções secundárias (57,1%). O Genótipo II foi identificado, com uma provável origem da Venezuela e Colômbia. Conclusões: Foi demonstrado que o diagnóstico laboratorial ainda é uma ferramenta confiável para a vigilância da doença, detectando e confirmando epidemias emergentes. Apesar da ocorrência de infecções secundárias, a maioria dos casos de DENV-4 apresentou doença branda. Como o RJ é endêmico para a dengue, esperam-se altas taxas de infecções secundárias. Apesar da existência de dois genótipos, apenas o Genótipo II foi identificado em nosso estudo.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: case characterization following its introduction in an endemic region

Manoela Heringer<sup>1</sup>, Thiara Manuele A Souza<sup>1</sup>, Monique da Rocha Q Lima<sup>1</sup>, Priscila Conrado G Nunes<sup>1</sup>, Nieli Rodrigues da C Faria<sup>1</sup>, Fernanda de Bruycker-Nogueira<sup>1</sup>, Thaís Chouin-Carneiro<sup>1</sup>, Rita Maria R Nogueira<sup>2</sup> and Flavia Barreto dos Santos<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Due to the populations' susceptibility, DENV-4 introduction in 2010 led to the occurrence of explosive epidemics in the following years in Brazil. In 2011, DENV-4 was identified in Rio de Janeiro (RJ) and it was prevalent in 2012 and 2013. Here, we aimed to characterize clinical, epidemiological and laboratorial aspects of DENV-4 cases after this serotype introduction in an endemic scenario.

**Methods:** Dengue suspected cases ( $n = 3727$ ) were received and analyzed from January 2011 to December 2013, during outbreaks occurred in RJ, Brazil. Samples were submitted to virological, serological and molecular methods for case confirmation. DENV-4 cases ( $n = 705$ ) were characterized according to the type of infection, disease severity and, viremia levels and NS1 antigenemia were accessed. Representative strains were partial sequenced for genotyping.

**Results:** DENV-4 was identified in 44.2% (705/1593) of dengue positive cases, virus isolated in 48.7% of the cases. Anti-DENV IgM was detected in 39.4% of the cases, however an increased detection was observed in cases with  $\geq 4$  days of symptoms (57.0%). NS1 antigen was identified in 41.5% of DENV-4 cases however, after immune complexes dissociation, the detection significantly increased (87.6%). Females were more affected than males, so did children aged 11–15 years old. Primary cases were more frequently observed than secondary ones and most of them were classified as dengue. No differences on NS1 antigenemia and viraemia within the groups were observed. Despite the higher frequency of severe disease on individuals  $>65$  years old, no differences were observed among the groups and type of infection. However, DENV-4 fatal cases were more frequent on secondary infections (57.1%). DENV-4 Genotype II was identified with a probable origin from Venezuela and Colombia.

**Conclusions:** It has been shown that laboratorial diagnosis is still a reliable tool for the disease surveillance, detecting and confirming emerging epidemics. Despite the occurrence of secondary infections, most DENV-4 cases presented a mild disease. As RJ is endemic for dengue, high rates of secondary infections would be expected. Despite the existence of two genotypes, only Genotype II was identified in our study.

**Keywords:** Dengue virus type 4, Laboratorial diagnosis, Phylogeny, Endemic, Rio de Janeiro, Brazil

\* Correspondence: flaviab@ioc.fiocruz.br

<sup>1</sup>Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21045-360, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Dengue is one of the most important arboviruses in the world and the World Health Organization (WHO) estimates that between 70 and 500 million people are annually infected worldwide [1]. Dengue viruses (DENV 1–4) belong to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* [2] and based on the analysis of the envelope gene sequences [3, 4] or complete sequencing of the viral genome [5], four genotypes are characterized for DENV-4: Genotype I represented by strains from Thailand, Philippines, Sri Lanka and Japan (from Southeast Asia); Genotype II represented by strains from Indonesia, Malaysia, Tahiti, the Caribbean and the Americas; Genotype III represented by recent strains in Thailand that were different from the others; and Genotype IV represented by wild strains of Malaysia [3–5].

After 63 years without reported cases in Brazil, reinfestation by vector *Aedes aegypti* in the 70's led to epidemics in Boa Vista, Roraima in 1981–1982 [6]. However, dengue became a public health problem in the country when the DENV-1 was identified in the serum of patients in an epidemic in the state of Rio de Janeiro (RJ) in 1986 [7]. The introduction of DENV-2 in 1990, also in the state of RJ [8], led to an increase in the disease severity and the first dengue hemorrhagic fever (DHF) cases were reported in the country [9]. DENV-3 introduction in RJ and in the country in 2000 caused one of the most severe epidemics reported in the country in 2002 [10, 11]. In 2007–2008, the country experienced the most severe epidemic in terms of morbidity and mortality, in addition to severe cases in children due to the DENV-2 re-emergence. RJ alone was responsible for 255,818 cases [12–14]. In 2009, DENV-1 re-emerged in the southeast region of the country and it was the serotype detected in 50.4% of the viral isolations, displacing DENV-2 and DENV-3 [15]. In July of 2010, DENV-4 was isolated in Roraima [16], 28 years after its first detection in that same State and soon this serotype spread other States, including RJ [17]. Despite the epidemic caused by DENV-1, DENV-4 could be isolated during the disease surveillance supported by the performed laboratorial diagnosis. Due to the populations' susceptibility to this newly introduced serotype, explosive epidemics in the country were a real threat. Furthermore, despite being known as a mild serotype, the impact of the emergence of DENV-4 in an endemic region where the other three serotypes were circulating was unknown. This study aimed to analyze the epidemiology of DENV-4 cases occurring in Rio de Janeiro after this serotype introduction, the role of the different laboratory methodologies for case confirmation, the association of viremia and NS1 antigenemia with disease severity and the surveillance of the circulating genotype.

## Methods

### Dengue suspected cases

Dengue suspected cases were received during a surveillance program performed by the Flavivirus Laboratory, Oswaldo

Cruz Institute, FIOCRUZ, Regional Reference Laboratory for the Brazilian Ministry of Health, located in RJ, from January 2011 to December 2013. Acute serum samples (up to the 7th day after the onset of the symptoms) stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  were submitted for virus isolation, RT-PCR and NS1 antigen capture ELISA. Convalescent samples (> the 7th day after the onset of the symptoms) stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  were tested for MAC-ELISA and IgG-ELISA tests.

### Dengue cases classification

Dengue confirmed cases were classified according to the 2009 WHO classification [18] and grouped as follows: dengue without warning signs: patients living in and/or traveling to dengue endemic area, presenting fever and two of the following symptoms: nausea, vomiting, rash, aches, pain, positive tourniquet test and leukopenia; dengue with warning signs (DWAS): dengue patients with any of the following warning signs: abdominal pain or tenderness, persistent vomiting, clinical fluid accumulation, mucosal bleeding, lethargy or restlessness, liver enlargement  $>2\text{ cm}$ , and an increase in hematocrit concurrent with rapid decrease in platelet count and severe dengue (SD): "dengue patients presenting at least one of the following:" severe plasma leakage (leading to shock and fluid accumulation with respiratory distress), severe bleeding evaluated by clinicians, severe involvement of liver by aspartate aminotransferase (AST) or alanine transferase (ALT)  $>1000\text{ U}$ , central nervous system with impaired consciousness, and severe involvement of the heart and other organs.

### Virus isolation

Virus isolation was performed by inoculation into C6/36 *Aedes albopictus* cell line [19] and isolates were identified by indirect fluorescent antibody test (IFAT) using serotype-specific monoclonal antibodies [20].

### Immunoglobulin M (IgM) antibody capture ELISA (MAC-ELISA)

The Panbio dengue IgM Capture ELISA (E-DEN01M, Brisbane, Australia) was used for the qualitative detection of anti-DENV IgM antibodies in serum for case confirmation according to the manufacturer's instructions.

### Immunoglobulin G (IgG) antibody detection ELISA (IgG-ELISA)

The IgG-ELISA previously described [21] was performed for the characterization of dengue immune response as primary or secondary infections, in dengue cases previously confirmed by virus isolation, RT-PCR and/or MAC-ELISA.

### Viral RNA extraction

Viral RNA was extracted from serum using QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for DENV typing.

**Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)**  
Conventional RT-PCR was performed as described by Lanciotti et al. [22] for DENV detection and typing from acute phase samples.

#### RT-PCR amplification and sequencing of the gene E

For genotyping and phylogenetic analysis, representative samples were selected from the 3 years of epidemic and from distinct regions within the state of Rio de Janeiro. Those DENV-4 isolates ( $n = 12$ ) were partially sequenced (C/prM/M/E genes), Table 1. Five microliters of the extracted RNA was reverse transcribed into cDNA and amplified for sequencing using AccessQuick™ RT-PCR System (Promega Corporation, Wisconsin, USA). The thermocycling parameters consisted of one cycle of reverse transcription (42 C/60 min), followed by 40 cycles of denaturation (94 C/35 s), annealing (59 C/1 min) and extension (72 C/2 min), ending with a final extension cycle (72 C/10 min), in a GeneAmpPCR System 9700 (Applied Biosystems, California, USA). The cDNA fragments amplified by RT-PCR were directly sequenced in both directions using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) version 3.1 and analyzed in an automatic sequencer 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Alignments were performed using CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net/>), by the “Neighbor-joining” method, according to the Tamura-Nei 93 model and Gamma distribution (TN93 + G), with a bootstrap of 1000 replications.

#### Real time RT-PCR assay for viremia quantitation

For the viremia quantification of DENV-4 cases ( $n = 16$  [8 dengue and 8 severe dengue]), the TaqMan assay was

performed as described previously by Johnson [23]. Due to the small number of severe cases, viremia was randomly analyzed only in 8 samples of each group, for comparison purposes.

#### NS1 antigen capture ELISA

For the NS1 antigen capture, the Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA kit (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) was used according to the manufacturer’s protocol. All samples were tested between 1 and 12 days after disease onset. For a better sensitivity for the NS1 capture test, an antigen-antibody complex dissociation protocol performed as previously described by our group [24]. Briefly, the heat-mediated dissociation method was used by boiling 50  $\mu$ L of serum at 100<sup>o</sup> C in a water bath for five minutes.

The NS1 antigenemia quantification was performed using a standard synthetic antigen curve, based on an equation ( $y = 1,321x + 0.1271$ ) with  $R^2 = 0.9542$ . The standard curve was established using synthetic NS1 protein based on the DENV-4 Dominica 814,669/1981 strain (Native Antigen Company, Oxfordshire, United Kingdom) with a 10 fold-dilution. All samples were tested between 1 and 12 days after disease onset.

#### Statistical analysis

The chi-square and/or Fisher exact tests were used to assess the significance between categorical variables by using Epi Info 7.0.9.34 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta).

#### Results

A total of 3727 dengue suspected cases from the state of RJ was analyzed from January 2011 to December 2013. After the confirmatory laboratorial diagnosis, 1593 cases were

**Table 1** DENV-4 strains ( $n = 12$ ) isolated in Rio de Janeiro, from 2011 to 2013 used in this study for partial genome sequencing and genotyping

ID/state/year of isolation	Origin of strain (cell line)	Case classification (WHO, 2009)	Genbank accession number
487_11/RJ/2011	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084510
6338_11/RJ/2011	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084511
1128_12/RJ/2012	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084512
3178_12/RJ/2012	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084513
3603_12/RJ/2012	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084514
5340_12/RJ/2012	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084515
408_13/RJ/2013	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084516
2663_13/RJ/2013	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084517
2848_13/RJ/2013	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084518
2960_13/RJ/2013	Isolated (C6/36)	Severe Dengue (Fatal)	KY084519
3248_13/RJ/2013	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084520
3602_13/RJ/2013	Isolated (C6/36)	Dengue	KY084521

ID Identification, RJ Rio de Janeiro, WHO World Health Organization

confirmed as dengue positive, and 705 (44.2%) due to DENV-4 infections. Not all analysis, such as those by gender, age, immune response and disease severity were performed in all 705 DENV-4 due to the lack of information in some cases.

The highest percentage of the cases received and confirmed in this study were from the Metropolitan Region of RJ (89.9%; 634/705), and the most affected municipalities by DENV-4 in 2011–2013 were Niterói and Rio de Janeiro, followed by Campos dos Goytacazes, located in the North region of the state, where 44.9% (317/705), 36.8% (260/705) and 7.5% (53/705) of infections by this serotype were confirmed, respectively.

The RT-PCR failed to identified DENV-4 in only one sample (Table 2), which was confirmed by virus isolation, that identified the serotype in 48.7% (298/612) of the samples tested. The detection of anti-DENV IgM, considering both acute and convalescent samples, was possible in 39.4% (104/264) of the cases. However, considering cases with  $\geq 4$  days of illness, this marker was detected in 57.0% of the cases. DENV NS1 antigen was identified in 41.5% (231/557) of the DENV-4 cases by using the NS1 antigen capture ELISA according to the manufacturer's instructions, however, after the addition of an antigen-antibody complex dissociation step, the assay sensitivity significantly increased and confirmed 87.6% (488/557;  $p = 0.001$ ) of the samples tested, Table 2.

DENV-4 cases were more frequently observed in females ( $n = 396$ ) than males ( $n = 305$ ), and a higher number of cases were observed on children aged 11–15 year old, and was no significant differences were observed between age groups (Fig. 1).

The patient's immune response characterization in primary or secondary infections was possible in 508 DENV-4 cases, due to the lack of information in some cases allowing this analysis. Overall, primary cases were more frequently observed (259/508; 51.0%) than secondary ones (249/508; 49.0%), and despite the lower number of cases in 2011, no significant differences were observed, Table 3. DENV-4 cases ( $n = 668$ ) were also characterized according to the disease severity. Most of the cases were classified as dengue cases ( $n = 560$ ; 83.8%), 12.8% ( $n = 86$ ) as DWAS

and 3.2% ( $n = 22$ ) as severe dengue according to the 2009 WHO criteria, Fig. 2. The clinical manifestations observed in most cases were fever ( $n = 640$ ; 95.8%), followed by headache ( $n = 574$ ; 85.9%), independent of the disease severity. Among the most common symptoms observed on dengue, no differences were observed in relation to the disease severity (Fig. 3a). When observing the warning symptoms, a higher proportion of abdominal pain in DWAS cases was observed ( $n = 75$ ; 87.2%). Despite this, the proportion of abdominal pain in severe dengue cases was considerably lower ( $n = 3$ ; 13.6%), Fig. 3b.

The NS1 antigenemia on DENV-4 cases ( $n = 138$ ) showed no differences between NS1 levels from dengue, DWAS or severe dengue cases (Fig. 4a). The same was observed on DENV-4 cases previously negative by NS1 ELISA capture and that resulted positive after heat-mediated immune complex dissociation (Fig. 4b). Viremia was also quantified on dengue ( $n = 8$ ) and severe dengue ( $n = 8$ ) cases, however no differences were observed (5.95 log<sub>10</sub> RNA copies/mL and 5.83 log<sub>10</sub> RNA copies/mL, respectively ( $p = 0,001$ )).

A relationship between the disease severity and the type of infection (primary or secondary) was shown. There was a greater proportion of a more severe disease among individuals 65 years old and older, however a paired analysis by age showed no significant difference in risk of more severe disease ( $p > 0.05$ ) nor for secondary infections ( $p > 0.05$ ), Table 4.

Fatal cases due to DENV-4 ( $n = 14$ ) were received and analyzed during the studied period, 42.8% (6/14) occurred in 2012 and 57.1% (8/14) in 2013. Immune response was characterized on 7 cases and, 42.8% (3/7) occurred during a primary infection and 57.1% (4/4), due to secondary ones. Age information was available on 12 cases and, 7 occurred on patients' 16 to 65 years old, Table 5.

The phylogeny based on the partial genome sequencing of representative DENV-4 strains ( $n = 12$ ) isolated in State of Rio de Janeiro, represented by dengue and one fatal case, demonstrated the circulation of DENV-4 Genotype II (Fig. 5).

## Discussion

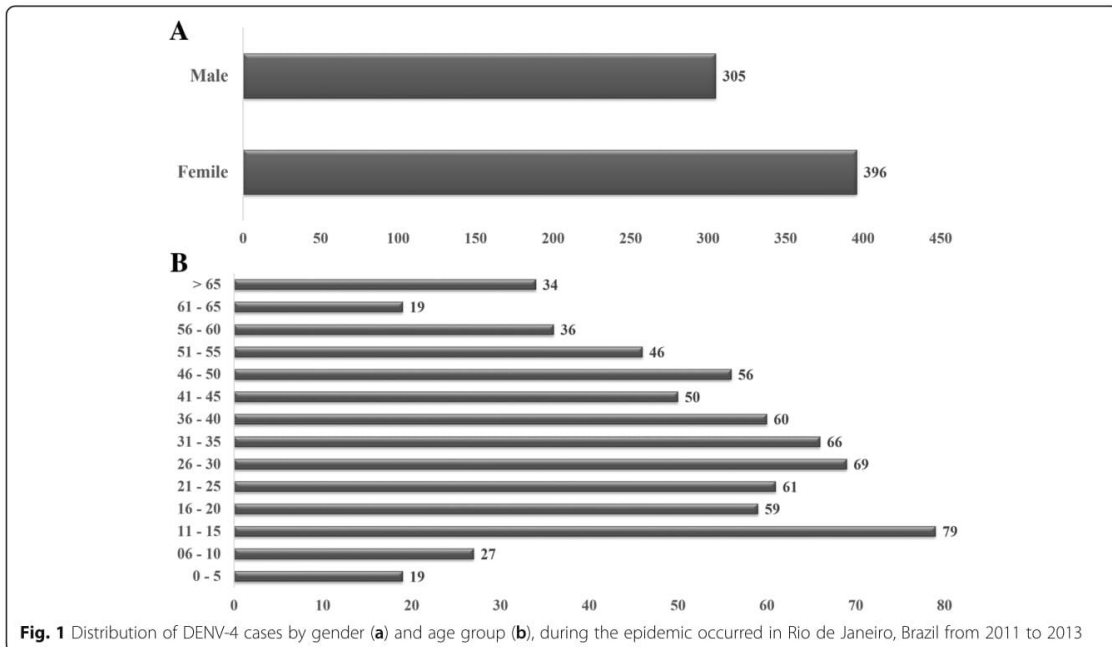
The introduction of DENV-4 in the state of Roraima, North Brazil in 2010 warned for the possibility of a new dengue epidemics in Brazil [16], as the main vector, *Aedes aegypti* is widespread in the country. In the disease surveillance, the identification of the vectors has important implications for the disease outbreak control, especially with the rapid disease spread when a new serotype is introduced.

In 2011, the first isolation of DENV-4 in RJ from cases occurred in the city of Niterói resulted in the emergence of this serotype in the state in 2012, characterized by isolation of this serotype in 48.7% of confirmed cases. That same year showed for, the first time, the co-circulation of the four DENV serotypes in the state. However, in 2013, DENV-4 was responsible for the largest number of cases in the state.

**Table 2** Distribution of DENV-4 cases analyzed in the State of Rio de Janeiro, Brazil, from 2011 to 2013 and confirmed according to the routine laboratorial diagnosis methodologies used

Methodology/Year	Positive cases/ Total analyzed (%)	<i>p</i> value
Virus isolation	298/612 (48.7)	
RT-PCR	704/705 (99.8)	
MAC-ELISA	104/264 (39.4)	
NS1 Capture ELISA	231/557 (41.5)	0.001
NS1 Capture ELISA after dissociation	488/557 (87.6)	





The Metropolitan region of the state was responsible for most cases occurred during the studied period, mainly in the municipalities of RJ and Niterói. This region has a high population density and high-traffic, which partly explains the concentration of the cases studied [12]. Furthermore, as the Flavivirus Laboratory, FIOCRUZ acts as a Regional Reference Laboratory for dengue diagnosis in Brazil, samples from other municipalities were also received and analyzed.

Although viral isolation is considered the “gold standard” method for dengue viral detection, the sensitivity of the molecular methods in detecting the viral genome offers a great advantage during an epidemic period, as shown by the results presented here. However, it is noteworthy that the high percentage of positive results obtained in RT-PCR may be the result of the selection criteria for the analysis in this study, as known DENV-4 cases were selected. Despite this, previous studies have demonstrated the usefulness of RT-PCR to confirm the cases and identification of the infecting serotype, when the virus isolation was not possible [25, 26].

Serological methods are still the most useful tool for the diagnosis of the disease during epidemics, as observed since its establishment in 1986 in Rio de Janeiro [27]. In

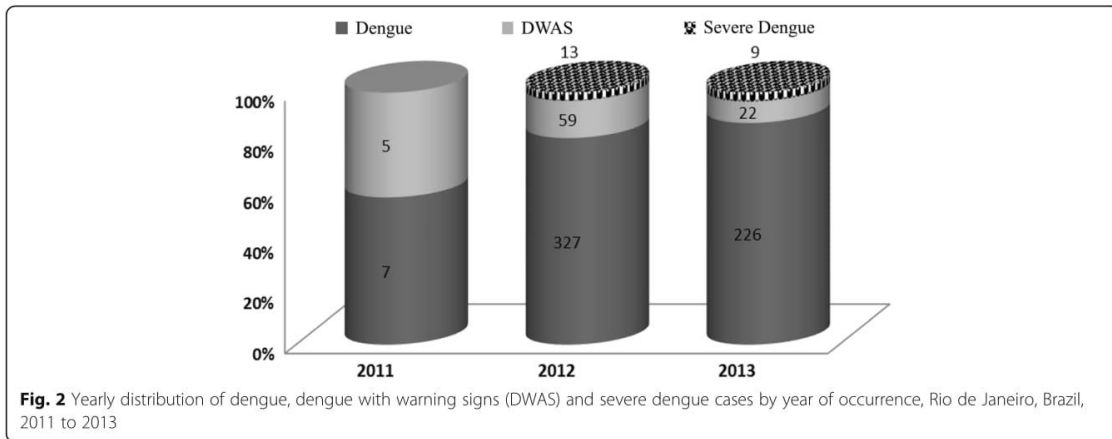
this study, the low detection rate of anti-DENV IgM by ELISA (39.4%) was probably due to the acute nature of the cases selected for analysis, as previously described. When it has been described that patients with a primary infection have evidently undetectable IgM antibody titers and there is an increase in detection from a paired sample in the later disease [9]. Usually, higher anti-DENV IgM detection rates are observed after the sixth day after the onset of symptoms. Therefore, considering cases with  $\geq 4$  days of symptoms, the detection rate significantly increases.

The usefulness of NS1 Ag capture tests for the early diagnosis of dengue, even in limited resourced setting has been shown [28] and evaluated to confirm primary and secondary acute dengue infections [28–31]. In this study, initially, the NS1 capture ELISA detection rate was 41.5% on previously confirmed DENV-4 cases. However, after using a heat immune complex dissociation step, the NS1 detection rate significantly increased to 87.6%, as previously described.

In this study, hemorrhage, shock, increased transaminases levels and central nervous system involvement were considered for severe cases classification. In the study, 3.2% of DENV-4 confirmed cases were classified as severe dengue and 12.8% as dengue with warning signs. We observed that abdominal pain is an important warning sign regarding the evolution of the disease and which can help in the correct patient management and thus, avoiding increased severity and fatal outcome. However, due to the small

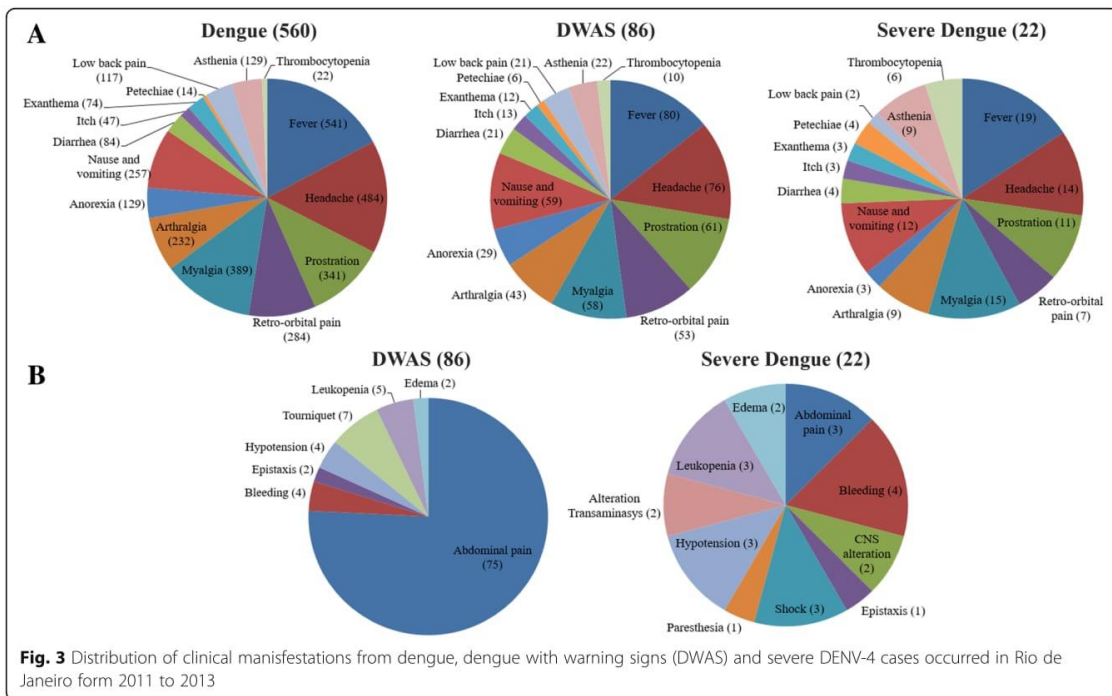
**Table 3** Immune response characterization of DENV-4 cases occurred in Rio de Janeiro from 2011 to 2013

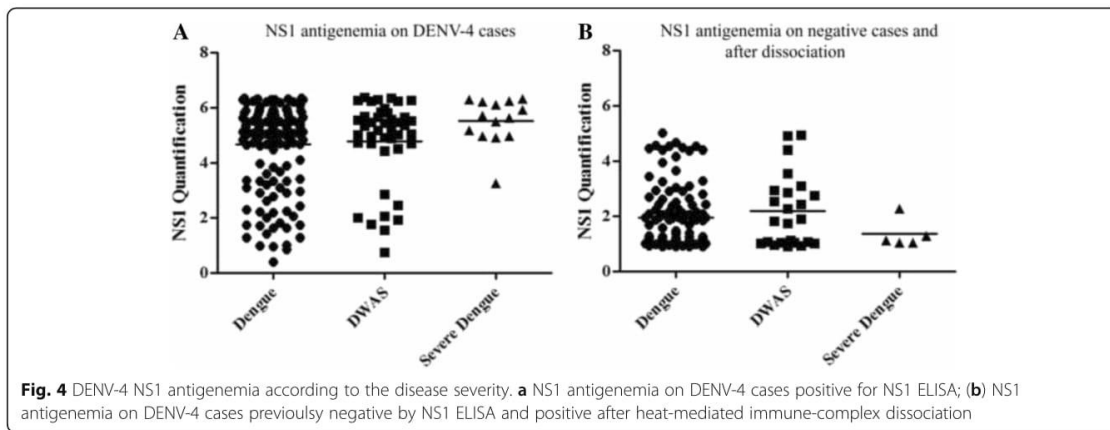
Type of infection (%) /Year	2011 (n = 11)	2012 (n = 397)	2013 (n = 100)	Total (%) (n = 508)
Primary	3 (27.3)	198 (49.9)	58 (58.0)	259 (51.0)
Secondary	8 (72.7)	199 (50.1)	42 (42.0)	249 (49.0)



number of severe cases available in this study, no statistical analysis on the disease severity was performed. Furthermore, during the study period, no increase in the disease severity was observed and this is in agreement with previous observations in the same period in the state of RJ [32]. The lower severity on DENV-4 cases is known [33] and here, 14 deaths due to DENV-4 were confirmed in the period studied.

No significant differences between the viremia on mild dengue and severe cases were observed, which does not corroborate with previous studies analyzing other serotypes [34–36]. However, a limitation of the present study was the small sample size of severe cases. Moreover, the sampling collection represents the patient’s first visit to the health unit and the information on their progression to a more severe disease is not available.





DENV-4 strains isolated from 2011 to 2013, following this serotype introduction and spread in RJ were partially sequenced and the phylogenetic analysis demonstrated that those belong to genotype II. Moreover, based on previous studies, the sampling size sequenced here is reliable for this analysis considering the epidemic duration, site and the low-mutation characteristic of DENV [16, 37]. The strains of genotype II first isolated during the outbreak of 1982 in Roraima, North Brazil [38] did not spread to other states at that time. However, this genotype was once again detected in Roraima in 2010, being circulated through Central America, Northeastern South America and the Caribbean [39]. According to Temporão et al. (2011) [16], these strains of genotype II were genetically different from those isolated in the 1980s in Roraima and demonstrated a probable origin from Venezuela and Colombia. However, Nunes et al. [40] complete and partial DENV-4 sequences isolated in Brazil identified the

circulation of two genotypes (I and II). Genotype II is the most commonly one observed circulating in South America and the Caribbean. Genotype I, on the other hand is represented by a strain isolated in the Northeast of Brazil (Bahia), which may have some evolutionary relationship with Asian strains, according to phylogenetic analysis performed by Campos et al. [41].

**Conclusions**

After the DENV-4 isolation in 2011 in RJ, this serotype spread in the following two years and, the co-circulation of the four DENV was evidenced for the first time in the state. The DENV-4 diagnosis by NS1 ELISA was significantly improved by using an immune complex dissociation step. We observed a low percentage of clinical manifestations related to a more severe disease, and despite the occurrence of secondary infections, immune status and age were not related to a more severe disease. Although two distinct DENV-4 genotypes were already reported circulating in Brazil, in this study, genotype II was the only identified during the period in RJ. The

**Table 4** Analysis of factors associated to DENV-4 cases in Rio de Janeiro, Brazil, from January 2011 to December 2013

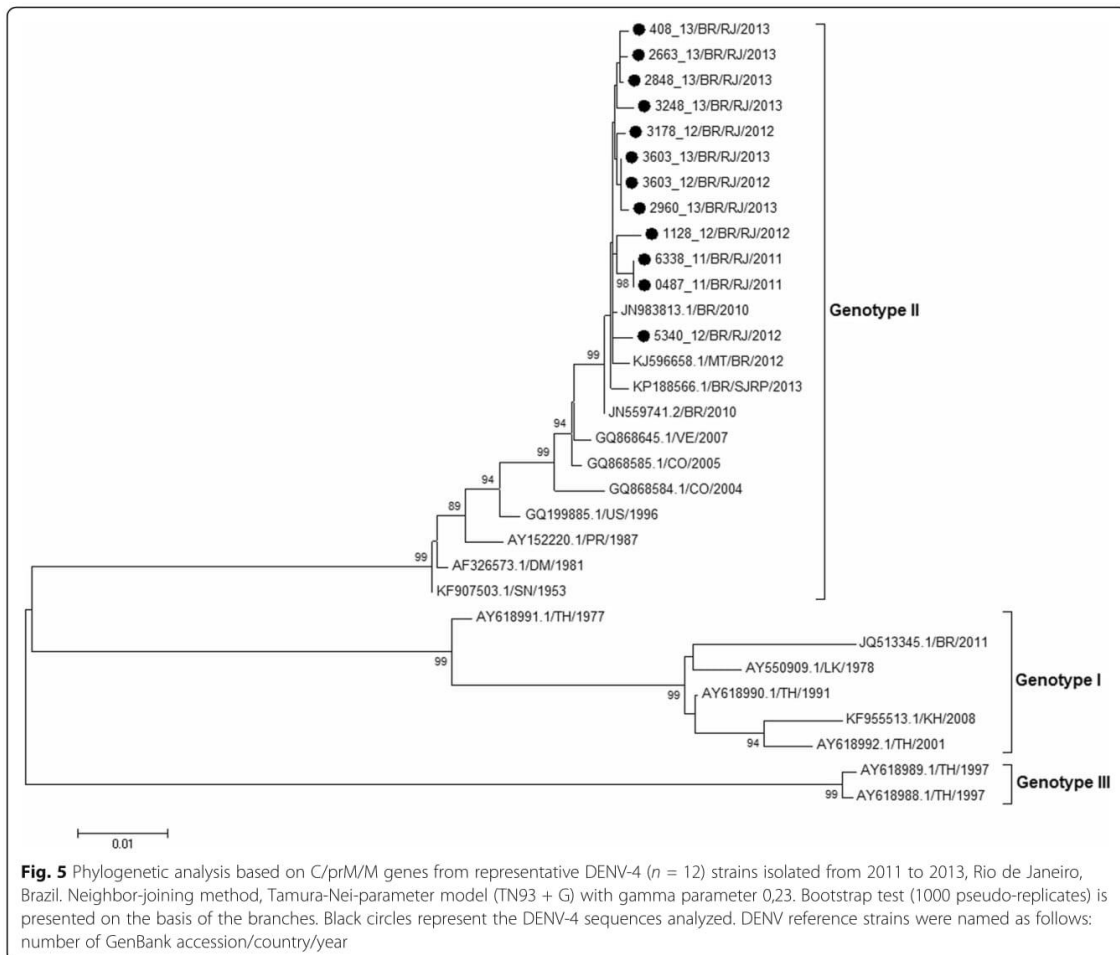
	Dengue		<i>p</i> value*	DWAS		<i>p</i> value*	Severe dengue		<i>p</i> value*
	<i>n</i>	%		<i>n</i>	%		<i>n</i>	%	
Age group (years)									
≤ 15	102	85.0		15	12.5		3	2.5	>0.05
16–64	426	83.8	>0.05	67	13.1	>0.05	15	2.9	
> 65	20	83.3		1	4.1		3	12.5	
Type of infection									
Primary	159	48.6	>0.05	43	50.5	>0.05	5	31.2	>0.05
Secondary	168	51.4		42	49.5		11	68.8	

\*Statistical analysis performed for the comparison of the disease severity to the distinct age groups and type of infection

**Table 5** DENV-4 fatal cases (*n* = 14) occurred from 2011 to 2013 in the State of Rio de Janeiro, Brazil

Year	2012	2013
Type of infection ( <i>n</i> = 7)	<i>n</i>	
Primary ( <i>n</i> = 3)	2	1
Secondary ( <i>n</i> = 4)	3	1
Age group ( <i>n</i> = 12)	<i>n</i>	
≤ 15 ( <i>n</i> = 2)	2	NI
16–65 ( <i>n</i> = 7)	3	4
> 65 ( <i>n</i> = 3)	NI	3

NI not identified



impact of the introduction and emergence of DENV-4 in the state of RJ was not well understood and studies accessing a new DENV serotype circulation in an endemic scenario are needed.

**Abbreviations**

ALT: Alanine transferase; AST: Aspartate aminotransferase; DENV: Dengue Virus; DHF: Dengue hemorrhagic fever; DwWS: Dengue with warning signs; IFAT: Indirect fluorescent antibody test; Ig: Immunoglobulin; RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SD: Severe dengue; WHO: World Health Organization

**Acknowledgements**

To Dr. Ana Maria Bispo de Filippis, Eliane Araújo, Simone Sampaio, José da Costa Farias Filho and Leda Maria do Santos for laboratorial and technical support.

**Funding**

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq [grant number 303822/2015–5] and Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde/PAPES VI-FIOCRUZ [grant number 407690/2012–3], to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ [grant number 210.026/2014 to RMR], to FIOCRUZ, and Brazilian Ministry of Health.

**Availability of data and materials**

The data can be provided from the main author upon request.

**Authors' contributions**

FBS, RMRN and MH design the study. MH, TMAS, MRQL, PCGN, NRFC, FBN and TCC performed the experiments. MH, TMAS, FBN and FBS wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Consent for publication**

Not applicable

**Ethics approval and consent to participate**

The samples belong to a collection from an ongoing Project approved by resolution number CSN196/96 from the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (CEP 274/05), Ministry of Health-Brazil.

**Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Author details**

<sup>1</sup>Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21045-360, Brazil. <sup>2</sup>Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 11 January 2017 Accepted: 23 May 2017

Published online: 09 June 2017

**References**

- World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva 2013; 25–29.
- Lindenbach B, et al. Flaviviridae: The viruses and their replication. PH KDaH, ed. Fields Virology. 2001; 991–1041.
- Lanciotti, et al. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. Journal of General Virology. 1997;78:2279–84.
- Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. Infections, Genetics and Evolution. 2009;9:523–40.
- Klungthong C, et al. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. Virology. 2004; 329:168–179.
- Claro L, et al. Dengue prevention and control: a review of studies on knowledge, beliefs, and practices. Caderno Saude Publica. 2004;20:1447–57.
- Schatzmayer HG, et al. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. 1986;81:245–6.
- Nogueira RM, et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. 1990;85:253.
- Nogueira RM, et al. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. Epidemiol Infect. 1993;111:163–70.
- Nogueira RM, et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro. Brazil Memórias Instituto Oswaldo Cruz. 2001;96:925–6.
- Nogueira RM, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. Emerg Infect dis. 2005; 11:1376–81.
- Teixeira M, et al. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever. Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2008;14:1663.
- Teixeira MG, et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. Caderno Saude Publica. 2009;25(Suppl 1):S7–18.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Dengue. Boletim da semana 48/2008. In Brasília: Ministério da Saúde, 2008. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico>. Accessed 13 Dec 2016.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Informe epidemiológico da dengue: Semanas de 1 a 52 de 2009. In Brasília: Ministério da Saúde, 2009 <http://www.rorai.gov.br/web/Sms> Accessed 13 Dec 2016.
- Temporao JG, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima state. Brazil Emerging Infectious Diseases. 2011;17:938–40.
- Nogueira RM, et al. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. 2011;106:255–6.
- World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva; 2009. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>
- Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. Journal General Virology. 1978;40:531–44.
- Gubler DJ, et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop med Hyg. 1984;33:158–65.
- Miagostovich MP, et al. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. Journal Clinical Virology. 1999;14:183–9.
- Lanciotti RS, et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Journal Clinical Microbiology. 1992;30:545–51.
- Johnson BW, et al. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. Journal Clinical Microbiology. 2005;43:4977–83.
- Lima MRQ, 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.
- Miagostovich MP, et al. Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. 1997;92:595–9.
- Dos Santos FB, et al. A review on dengue diagnosis and epidemiology by a Regional reference laboratory in 25 years, Rio de Janeiro. Brazil Dengue Bulletin. 2013;37:61–76.
- Andries AC, et al. Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1. IgM and IgG PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012;6:e1993.
- Dussart P, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. Clin Vaccine Immunol. 2006;13:1185–9.
- Hang VT, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viremia and antibody responses. PLoS Negl Trop dis. 2009;3:e360.
- Lima Mda R, et al. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. PLoS Negl Trop dis. 2010;4:738.
- Huang CH, et al. Laboratory diagnostics of dengue fever: An emphasis on the role of commercial dengue virus nonstructural protein 1 antigen rapid test. Journal Microbiology, Immunology and Infection. 2012; doi: S1684–1182(12)00155–7.
- Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro (SESDEC-RJ). Relatório de casos de dengue. 2009. <http://prefeitura.rio/web/sms/dengue-casos-bairro-periodo>. Accessed 14 Apr 2013.
- Amâncio FF, et al. Dengue virus serotype 4 in a highly susceptible population in southeast Brazil. Journal Infection Public Health. 2014;7:547–52.
- Vaughn DW, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. J Infect dis. 2000;181:2–9.
- Endy TP, 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;189:990–1000.
- de Araújo JM, 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.
- Barcelos Figueiredo L, et al. Dengue virus 2 American-Asian genotype identified during the 2006/2007 outbreak in Piauí, Brazil reveals a Caribbean route of introduction and dissemination of dengue virus in Brazil. PLoS One. 2014; 9(11).
- Osanaí CH, et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. Revista Instituto de Medicina Tropical. 1983;25:53–4.
- Acosta et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerg Infect Dis. 2011; 17:1979–80.
- Nunes MR, et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. Emerg Infect dis. 2012;18:1858–64.
- Campos Rde M, et al. Emergence of dengue virus 4 genotypes II b and I in the city of Rio de Janeiro. J Clin Virol. 2013;56:86–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 5 Discussão

### 5.1 Emergência de DENV-4 no RJ durante a co-circulação com os demais sorotipos de DENV entre 2010 e 2012:

O Laboratório de Flavivírus (LABFLA/IOC) do Instituto Oswaldo Cruz, como Laboratório Regional de Referência de Diagnóstico de Dengue para o Ministério da Saúde, vem apoiando o programa de vigilância da dengue no estado do RJ, desde a primeira confirmação do caso de dengue em abril de 1986, quando DENV- 1 foi isolado durante um surto de doença exantemática no município de Nova Iguaçu. Desde então, o RJ tem sido de grande importância na epidemiologia da doença no país, com a introdução de DENV-2 em 1990 no município de Niterói (Nogueira et al., 1990) e DENV-3 em 2000, novamente no município de Nova Iguaçu (Nogueira et al., 2001; Nogueira et al., 2002). Apesar da introdução de DENV-4 em Roraima em 2010, e sua disseminação para outros estados do país em janeiro de 2011 (Nogueira, 2011), DENV-1 foi o sorotipo mais prevalente e responsável por epidemias com mais de 2 milhões de casos relatados no Brasil em 2010 e 2011. No entanto, no RJ, o ano de 2010 foi caracterizado por uma baixa atividade da doença, quando comparado com os anos subsequentes, com 29.824 notificações. Em 2011, o número de casos aumentou em mais de 100% (76.404) e em 2012, mais de 200% em relação a 2010, com 184.123 casos notificações (SES/SINAN, 2014).

Em 2010, os casos suspeitos de dengue recebidos pelo Laboratório de Flavivírus, IOC / FIOCRUZ constituíram 1,6% dos casos relatados no estado. Em 2011 e 2012, 1,4% e 0,6% dos casos relatados no estado de RJ, respectivamente, foram analisados em laboratório e essa amostragem refletiu as características das epidemias no estado. A área metropolitana foi responsável pela maioria dos casos ocorridos durante o período estudado, principalmente nos municípios de Rio de Janeiro e Niterói. Esta região tem uma alta densidade populacional e grande tráfego de pessoas, o que explica em parte a concentração dos casos estudados (Teixeira et al., 2008). Outro fator que pode ter influenciado nesses números é o fato do LABFLA receber amostras principalmente destas regiões.

Quase metade dos casos suspeitos de dengue analisados no período de 2010 a 2012 (47,5%; 1323/2833) foram confirmados utilizando qualquer das metodologias realizadas para diagnóstico da dengue, na rotina do laboratório. Em

um estudo retrospectivo, a confirmação de casos de dengue pelo Laboratório de Flavivírus, IOC / FIOCRUZ ao longo de um período de 25 anos, usando qualquer dos métodos disponíveis, foi de 33,8% (dos Santos et al., 2013). A investigação de casos suspeitos de dengue entre 2007 e 2013 no Rio Grande do Sul por qualquer um dos métodos sorológicos e/ou molecular utilizados, confirmou 21% (2046/9779) dos casos (Tumioto et al., 2014).

Houve um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) na taxa de confirmação desses casos durante o período de estudo, principalmente nos municípios de RJ e Niterói, acompanhando o aumento das notificações durante todo o período no estado. Em 2011, o número de casos no estado representou 21,6% do número de casos notificados no país.

Apesar da emergência de DENV-1 em 2009, este estudo demonstrou que DENV-2 ainda era o sorotipo prevalente em 2010. A reemergência de DENV-1 foi evidente em 2011, quando este sorotipo foi responsável por quase metade dos casos confirmados. Neste ano, observamos o primeiro caso de DENV-4 no estado, dispersando para todo estado no ano seguinte, caracterizando o maior causador dos casos de dengue confirmados no nosso estudo no ano de 2012.

Os métodos sorológicos ainda são a ferramenta mais útil para o diagnóstico da doença durante as epidemias, como observado desde a sua implantação em 1986. Naquele ano, 68,7% dos casos testados por MAC-ELISA foram confirmados (Nogueira et al., 1988). Dos casos recebidos no LABFLA/IOC entre 2010 e 2012, 32,6% dos casos testados foram confirmados. Em estudo realizado por Macedo et al. (2013) em casos suspeitos ocorridos entre 2004 e 2008, o teste confirmou 23% dos casos analisados.

No Rio Grande do Sul, área de baixa incidência para DENV, o MAC-ELISA foi a metodologia que mais contribuiu para a investigação de casos suspeitos entre 2007 e 2013 (18,9%;1846/9779) (Tumioto et al. 2014).

No nosso estudo, o ano de 2011 apresentou maior percentual de positivos por MAC-ELISA (37,5%; 231/615), seguido pelo ano de 2012, com 27,2% (111/408) e, quando houve maior prevalência de infecção por DENV-4, porém não houve diferença significativa entre as epidemias,

Na investigação de métodos de diagnóstico laboratorial para confirmação de dengue em Belo Horizonte, durante epidemia ocorrida em 2011, o MAC-ELISA confirmou 80,4% (100/124) dos casos suspeitos convalescentes investigados (Ferraz et al., 2013). A confirmação de casos por MAC-ELISA pode estar diretamente relacionada ao período de coleta da amostra (Singla et al., 2016; Peeling, 2017).

Foi possível identificar a circulação dos quatro sorotipos em 33,1% dos casos analisados no período de 2010 a 2012, utilizando o isolamento viral em cultura de células de mosquito *Ae albopictus* clone C6/36. Em 2012, comparando aos anos anteriores, observamos uma diminuição na proporção de número de casos confirmados/testados para isolamento, mesmo ano que observamos a maior circulação de DENV-4.

Em Cuiabá, Mato Grosso, nos anos de 2011 e 2012, DENV-4 e DENV-1 foram os sorotipos isolados em 24,8% (150/604) e 3,1% (19/604) dos casos suspeitos investigados, respectivamente (Heinen et al., 2015). Este percentual de isolamento de DENV-4, corrobora o observado na investigação de casos inoculados no Rio Grande do Norte, entre 2010 e 2012, quando 27% (87/1433) dos casos foram isolados. DENV-4 foi introduzido no RN em 2011 e foi o sorotipo prevalente em 2012 (Branco et al., 2015).

Em 1986/1987, quando foi relatado o primeiro surto de DENV-1, a porcentagem de isolamento do vírus foi de 41,2%. A co-circulação deste sorotipo com DENV-2 em 1990/1991 foi identificada por isolamento viral em 16,7% dos casos testados. Em 1995/1996 e 1998, DENV-1 e DENV-2 foram isolados em 9,8% e 18,4% dos pacientes, respectivamente (Nogueira et al., 1999). Entre 2004 e 2006, a baixa atividade de DENV foi caracterizada pela baixa porcentagem de isolamento viral (0,35 a 1,1%). No entanto, a reemergência de DENV-2, resultou em uma maior porcentagem de isolamento viral em 2007 e 2008 (5,7% e 10%, respectivamente) (Macedo et al., 2013).

Embora o método de isolamento viral seja considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de dengue, a sensibilidade da detecção molecular do genoma viral oferece uma grande vantagem nos períodos epidêmicos, conforme demonstrado pelos resultados aqui apresentados.



A RT-PCR permitiu a detecção viral em 56,3% dos casos testados no período de 2010-2012, com 91,0% (183/201) de confirmação. No entanto, é preciso ressaltar que, a alta taxa de positividade obtida neste estudo pode ser o resultado dos critérios de seleção das amostras utilizados em LABFLA / IOC, FIOCRUZ para realização de RT-PCR e isolamento viral, que inclui o teste de amostras na fase febril aguda (até o 5º dia dos sintomas) e, em muitos casos, previamente selecionados e positivos para o antígeno NS1. Contudo, estudos anteriores demonstraram a utilidade da RT-PCR na confirmação de casos e na identificação do sorotipo infectante quando o isolamento do vírus não foi possível (Miagostovich et al., 1997; De Paula et al., 2002; dos Santos et al., 2013; Tumieto et al. 2014) ou em casos negativos para o teste de NS1 (Sea et al., 2013).

Mesmo em regiões de baixa circulação viral, como no Rio Grande no Sul, que teve seu primeiro caso autóctone de dengue em 2007, a RT-PCR é uma metodologia importante para a vigilância da doença. Naquele estado, mesmo com baixa prevalência, o método identificou 1,7% (175/9779) dos casos investigados entre 2007 e 2013, quando comparado à investigação por isolamento viral (0,25%; 25/9779) (Tumieto et al., 2014).

Na epidemia ocorrida em Belo Horizonte em 2011, a RT-PCR em tempo real utilizada identificou a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV, com uma maior prevalência de DENV-1 (73,2%), seguido de DENV-3 (10,1%), DENV-2 (5,8%) e de DENV-4 (2,9%), recém introduzido. Co-infecções por DENV-1/3, também foram identificadas em dois casos (Ferraz et al., 2013).

Em regiões de circulação de outros arbovírus, como o Amazonas, o RT-PCR também se mostrou de grande importância para a investigação de casos suspeitos de dengue em 2011. O sorotipo infectante de DENV foi determinado em 38,4% (260/677) dos casos investigados, sendo DENV-2 o sorotipo predominante (46.2%;120/260), seguido de DENV-4 (29%; 77/260), DENV-1 (10.0%; 26/260) e DENV-3 (9.2%; 24/260). O método também permitiu a determinação de distintas co-infecções por DENV (DENV-2/4 em 2.3%, DENV-1/4 em 1.9% e DENV-1/2 e DENV-3/4 em 0,4% dos casos) (Martins et al., 2014).

A introdução de DENV-4 também foi investigada na Bahia e, casos suspeitos ocorridos entre 2011 e 2012, foram submetidos ao RT-PCR, que confirmou a

infecção em 43,4% (93/214), sendo 82,2% por DENV-4, 14% por DENV-2 e 3,2% por DENV-3 (Campos et al., 2015).

A RT-PCR também se mostrou importante na investigação de casos de DENV-4 que estavam sendo subnotificados em Sergipe em 2011 e 2012, devido à falta de sensibilidade dos testes de captura de NS1 utilizados como método de triagem (Sea et al., 2013).

Em Cuiabá, o RT-PCR confirmou o sorotipo infectante em 54,8% dos casos 604 investigados entre 2011 e 2014, DENV-1 (n=15), DENV-3 (n=1) e DENV-4 (n=305) foram os sorotipos identificados, assim como co-infecções por DENV-1/DENV-4 (n=9) e DENV-2/DENV4 (n=1) (Heinen et al., 2015). No entanto, um menor percentual de positividade foi observado na investigação de casos suspeitos ocorridos no Rio Grande do Norte entre 2010-2012, quando 24,1% (194/804) foram confirmados por esta metodologia (Branco et al., 2015).

A introdução e emergência de DENV-4, também ficou evidente em um estudo realizado no Guarujá em São Paulo em 2012 -2013, quando 96,2% casos identificados por RT-PCR, foram por este novo sorotipo (Villabona-Arenas et al., 2016).

Na Paraíba, a investigação de casos suspeitos de entre 2007 e 2015, identificou, por RT-PCR, DENV-1 como o sorotipo prevalente no período, apesar da co-circulação dos quatro sorotipos em 2013 e 2014 (Guerra-Gomes et al., 2017).

A atual situação de co-circulação de múltiplos sorotipos de DENV, assim como de outros arbovirus que compartilham sinais e sintomas semelhantes, com zika e chikungunya, ressaltam a importância do diagnóstico diferencial laboratorial. No entanto, diante a reação cruzada entre os vírus de uma mesma família, com DENV e ZIKV, métodos sorológicos possuem uma limitação de uso. Neste sentido, a utilização da RT-PCR se torna de grande relevância para o diagnóstico destas infecções.

Na tríplice epidemia de dengue, zika e chikungunya ocorrida em 2015-2016 no RJ, a técnica de RT-PCR foi de grande importância na investigação de casos suspeitos das três arboviroses. Apesar de nenhum caso de DENV ser confirmado, a infecção pelo ZIKV foi identificada em 56,7% e um caso de co-infecção de zika e chikungunya foi reportado (Cabral-Castro et al., 2016).

O teste de captura de antígeno NS1 é um método sorológico que permite o diagnóstico precoce de infecções por DENV, durante o estágio inicial da doença, mesmo em laboratórios com recursos técnicos e equipamentos limitados (Andries et al., 2012). No LABFLA/IOC, este teste foi introduzido pela primeira vez em 2007 e avaliado como um método de diagnóstico alternativo, apresentando sensibilidade de 89,6% na confirmação dos casos de DENV 1-3 (Lima et al., 2010).

Em 2008, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu o teste de captura de antígeno NS1 em unidades de sentinela para identificação precoce de casos suspeitos em vários estados (Souza et al., 2011). No mesmo ano, o ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA confirmou 49% (27/55) dos casos analisados em LABFLA / IOC, FIOCRUZ, no entanto, no nosso estudo, a confirmação dos casos foi de 36,5%, 29,8% e 25% em 2010, 2011 e 2012, respectivamente. A menor taxa no ano de 2012, pode ser explicado pelo maior número de casos de DENV-4 ocorridos naquele ano. Um estudo realizado durante uma epidemia de DENV-4, demonstrou 15% de resultados falso negativos para o teste de NS1 e, apontou a necessidade de avaliação desta abordagem para o diagnóstico precoce da doença por este sorotipo (Colombo et al., 2013).

A avaliação de estratégias para o aperfeiçoamento da sensibilidade do NS1 ELISA em casos de DENV-4 será discutida no item 5.2, a seguir.

A introdução de um novo sorotipo de DENV está associada à ocorrência de grandes epidemias e maior proporção de casos graves, pois existem mais indivíduos suscetíveis ao novo sorotipo circulante (Rigau-Pérez et al, 2002; Gibson et al., 2014). Devido à falta de informação sobre os registros de alguns pacientes, a classificação dos casos de acordo com os novos critérios da OMS (2009) não foi possível. Neste estudo, a hemorragia, o choque, o aumento dos níveis de transaminases e o envolvimento do sistema nervoso central foram considerados para a classificação do caso grave.

De 2010 a 2012, 6,9% dos casos confirmados foram classificados como casos graves de dengue e nossa observação corrobora os relatos para o estado do RJ, onde observou-se uma diminuição no número de casos graves durante uma epidemia causada principalmente por DENV-4.

Nossos resultados sugeriram um risco significativamente maior de desenvolver doenças graves entre as crianças de 15 anos ou menos em 2010 e indivíduos com mais de 65 anos de idade em 2011, enquanto que, em 2012, quando houve um predomínio de DENV-4, observamos uma distribuição mais homogênea entre as faixas etárias.

A maior confirmação de caso fatal neste estudo, foi observada em 2011, quando houve uma circulação prevalente de DENV-1 no estado. Apesar disso, um número crescente de óbitos por infecção secundária e devido ao DENV-2 foram relatados. No entanto, também foi descrito um aumento de óbitos por infecção primária.

Estudos prévios apontaram que DENV-2 tem sido o sorotipo mais frequentemente associado com casos mais graves da doença (Guzman et al., 2002; Balmaseda et al., 2006), seguido de DENV-1 e DENV-3 (Harris et al., 2000; Messer et al., 2003; Guzman et al., 2006; Balmaseda et al., 2006). DENV-4, por outro lado, tem sido associado a quadros clínicos mais brandos, no entanto, já houveram relatos de doença grave e fatal (Loroño et al., 1993; Nisalak et al., 2003; Kumara, 2010; Cecilia et al., 2011; Amâncio et al. 2014). De fato, DENV-4 têm sido associados com um aumento na gravidade da doença quando ocorre durante a infecção secundária (Vaughn et al., 2000; Nisalak et al., 2003; Balmaseda et al., 2006). Neste estudo, apesar de uma diminuição no número de casos fatais em 2012 quando DENV-4 foi prevalente, óbitos ainda ocorreram.

Foi a primeira vez que os quatro sorotipos DENV foram relatados simultaneamente pela primeira vez no RJ, no entanto, uma das limitações do estudo foi o baixo número de casos DENV-3 identificados durante o período.

Após a introdução do novo sorotipo no país, estudos realizados em outros estados, também relataram a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV (Andrade et al., 2016; Dutra et al., 2017; Guerra-Gomes et al., 2017) que poderá resultar em uma situação hiperendêmica, principalmente nos centros urbanos do país (Villabona-Arenas et al., 2014). Ressalta-se ainda que, este fato pode levar à co-infecção por distintos sorotipos (Ferraz et al., 2013; Martins et al., 2014; Heinen et al., 2015; Andrade et al., 2016; Dutra et al., 2017).

A dengue tornou-se um grande problema de saúde pública no RJ devido a muitos fatores, como a susceptibilidade do hospedeiro humano, emergências e re-emergências, com circulação alternada de sorotipos, alta infestação de mosquitos e fatores ambientais. Nesse cenário, também se tornou evidente que o diagnóstico laboratorial tem um papel importante na vigilância da doença, tanto em períodos interepidêmicos quanto em epidemias, atuando preventivamente como ferramenta para a detecção precoce de casos de suspeitos. Ficou demonstrado neste estudo que, as emergências ou re-emergências dos distintos sorotipos virais, pode impactar de maneira distinta na epidemiologia da doença, especialmente quando múltiplos sorotipos co-circulam.

## **5.2 Estabelecimento de uma estratégia para o aperfeiçoamento da sensibilidade do teste de captura de NS1 para o diagnóstico precoce de DENV-4 e análise da sensibilidade em um estudo prospectivo realizado no RJ**

Em casos de DENV-4 recebidos no período de 2011-2013 no LABFLA/IOC e previamente confirmados por isolamento e/ou RT-PCR, foi demonstrado que, inicialmente, a taxa de detecção do teste de captura de NS1 ELISA Platelia™ foi de 46,9%, menor do que a relatada para DENV-4 (89,6%) em pacientes da Guiana Francesa (Dussart et al., 2006) ou em amostras de diferentes países (67-91%) (Guzman et al., 2010).

Em Roraima, resultados falso-negativos no teste de captura de NS1 ELISA Platelia™ foram observados em infecções por todos os sorotipos de DENV. No entanto, um maior percentual de falso negativos (75%) foi reportado para casos de DENV-4 (Acosta et al., 2014). Estas observações corroboram àquelas da investigação de casos suspeitos de dengue em Sergipe em 2011 e 2012, quando 48,7% de amostras negativas para o teste da captura de NS1, foram caracterizadas como DENV-4 por RT-PCR (Sea et al., 2013).

Neste estudo, maiores taxas de confirmação de dengue foram observadas quando os resultados do teste de NS1 foram combinados com os obtidos pelo isolamento viral ou RT-PCR. O teste de captura de NS1 mostrou uma sensibilidade progressivamente aumentada analisando-se amostras coletadas a partir do dia 0 (51,6%) até o dia 3 (68%, sensibilidade máxima), antes de diminuir gradualmente para 38,2%, quando amostras coletadas no dia 7 após o início dos sintomas foram

avaliadas. Além disso, uma maior positividade foi observada em casos de infecções primárias quando comparadas às secundárias ( $p = 0,001$ ), corroborando outros estudos (Koraka et al., 2003; Kosasih et al., 2013; Allonso et al., 2014; Hermann et al., 2014).

O Brasil vive atualmente, uma situação de hiperendemicidade, com a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV, e conseqüentemente a ocorrência, cada vez maior de casos de infecções secundárias. De fato, a menor sensibilidade dos testes de captura de antígeno NS1 em casos de infecção secundária por DENV-4 observadas neste estudo, vem sendo relatada em outras análises (Sea et al., 2013; Colombo et al., 2013; Buonora et al., 2017).

Títulos elevados do anticorpo IgG no soro de pacientes positivos para DENV-4 que obtiveram resultados negativos para a detecção de NS1 foram observados. Neste contexto, anticorpos de uma infecção prévia, podem formar imunocomplexos (antígeno NS1-anticorpo) durante infecções secundárias (1), justificando assim uma menor captura da proteína, nestes casos. Desta forma, estratégias para a dissociação destes imunocomplexos foram avaliadas neste estudo.

Um tratamento ácido realizado em amostras de soro de pacientes infectados com HIV-1 resultou no aumento da sensibilidade de um ELISA de detecção da proteína p24 de HIV-1. No entanto, uma simples dissociação térmica, resultou no aumento desta mesma sensibilidade (Schüpbach et al., 1996).

A realização de um processo de dissociação por tratamento ácido realizado em soros de pacientes da Indonésia, aumentou consideravelmente a sensibilidade na detecção da glicoproteína NS1 em casos de infecção primária e secundária, de 64 para 91% e 22% para 93%, respectivamente (2). Em um estudo subsequente realizado na Tailândia, a sensibilidade do Platelia NS1 ELISA aumentou de 63,2% para 72%, quando as amostras de soro dos pacientes foram submetidos ao mesmo processo de dissociação por tratamento ácido (3).

No nosso estudo, a sensibilidade de detecção da NS1 aumentou significativamente de 54,4% (124/228) para 77,2% (176/228), após os soros dos pacientes com infecção primária por DENV-4 serem submetidos à dissociação ácida e para 82% (187/228), depois de terem sido submetidos a dissociação térmica. Como esperado, a sensibilidade de detecção utilizando as amostras de soro dos

pacientes com infecção secundária por DENV-4 também aumentou significativamente, de 39,0% (93/228) para 63,9% (152/238), após a dissociação ácida e para 73,1% (174/238) após dissociação térmica.

A avaliação do teste de Platelia™ para detecção de NS1 demonstrou baixa sensibilidade no diagnóstico precoce de casos de DENV-4. No entanto, a utilidade da dissociação térmica para o aumento da sensibilidade do teste de captura de NS1, tanto em casos de infecções primária quanto secundárias por DENV-4 foi demonstrada e constitui um método ideal, uma vez que pode ser realizada mais rapidamente do que o método de dissociação ácida e sem a necessidade da utilização de tampões adicionais.

A sensibilidade do teste de captura de NS1 também foi avaliada em um estudo prospectivo. Durante a epidemia de dengue de 2013 no RJ, pacientes adultos elegíveis que se apresentaram em uma unidade pública ambulatorial dentro de 72h após o início da febre e posteriormente confirmados com infecção por DENV-4 foram recrutados e amostra de soro coletada. Nesta população, a sensibilidade geral do teste de NS1 em casos de DENV-4 foi de 47,8%, semelhante aos 46,6% obtidos no estudo anterior, mas inferior à sensibilidade de 58% obtida por Costa et al (2014).

As diferenças nas sensibilidades em infecções primárias e secundárias neste caso, antes da dissociação térmica, foram significativamente diferentes 80,9% e 42,0%, respectivamente. No entanto mesmo influenciando na sensibilidade das infecções secundárias, esta ainda foi considerada baixa.

Uma das importâncias deste estudo é que, por ter sido realizado prospectivamente, as amostras foram clínica e laboratorialmente bem caracterizadas, coletadas durante um único surto, em uma unidade ambulatorial e cenário epidemiológico real, diferente das avaliações com painéis amostrais.

### **5.3 Alterações clínicas e laboratoriais de casos de DENV-4 em comparação a casos de DENV-2 relacionadas à gravidade da doença**

Os anos de 2010 e 2013 caracterizaram-se por duas das maiores epidemias de dengue relatadas no país, quando cerca de 1 e 1,4 milhão de casos foram relatados, respectivamente. Além disso, apesar da introdução de DENV-4 em 2010,

este sorotipo prevaleceu em 2013 e foi responsável principalmente pelos casos brandos (SVS/MS, 2014).

No nosso estudo realizado no município de Campos dos Goytacazes, região norte do estado do RJ, a infecção por dengue foi confirmada em 61,4% (94/153) de casos suspeitos ocorridos em duas epidemias distintas em 2010 e 2013, com a circulação de DENV-2 e DENV-4, respectivamente, e características hematológicas e bioquímicas distintas.

De acordo com os critérios da OMS de 2009, os pacientes foram classificados como DsSA (60,6%, 57/94), DcSA (30,9%, 29/94) e DG (2,1%, 2/94). Em 2010, quando DENV-2 foi o sorotipo prevalente, o número de hospitalizações (45,8%) foi maior do que durante a epidemia de 2013 (22,9%), corroborando com estudos prévios. Foi demonstrado que as infecções causadas por DENV-2 e DENV-3 são duas vezes mais propensas a resultar em uma doença mais grave do que a infecção por DENV-4 (Fried et al., 2006; Nunes et al., 2016; Rodriguez-Roche et al., 2016).

A maioria das internações (80,8%, 21/26) ocorreu na fase aguda da doença, entre o 1º e 7º dia após o início da doença e 96,2% (25/26) e foram devidas a DCSA/DG. Considerando a situação epidemiológica do país, a caracterização da resposta imune é importante, pois as infecções secundárias também estão relacionadas a uma doença mais grave (Halstead, 2007; Dutra et al., 2016). De fato, neste estudo, 81,9% (77/94) de pacientes apresentaram infecção secundária por dengue e, uma alta prevalência de infecções secundárias no país foi relatada em altas proporções anteriormente (Nogueira et al., 2002; Guilarde et al., 2008; Honorio et al., 2009).

Ao comparar os parâmetros hematológicos em pacientes com dengue deste estudo, observou-se que, independentemente do seu estado clínico, os pacientes da epidemia de 2010, causados principalmente por DENV-2, apresentaram menor contagem de plaquetas do que os pacientes do ano de 2013, causados principalmente por DENV-4. Foi observado que casos de DENV-2 apresentaram uma trombocitopenia mais grave do que DENV-4, corroborando o estudo por Thomas et al. (2008), que realizaram um estudo retrospectivo comparando sinais e sintomas de pacientes infectados com diferentes sorotipos de DENV.



A trombocitopenia é uma característica comum em pacientes com infecção sintomática por DENV (Deepanjali et al., 2015). Várias hipóteses foram formuladas para elucidar os possíveis mecanismos responsáveis pela trombocitopenia na dengue. Murgue et al. (1997) sugeriram que o DENV afeta as células progenitoras da medula óssea inibindo sua função. Outro estudo relatou que o vírus indiretamente diminui a capacidade proliferativa das células hematopoiéticas (Thomas et al., 2008). De fato, há evidências de que DENV induziu hipoplasia da medula óssea na fase aguda da doença e estudos *in vitro* demonstraram que DENV-4 se replica em células progenitoras da medula óssea humana, alterando sua capacidade proliferativa (Nakao et al., 1989; Tsai et al., 2011).

Outros estudos relataram que a infecção por DENV induz a queda e plaquetas devido ao aumento da destruição pelo sistema do complemento, intensa liberação de citocinas e apoptose. Além disso, o envolvimento de anticorpos antiplaquetários também foi demonstrado (Lin et al., 2006; Hottz et al., 2013; Piza et al., 2017).

Nas epidemias de 2010 e 2013, a leucopenia foi observada em pacientes com dengue em comparação com casos de outras doenças febris (ODF). A análise de leucócitos de acordo com a classificação clínica, independentemente do ano epidêmico, mostrou diminuição da contagem em pacientes com DcSA/DG em comparação com DsSA, porém sem diferenças significativas. Na fase inicial da doença, em infecções primárias e secundárias, uma diminuição na contagem de leucócitos e aumento de linfócitos atípicos pode estar relacionada à supressão de células progenitoras a partir da medula óssea (Jameel et al., 2012).

O envolvimento do fígado é uma das características da infecção por DENV. As alterações hepáticas, incluindo a hepatomegalia e o aumento das transaminases, foram descritas em ambos os casos de dengue e febre hemorrágica da dengue (Nguyen et al., 1997; Trunget al., 2010; Trung et al., 2012). Na DG, a ocorrência de insuficiência hepática fulminante foi a causa da morte em crianças (Roy et al., 2013). Mecanismos de danos no fígado podem estar relacionados aos efeitos diretos do vírus ou como consequência da resposta imune do hospedeiro, levando à insuficiência circulatória, acidose metabólica, hipotensão, hipoxia e/ou vazamento vascular (Itha et al., 2005).

Nossos resultados mostraram que 41,5% (39/94) dos pacientes apresentaram níveis de transaminases acima do normal, e desses, 51,3% (20/39) eram pacientes com DcSA/DG. As variações nos níveis de transaminases durante a dengue não são totalmente compreendidas. Neste estudo, não houve diferenças estatísticas significativas nos níveis de AST/ALT entre epidemias.

O reconhecimento das diferenças hematológicas e bioquímicas entre pacientes com dengue e outras doenças é de grande importância na identificação de pacientes que podem desenvolver doença grave. A fase clínica inicial da dengue é muitas vezes confundida com outras doenças febris, gerando dúvidas no momento da abordagem clínica e vigilância da doença. No entanto, as diferenças hematológicas e os níveis de citocinas podem ser utilizados como uma ferramenta precoce para diferenciar dengue de outras doenças febris (Tanner et al., 2008; Piza et al., 2017). Além disso, também foi demonstrado que a previsão do possível início da trombocitopenia é possível usando algoritmos (Tanner et al., 2008).

Ao comparar os dados analisados neste estudo, fica evidente uma diferença nos achados hematológicos e bioquímicos entre pacientes infectados com DENV-2 e DENV-4, além de diferenças formas clínicas da doença entre infecções de DENV-1/2 e DENV-4. O reconhecimento desses parâmetros ajuda a garantir que medidas de suporte possam ser tomadas para prevenir o aumento da morbidade e mortalidade por dengue. No entanto, estudos adicionais são necessários para um melhor conhecimento dos fatores que podem afetar o manejo dos pacientes durante as epidemias de dengue, especialmente em áreas tropicais onde os recursos médicos são deficientes e onde tais epidemias podem gerar grandes impactos econômicos.

#### **5.4 Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de casos confirmados de DENV-4 após a sua introdução em área endêmica do RJ e genotipagem das cepas isoladas**

Em 2011, o primeiro isolamento de DENV-4 no RJ de casos ocorridos no município de Niterói, resultou na emergência deste sorotipo no estado em 2012. No mesmo ano, mostrou-se, pela primeira vez, a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV no estado, no entanto, nos anos de 2012 e 2013, DENV-4 foi responsável pelo maior número de casos.

Seguindo-se a introdução de DENV-4 no RJ, neste estudo, foram analisados casos suspeitos de dengue ( $n=3727$ ) ocorridos entre 2011 e 2013. Neste cenário, visou-se então, caracterizar o tipo de infecção, gravidade da doença, viremia e antigenemia de NS1 dos casos de DENV-4 ( $n=705$ ) ocorridos em uma região endêmica para a doença.

De fato, neste estudo, DENV-4 representou 44,2% (705/1.593) dos casos confirmados por isolamento viral e/ou RT-PCR.

IgM anti-DENV foi detectado em 39,4% dos casos e o baixo percentual de confirmação foi, provavelmente, devido à natureza aguda dos casos selecionados para análise. Para caracterização do sorotipo infectante por RT-PCR e/ou isolamento viral, os casos são analisados até 7 dias após o início dos sintomas, onde há a viremia. De fato, durante períodos epidêmicos, os casos analisados por estas metodologias, são àqueles, preferencialmente até o quarto dia após a febre, para uma maior probabilidade de confirmação. No entanto, quando a análise de IgM considerou casos com  $\geq 4$  dias, a taxa de detecção do MAC-ELISA foi de 57,0%.

O antígeno NS1 foi identificado em 41,5% dos casos de DENV-4, no entanto, após a dissociação térmica, a detecção aumentou significativamente (87,6%). A baixa sensibilidade dos testes de NS1 para o diagnóstico de DENV-4 foi extensivamente discutido no item 5.2 e abordada em vários estudos prévios (Dussart et al., 2006; Guzman et al., 2010; Sea et al., 2013; Amâncio et al., 2014, Acosta et al., 2014), assim como o aumento desta, após a desnaturação dos imuno-complexos (Lima et al., 2014; Buonora et al., 2017).

Mulheres e crianças menores de 15 anos foram mais acometidas por DENV-4 e, devido à recente introdução deste sorotipo no estado em 2011 (Nogueira & Eppinhaus, 2011), infecções primárias foram mais frequentemente observadas do que secundárias e classificadas como dengue sem sinais de alerta. Conforme discutido previamente, DENV-4 é um sorotipo que tem sido associado a quadros clínicos mais brandos, apesar da possibilidade de ocorrência de doença grave e fatal (Nisalak et al., 2003; Kumara, 2010; Cecilia et al., 2011; Amâncio et al. 2014).

Em nosso estudo a hemorragia, o choque, o aumento dos níveis de transaminases e o envolvimento do sistema nervoso central foram considerados para classificação de casos graves. No estudo, 3,2% dos casos confirmados por

DENV-4 foram classificados como dengue grave e 12,8% como dengue com sinais de alerta. Observamos que, a dor abdominal é um sinal de alerta importante em relação à evolução da doença e que pode ajudar no manejo correto do paciente e, assim, evitando aumento da gravidade e desfecho fatal. A inclusão dos sinais de alerta, como dor abdominal, na nova classificação de casos de dengue proposta pela OMS (2009) teve como objetivo a otimização da abordagem clínica dos casos e, enfatiza o reconhecimento destes sinais como um marcador de risco para a evolução do caso para um quadro mais grave. De fato, dor abdominal tem sido um marcador indicativo de agravamento do caso em adultos e crianças (Wichmann et al., 2011; Giraldo et al., 2011; Tomashek et al., 2012; Correa et 2016).

Além disso, estudos já demonstraram que a nova classificação é fácil de ser aplicada e pode ser utilizada prospectivamente (Barniol et al., 2011; Horstick et al., 2014). Devido ao pequeno número de casos graves disponíveis neste estudo, não foi realizada análise estatística sobre a gravidade da doença.

Apesar de uma maior frequência de casos graves em maiores de 65 anos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados e tipo de infecção.

Estudos prévios demonstram que os níveis de NS1 no início da infecção por DENV, além da alta viremia, podem estar associados à patogênese da doença (Libraty et al., 2002; Simmons et al., 2012; Muller and Young, 2013; Puerta-Guardo et al., 2016). Porém, no nosso estudo, a antigenemia de NS1 em casos de DENV-4, não mostrou diferenças entre os níveis de NS1 de dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta ou dengue grave, dados que corroboram com estudos anteriores (Allonso et al., 2014). Também não foram observadas diferenças significativas entre a viremia em dengue clássico e casos graves, o que não corroborou estudos anteriores analisando outros sorotipos (Vaughn et al., 2000; de Araújo et al., 2002; Endy et al., 2004). Porém, a mesma falta de associação entre uma alta viremia e antigenemia foi descrita em um estudo com crianças com dengue brando e grave. As crianças apresentando infecção primária apresentaram alta viremia e antigenemia, contudo estes parâmetros não foram associados a gravidade clínica (Perdomo-Celis et al., 2017).

Uma limitação do presente estudo foi o pequeno tamanho da amostra de casos graves. Além disso, a coleção de amostragem representa a primeira visita do paciente à unidade de saúde e a informação sobre sua progressão para uma doença mais grave não se encontra disponível.

Neste estudo, óbitos em casos de DENV-4 (n=14) foram confirmados no período estudado, sem diferença significativa entre os grupos relacionados, pois o número amostral foi pequeno. Apesar disso, foi observado que os casos fatais por DENV-4 foram mais frequentes em casos de infecção secundária (57,1%). A ocorrência de casos graves e fatais durante infecções secundárias, apoiam o papel do ADE e da teoria do “pecado original” na patogenia das infecções pelos DENV (Sangkawibha et al., 1984; Scream et al., 2015).

Cepas representativas de DENV-4 isoladas de 2011 a 2013, após a introdução do sorotipo e dispersão no RJ, foram parcialmente sequenciadas neste estudo, e a análise filogenética demonstrou que elas pertencem ao genótipo II, apesar da descrição no estado, dos genótipos I e II (Campos et al., 2013). Com base em estudos prévios, o tamanho da amostragem selecionado aqui, é confiável para esta análise, considerando a duração da epidemia, o local e a característica de baixa mutação de DENV (De Araújo et al., 2002; Temporão et al., 2011).

As cepas do genótipo II de DENV-4 isoladas durante o surto de 1982 em Roraima, no norte do Brasil, não se dispersaram para os demais estados naquela ocasião (Osanai et al., 1983). No entanto, este genótipo foi mais uma vez detectado em Roraima em 2010, circulando pela América Central, Nordeste da América do Sul e Caribe (Acosta et al., 2011).

De acordo com Temporão et al. (2011), essas cepas do genótipo II eram geneticamente distintas das isoladas na década de 1980 em Roraima, e demonstraram uma origem provável à partir da Venezuela e da Colômbia. No entanto, Nunes et al. (2012) analisando sequências completas e parciais de DENV-4 isoladas no Brasil, identificaram a circulação de dois genótipos (I e II) distintos.

O genótipo II é o mais comumente observado circulando no Caribe e América do Sul, incluindo o Brasil (de Souza et al., 2011; Nunes et al., 2012; Martins et al., 2014; Branco et al., 2015; Villabona-Arenas et al., 2016; Ramos-Castañeda et al., 2017).

O genótipo I, por outro lado, é representado por cepas isoladas no Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil, com relação evolutiva com cepas asiáticas (Melo et al., 2009; Campos et al., 2013; Pinho et al., 2015). Uma vez que o genótipo II está circulando nas Américas por mais de duas décadas, a presença do genótipo I de DENV-4, foi de certa forma, inesperada

Apesar da importância da distribuição de DENV-4, ainda pouco se sabe sobre o padrão de dispersão e evolução deste vírus e estudos acerca deste sorotipo, ainda são necessários. Diante da complexidade da doença, na qual, fatores clínicos, epidemiológicos e virais podem estar envolvidos na patogênese, a vigilância continuada dos diferentes sorotipos e genótipos, principalmente em áreas hiperendêmicas, como as encontradas no Brasil, se torna de grande importância epidemiológica para o conhecimento do impacto destes, sobre a população.

## 6 CONCLUSÕES

- DENV-4 emergiu no RJ em 2010 durante uma epidemia de DENV-1, caracterizando um período de co-circulação dos quatro sorotipos, reportado pela primeira vez no estado;
- Mesmo introduzido em uma população suscetível, DENV-4 foi responsável tanto por infecções primárias quanto secundárias e as secundárias não foram associadas à casos graves.
- O teste de NS1 apresentou uma baixa sensibilidade na confirmação de casos de DENV-4, tanto em uma avaliação quanto em estudo prospectivo, no entanto, a adição de uma etapa de dissociação térmica nas amostras, melhorou significativamente a sensibilidade do teste, principalmente nos casos secundários.
- Em Campos dos Goytacazes, RJ, um maior número de hospitalizações foi reportado durante a epidemia de 2010 quando DENV-2 circulou, quando comparado ao ano de 2013, quando DENV-4 foi prevalente e associado à casos mais brandos;
- Diferenças hematológicas e bioquímicas foram observadas nas infecções por DENV-2 e DENV-4. Onde, pacientes infectados por DENV-2 apresentaram a contagem de plaquetas menores do que os por DENV-4 e este parâmetro pode estar relacionado com um quadro mais grave da doença;
- Não houve diferença significativa entre DENV-2 e DENV-4 em relação à contagem de leucócitos, porém pacientes com DCSA apresentaram menor contagem do que aqueles de DSSA;
- Durante a epidemia de DENV-4 ocorrida em área endêmica em 2012- 2013, um baixo número de casos graves foi reportado, apesar do elevado número de infecções secundárias;
- A dor abdominal foi considerado um marcador importante em relação à evolução da doença, apesar do reduzido número de casos de DCSA analisados neste estudo;
- Não foram observadas diferenças na antigenemia de NS1 e viremia de casos de DENV-4, quando casos sem gravidade foram comparados à casos mais graves da doença;

- A maioria dos óbitos por DENV-4 ocorridos durante a epidemia de 2012-2013 foram observados na infecção secundária, ressaltando o cenário endêmico do RJ;
- Apesar da descrição prévia dois genótipos de DENV-4 no RJ, o genótipo II foi o único identificado nas cepas analisadas neste estudo.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta EG, Kumar A, Bartenschlager R. Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. *Adv Virus Res.* 2014;88:1-109.

Acosta EG, Piccini LE, Talarico LB, Castilla V, Damonte EB. Changes in antiviral susceptibility to entry inhibitors and endocytic uptake of dengue-2 virus serially passaged in Vero or C6/36 cells. *Virus Res.* 2014;184:39-43.

Aguilera-Pesantes D, Méndez MA. Structure and sequence based functional annotation of Zika virus NS2b protein: Computational insights. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Feb 8. pii: S0006-291X(17)30303-0.

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.

Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet MT, Talarmin A, Rice C, Flamand M. Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. *Novartis Found Symp.* 2006;277:233-47; discussion 47-53.

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.

Amâncio FF, Ferraz ML, Almeida MC, Pessanha JE, Iani FC, Fraga GL, et al. Dengue virus serotype 4 in a highly susceptible population in Southeast Brazil. *J Infect Public Health.* 2014;7(6):547-52.

ANDERSON CR, DOWNS WG, HILL AE. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. *Science.* 1956;124(3214):224-5.

Andrade CC, Young KI, Johnson WL, Villa ME, Buraczyk CA, Messer WB, et al. Rise and fall of vector infectivity during sequential strain displacements by mosquito-borne dengue virus. *J Evol Biol.* 2016;29(11):2205-18.

Andreis DT, Singer M. Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-andHyde conundrum. *Intensive Care Med.* 2016;42(9):1387-97.

Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, et al. Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12):e1993.

Aquino VH, Amarilla AA, Alfonso HL, Batista WC, Figueiredo LT. New genotype of dengue type 3 virus circulating in Brazil and Colombia showed a close relationship to old Asian viruses. *PLoS One.* 2009;4(10):e7299.

Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 2013;3.

Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(3):449-56.

Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martínez E, et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis.* 2011;11:106.

Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res.* 2013;162(3):144-55.

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.

Blacksell SD. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: recent evaluations and future needs? *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:151967.

Boldescu V, Behnam MAM, Vasilakis N, Klein CD. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2017.

rady OJ, Golding N, Pigott DM, Kraemer MU, Messina JP, Reiner RC, et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasit Vectors*. 2014;7:338.

Brady OJ, Smith DL, Scott TW, Hay SI. Dengue disease outbreak definitions are implicitly variable. *Epidemics*. 2015;11:92-102.

Branco MS, Sousa DM, Monteiro JD, Costa DM, Almeida Junior RF, Lima TL, et al. Dengue in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, 2010-2012. *Trop Med Int Health*. 2015;20(12):1707-10.

Brathwaite Dick O, 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.

Buonora SN, Passos SR, do Carmo CN, Quintela FM, de Oliveira DN, dos Santos FB, et al. Accuracy of clinical criteria and an immunochromatographic strip test for dengue diagnosis in a DENV-4 epidemic. *BMC Infect Dis*. 2016;16:37.

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.

Cabral-Castro MJ, Cavalcanti MG, Peralta RH, Peralta JM. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *J Clin Virol*. 2016;82:108-11.

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.

Callahan JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, et al. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):4119-24.

Campos KB, Amâncio FF, de Araújo VE, Carneiro M. Factors associated with death from dengue in the state of Minas Gerais, Brazil: historical cohort study. *Trop Med Int Health*. 2014.

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 Oct 11;384(9951):1358-65.

Carneiro AR, Cruz AC, Vallinoto M, Melo DeV, Ramos RT, Medeiros DB, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):805-12.

Cecilia D, Kakade MB, Bhagat AB, Vallentyne J, Singh A, Patil JA, et al. Detection of dengue-4 virus in pune, western india after an absence of 30 years--its association with two severe cases. *Virol J*. 2011;8:46.

Chakravarti A, Suresh K, Neha, Shweta, Malik S. Dengue outbreak in Delhi in 2009: study of laboratory and clinical parameters. *J Commun Dis*. 2012;44(3):163-8.

Chambers TJ, Hahn C, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990a. 44:649-688.

Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. Pruduction of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific pycloal antisera. *Virology*. 1990b. 177:159-174.

Chatchen S, Sabchareon A, Sirivichayakul C. Serodiagnosis of asymptomatic dengue infection. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10(1):11-4.

Chawla T, Chan KR, Zhang SL, Tan HC, Lim AP, Hanson BJ, et al. Dengue virus neutralization in cells expressing Fc gamma receptors. *PLoS One*. 2013;8(5):e65231.

Chen CD, Benjamin S, Saranum MM, Chiang YF, Lee HL, Nazni WA, et al. Dengue vector surveillance in urban residential and settlement areas in Selangor, Malaysia. *Trop Biomed*. 2005;22(1):39-43.

Chen LH, Wilson ME. Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(5):775.

Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011;3(9):1562608.

Christophers SR. Systematic. In "Aedes aegypti, The Yellow Fever Mosquito: Its life History, Bionomics and Structure". Cambridge University Press, London. 1960. 21–53.

Chua KB, Mustafa B, Abdul Wahab AH, Chem YK, Khairul AH, Kumarasamy V, et al. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. *Malays J Pathol*. 2011;33(1):13-20.

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.

Chung KM, Diamond MS. Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *J Med Virol*. 2008;80(3):547-56.

Clarke DH, Casals J 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropode-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 7: 561-573.

Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine*. 2010;28(15):2705-15.

Clyde K, Harris E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol.* 2006;80(5):2170-82.

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.

Coller BA, Clements DE. Dengue vaccines: progress and challenges. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(3):391-8.

Colombo TE, Vedovello D, Araki CS, Cogo-Moreira H, dos Santos IN, Reis AF, et al. Dengue-4 false negative results by Panbio® Dengue Early ELISA assay in Brazil. *J Clin Virol.* 2013;58(4):710-2.

Corrêa G, de A Lindenberg C, Fernandes-Santos C, Gandini M, Petitinga Paiva F, Coutinho-Silva R, et al. The purinergic receptor P2X7 role in control of Dengue virus-2 infection and cytokine/chemokine production in infected human monocytes. *Immunobiology.* 2016;221(7):794-802.

Costa RL, Voloch CM, Schrago CG. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):309-14.

Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AM. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology.* 2007;358(2):413-23.

Cucunawangsih, Lugito NPH. Trends of Dengue Disease Epidemiology. *Virology (Auckl).* 2017 Mar 15;8:1178122X17695836.

da Silva Voorham JM. [A possible fifth dengue virus serotype]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2014;158:A7946.

Dayan GH, Thakur M, Boaz M, Johnson C. Safety and immunogenicity of three tetravalent dengue vaccine formulations in healthy adults in the USA. *Vaccine*. 2013;31(44):5047-54.

de Araújo TP, Rodrigues SG, Costa MI, Vasconcelos PF, da Rosa AP. [Serological diagnosis of dengue and yellow fever infections in suspected cases from Pará State, Brazil, 1999]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(6):579-84.

de Bruycker-Nogueira F, Nogueira RM, Faria NR, Simões JB, Nunes PC, de Filippis AM, 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 Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(4):e390.

De Paula SO, Lima DM, da Fonseca BA. Detection and identification of dengue-1 virus in clinical samples by a nested-PCR followed by restriction enzyme digestion of amplicons. *J Med Virol*. 2002;66(4):529-34.

De Simone TS, Nogueira RM, Araújo ES, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(9):553-62.

de Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, et al. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(12):e1439.

Deepanjali S, Naik RR, Mailankody S, Kalaimani S, Kadhiravan T. Dengue Virus Infection Triggering Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(5):1028-30.

Diallo M, Sall AA, Moncayo AC, Ba Y, Fernandez Z, Ortiz D, et al. Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(2):445-9.

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. *Virology.* 2011;8:387.

Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2323-30.

Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, de Moraes Bronzoni RV, Bosch I, Nogueira ML. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS One.* 2013;8(3):e59422.

Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeung 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, Lavergne A, Lagathu G, Lacoste V, Martial J, Morvan J, et al. Reemergence of dengue virus type 4, French Antilles and French Guiana, 2004-2005. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1748-51.

Dutra KR, Drumond BP, de Rezende IM, Nogueira ML, de Oliveira Lopes D, Calzavara Silva CE, et al. Molecular surveillance of dengue in Minas Gerais provides insights on dengue virus 1 and 4 circulation in Brazil. *J Med Virol.* 2017;89(6):966-73.



El Sahili A, Lescar J. Dengue Virus Non-Structural Protein 5. *Viruses*. 2017;9(4).

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.

Fares RC, Souza KP, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int*. 2015;2015:321873.

Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simões JB, Nogueira FeB, 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.

Fatima Z, Idrees M, Bajwa MA, Tahir Z, Ullah O, Zia MQ, et al. Serotype and genotype analysis of dengue virus by sequencing followed by phylogenetic analysis using samples from three mini outbreaks-2007-2009 in Pakistan. *BMC Microbiol*. 2011;11:200.

Ferguson NM, Rodríguez-Barraquer I, Dorigatti I, Mier-Y-Teran-Romero L, Laydon DJ, Cummings DA. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science*. 2016;353(6303):1033-6.

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.

Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect*. 2000;2(13):1643-9.

Figueiredo LT, Batista WC, Kashima S, Nassar ES. Identification of Brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using Flavivirus universal primers. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(3):357-62.

Figueiredo ML, Alfonso HL, Amarilla AA, Figueiredo LT, Aquino VH, Costa CA, et al. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil. *Virology*. 2013;10:60.

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.

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.

Gibson G, Souza-Santos R, Pedro AS, Honório NA, Sá Carvalho M. Occurrence of severe dengue in Rio de Janeiro: an ecological study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(6):684-91.

Giraldo D, Sant'Anna C, Périssé AR, March MeF, Souza AP, Mendes A, et al. Characteristics of children hospitalized with dengue fever in an outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105(10):601-3.

Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(3):412-9.

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. *Novartis Found Symp*. 2006;277:3-16; discussion -22, 71-3, 251-3.

Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health*. 2011;39(4 Suppl):3-11.

Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1995;1(2):55-7.

Gubler DJ, Clark GG. Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. *Acta Trop*. 1996;61(2):169-79.

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.

Guerra-Gomes IC, Gois BM, Peixoto RF, Oliveira CA, Maciel BL, Sarmiento MI, et al. Molecular and clinical epidemiological surveillance of dengue virus in Paraíba, Northeast Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(1):19-26.

Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB, 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.

Guy B, Lang J, Saville M, Jackson N. Vaccination Against Dengue: Challenges and Current Developments. *Annu Rev Med*. 2016;67:387-404.

Guzmán MG, Rosario D, Muné M, Alvarez M, Rodríguez R, Kourí G. [Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994]. *Rev Cubana Med Trop*. 1996;48(2):114-7.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S716.

Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453-65.

Guzman 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*. 2010;4(8).

Guzmán MG, Kourí G. Advances in dengue diagnosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1996;3(6):621-7.

Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. Lancet Infect Dis. 2002;2(1):33-42.

Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. Viruses. 2010;2(12):2649-62.

Guzmán M, Kourí G, Díaz M, Llop A, Vazquez S, González D, et al. Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21st century. Expert Rev Vaccines. 2004;3(5):511-20.

Gyawali N, Bradbury RS, Taylor-Robinson AW. The epidemiology of dengue infection: Harnessing past experience and current knowledge to support implementation of future control strategies. J Vector Borne Dis. 2016;53(4):293-304.

Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Guy B, Bouckennooghe A, Noriega F, Jackson N. Answer to the review from Halstead and Russell "Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine" (DOI 10.1016/j.vaccine.2016.02.004). Vaccine. 2016;34(36):4273-4.

Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. Bull World Health Organ. 1980;58(1):1-21.

Halstead SB. Dengue. Lancet. 2007;370(9599):1644-52.

Halstead SB, Cohen SN. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. Microbiol Mol Biol Rev. 2015;79(3):281-91.

Edwards FW. Diptera.family culicidae. "Genera Insectorum", P. Wystman. 1932. Vol. 194: Desmet-Verteneuil, Brussels, Belgium.

Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. Am J Trop Med Hyg. 1983;32(1):154-6.

Halstead SB, Suaya JA, Shepard DS. The burden of dengue infection. *Lancet*. 2007;369(9571):1410-1.

HAMMON WM, RUDNICK A, SATHER GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*. 1960;131(3407):1102-3.

Harris E, Videira E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;63(1-2):5-11.

Heinen LB, Zuchi N, Cardoso BF, Santos MA, Nogueira ML, Dezengrini S, Hessarenko R. DENGUE OUTBREAK IN MATO GROSSO STATE, MIDWESTERN BRAZIL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(6):489-96.

Hermann LL, Thaisomboonsuk B, Poolpanichupatam Y, Jarman RG, Kalayanaroj S, Nisalak A, et al. Evaluation of a dengue NS1 antigen detection assay sensitivity and specificity for the diagnosis of acute dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3193.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011;476(7361):454-7.

Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003;3(1):19-28.

Honório NA, Castro MG, Barros FS, Magalhães MeA, Sabroza PC. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25(6):1203-14.

Horstick O, Morrison AC. Dengue disease surveillance: improving data for dengue control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11):e3311.

Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost.* 2013;11(5):951-62.

Huang CH, Kuo LL, Yang KD, Lin PS, Lu PL, Lin CC, et al. Laboratory diagnostics of dengue fever: an emphasis on the role of commercial dengue virus nonstructural protein 1 antigen rapid test. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013;46(5):358-65.

Hue KD, Tuan TV, Thi HT, Bich CT, Anh HH, Wills BA, et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Methods.* 2011;177(2):168-73.

Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):e3171.

Idrees S, Ashfaq UA. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genet Vaccines Ther.* 2012;10(1):6.

Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 1978;40(3):531-44.

Innis BL, Thirawuth V, Hemachudha C. Identification of continuous epitopes of the envelope glycoprotein of dengue type 2 virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;40(6):676-87.

Innis SM, Rioux FM, Auestad N, Ackman RG. Marine and freshwater fish oil varying in arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids differ in their effects on organ lipids and fatty acids in growing rats. *J Nutr.* 1995;125(9):2286-93.

Itha S, Kashyap R, Krishnani N, Saraswat VA, Choudhuri G, Aggarwal R. Profile of liver involvement in dengue virus infection. *Natl Med J India.* 2005;18(3):127-30.

Jameel T, Mehmood K, Mujtaba G, Choudhry N, Afzal N, Paul RF. Changing haematological parameters in dengue viral infections. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2012;24(1):3-6.

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.

Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol*. 2005;79(9):5414-20.

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 Oct;43(10):4977-83.

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.

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.

Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, Bustos Arriaga J, Green A, James SL, et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*. 2015;349(6254):1338-43.

Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect Dis*. 2017 Mar;17(3):e88-e100.

Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, et al. Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults. *J Infect Dis*. 2015;212(5):702-10.

Klungthong C, Putnak R, Mammen MP, Li T, Zhang C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J Virol Methods*. 2008;154(1-2):175-81.

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):41549.

Kosasih H, de Mast Q, Widjaja S, Sudjana P, Antonjaya U, Ma'roef C, et al. Evidence for endemic chikungunya virus infections in Bandung, Indonesia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2483.

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.

Kumara TK, Abu Hassan A, Che Salmah MR, Bhupinder S. A report on the pupae of *Desmometopa* sp. (Diptera: Milichiidae) recovered from a human corpse in Malaysia. *Trop Biomed*. 2010 Apr;27(1):131-3.

Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, Mohamad M, et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods*. 2007;140(1-2):75-9.

Kuno G, Gubler DJ, Santiago de Weil NS. Antigen capture ELISA for the identification of dengue viruses. *J Virol Methods*. 1985;12(1-2):93-103.

Lai CJ, Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Donau O, Engle RE, et al. Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody



and protection against DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys by passively transferred humanized antibody. *J Virol.* 2007;81(23):12766-74.

Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol.* 1997;78 ( Pt 9):2279-84.

Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol.* 1994;75 ( Pt 1):65-75.

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.

Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology.* 1993;197(1):216-24.

Libraty DH, Endy TP, Houg HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis.* 2002;185(9):1213-21.

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.

Ligon BL. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005;16(1):60-5.

Lima MaR, 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.

Lima MaR, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7):e738.

Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol*. 2006;19(2):127-32.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol*, v. 73, n. 6, p. 4611-21, Jun 1999. ISSN 0022-538X.

Liu Y, Jiang LY, Luo L, Cao YM, Jing QL, Yang ZC. [Phylogenetic analysis of envelope gene of dengue virus serotype 2 in Guangzhou, 2001-2015]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2017;38(1):90-5.

Loroño Pino MA1, Farfán Ale JA, Rosado Paredes EP, Kuno G, Gubler DJ. Epidemic dengue 4 in the Yucatán, México, 1984. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993 Sep-Oct;35(5):449-55.

Luo D, Xu T, Hunke C, Grüber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol*. 2008;82(1):173-83.

Macedo GA, de Araújo JM, Schatzmayr HG, Costa FA, de Filippis AM, Santos FB, et al. Virological surveillance for early warning of dengue epidemics in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013;107(3):1416.

Machado JP, Oliveira RM, Souza-Santos R. [Spatial analysis of dengue occurrence and living conditions in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro State, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2009;25(5):1025-34.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-deOliveira R, Sorgine MH, et al. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):828-9.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*30: 1292–1305.

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.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 2004;80(948):588-601.

Mandl CW, Heinz FX, Stöckl E, Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology*. 1989 Nov;173(1):291301.

Martins VoC, Bastos MeS, Ramasawmy R, de Figueiredo RP, Gimaque JB, Braga WS, et al. Clinical and virological descriptive study in the 2011 outbreak of dengue in the Amazonas, Brazil. *PLoS One*. 2014;9(6):e100535.

Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology*. 1989. 169: 354-364.

McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Mar;11(3):181-93.

McSherry J. Acute pharyngitis: a symptom scorecard and microbiological diagnosis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;284(6318):824-5.

Mentor NA, Kurane I. Dengue virus infection of human T lymphocytes. *Acta Virol*. 1997;41(3):175-6.

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.

Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 2014;22(3):138-46.

Miagostovich MP, dos Santos FB, de Araújo ES, Dias J, Schatzmayr HG, Nogueira RM. Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(5):595-9.

Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol.* 1999;14(3):183-9.

Mir D, Romero H, Fagundes de Carvalho LM, Bello G. Spatiotemporal dynamics of DENV-2 Asian-American genotype lineages in the Americas. *PLoS One.* 2014;9(6):e98519.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9(7):921-7.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):13-22.

Muller DA, Depelsenaire AC, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl\_2):S89-S95.

Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 2013;98(2):192-208.

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 Nov 25;100(24):14333-8.

Murgue B, Cassar O, Guigon M, Chungue E. Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *J Infect Dis.* 1997;175(6):1497-501.

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

Mustafa MS, Rastogi V, Gupta RK, Jain S, Singh PM, Gupta A. Wolbachia: The selfish Trojan Horse in dengue control. *Med J Armed Forces India.* 2016;72(4):373-6.

Nakao S, Lai CJ, Young NS. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood.* 1989;74(4):1235-40.

Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res Virol.* 1997;148(4):273-7.

Nisalak A. LABORATORY DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS INFECTIONS. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2015;46 Suppl 1:55-76.

Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisayakorn U, Scott RM, et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(2):191202.

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.

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, Schatzmayr HG, Moraes GC, Cardoso MA, Ferreira J, et al. Dengue type 2 outbreak in the south of the state of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995;37(6):507-10.

Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, de Carvalho R. Use of MAC-ELISA for evaluation of yellow fever vaccination. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992;34(5):447-50.

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 RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86(2):269.

Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*. 2013;342(6157):415.

Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, 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 MaR, 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.

Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC, Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):576-8.

Oliveira MJ, Cordeiro MT, Costa FM, Murakami G, Silva AM, Travassos RC, et al. [Frequency of measles, rubella, dengue and erythema infectiosum among suspected cases of measles and rubella in the State of Pernambuco between 2001 and 2004]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(4):338-44.

Ooi EE, Goh KT, Gubler DJ. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(6):887-93.

ORGANIZATION, W. H. O. W. H. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. ORGANIZATION, W. H. Geneva 2009.

Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1983;25(1):53-4.

Osorio JE, Partidos CD, Wallace D, Stinchcomb DT. Development of a recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate. *Vaccine.* 2015;33(50):7112-20.

Pang T, Cardoso MJ, Guzman 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.

Peeling RW, Smith PG, Bossuyt PM. A guide for diagnostic evaluations. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Suppl):S2-6.

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.

Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hung IQ, Binh TQ, et al. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63(4):372-8.

Pinho AC, Sardi SI, Paula FL, Peixoto IB, Brandão CJ, Fernandez FM, et al. Asian genotypes of dengue virus 4 in Brazil. *Epidemiol Infect.* 2015;143(14):3114-7.

Piza FM, Corrêa TD, Marra AR, Guerra JC, Rodrigues RD, Villarinho AA, et al. Thromboelastometry analysis of thrombocytopenic dengue patients: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):89.

Pok KY, Lai YL, Sng J, Ng LC. Evaluation of nonstructural 1 antigen assays for the diagnosis and surveillance of dengue in Singapore. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10(10):1009-16.

Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog.* 2016;12(7):e1005738.

Ramos-Castañeda J, Barreto Dos Santos F, Martínez-Vega R, Galvão de Araujo JM, Joint G, Sarti E. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(1):e0005224.

Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Viol J.* 2016;13:131.

Remy MM. Dengue fever: theories of immunopathogenesis and challenges for vaccination. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2014;13(4):262-74.

Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:315-41.

Rico-Hesse R. Dengue virus virulence and transmission determinants. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;338:45-55.

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.

Rigau-Pérez JG, Ayala-López A, García-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(4):355-62.

Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(16):2773-86.



Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, Cummings DA. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1):e935.

RODRIGUEZ-ROCHE, R.; GOULD, E. A. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *Biomed Res Int*, v. 2013, p. 690835, 2013. ISSN 2314-6141.

Rosen L, Gubler D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1974;23(6):1153-60.

Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am J Trop Med Hyg*. 1954;3(5):878-82.

Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1977 May;26(3):337-43.

Ross TM. Dengue virus. *Clin Lab Med*. 2010;30(1):149-60.

Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Weaver SC, Vasilakis N. Insect-Specific Viruses: A Historical Overview and Recent Developments. *Adv Virus Res*. 2017;98:119-146.

SABIN AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1952;1(1):30-50.

Sánchez-Vargas LA, Sánchez-Marce EE, Vivanco-Cid H. Evaluation of the SD BIOLINE Dengue Duo rapid test in the course of acute and convalescent dengue infections in a Mexican endemic region. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(4):368-72.

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.

SAÚDE S D V E. Situação epidemiológica. 2013.

SAÚDE S D V E. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at--SE-53.pdf>, 2014. Acesso em: 05/03/2016.

Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52. 2015.

Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(2):245-6.

Schmidt AC, Lin L, Martinez LJ, Ruck RC, Eckels KH, Collard A, et al. Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(6):1325-37.

Schmidt TL, Barton NH, Rašić G, Turley AP, Montgomery BL, Iturbe-Ormaetxe I, et al. Local introduction and heterogeneous spatial spread of dengue-suppressing *Wolbachia* through an urban population of *Aedes aegypti*. *PLoS Biol.* 2017;15(5):e2001894.

Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, Hombach J. Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development. *Vaccine.* 2011;29(42):7276-84.

Schüpbach, J., Flepp, M., Pontelli, D., Tomasik, Z., Lüthy, R., Böni.F J., 1996. 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* 10, 1085–1090.

Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(12):745-59.

Sea VR, Cruz AC, Gurgel RQ, Nunes BT, Silva EV, Dolabella SS, et al. Underreporting of Dengue-4 in Brazil due to low sensitivity of the NS1 Ag test in routine control programs. *PLoS One.* 2013;8(5):e64056.

SES/SINAN. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Dengue-classica-at2013.pdf> [accessed 10 April 2014].

Sekaran SD, Artsob H. Molecular diagnostics for the detection of human flavivirus infections. *Expert Opin Med Diagn.* 2007;1(4):521-30.

Sharp TM, Tomashek KM, Read JS, Margolis HS, Waterman SH. A New Look at an Old Disease: Recent Insights into the Global Epidemiology of Dengue. *Curr Epidemiol Rep.* 2017;4(1):11-21.

Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(4):642-50.

Shum D, Smith JL, Hirsch AJ, Bhinder B, Radu C, Stein DA, et al. Highcontent assay to identify inhibitors of dengue virus infection. *Assay Drug Dev Technol.* 2010;8(5):553-70.

Siler J, Hal M, Hitchens A. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine Journal of Science.* 1926. 29:1-302.

Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v, Wills B. Dengue. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1423-32.

Simmons CP, McPherson K, Van Vinh Chau N, Hoai Tam DT, Young P, Mackenzie J, Wills B. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. *Vaccine.* 2015 Dec 10;33(50):7061-8.

Singla N, Chaudhary P, Thakur M, Chander J. Dengue: An Analysis of Epidemiological Pattern Over a Six Year Period. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(12):DC12-DC4.

Smith ME, Targovnik AM, Cerezo J, Morales MA, Miranda MV, Talou JR. Integrated process for the purification and immobilization of the envelope protein domain III of

dengue virus type 2 expressed in *Rachiplusia* nu larvae and its potential application in a diagnostic assay. *Protein Expr Purif*. 2017;131:76-84.

Souza E, Nascimento G, Santana N, Ferreira D, Lima M, Natividade E, et al. Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes. *Sensors (Basel)*. 2011;11(6):5616-29.

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.

Teixeira MG, Costa MC, Coelho G, Barreto ML. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(10):1663.

Teixeira MG, Costa MaC, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S7-18.

Teixeira MG, Costa MaC, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S7-18.

Teixeira TR, Medronho ReA. [Socio-demographic factors and the dengue fever epidemic in 2002 in the State of Rio de Janeiro, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2008;24(9):2160-70.

Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):938-40.

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.

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.

Tomashek KM, Gregory CJ, Rivera Sánchez A, Bartek MA, Garcia Rivera EJ, Hunsperger E, et al. Dengue deaths in Puerto Rico: lessons learned from the 2007 epidemic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(4):e1614.

Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structurebased discovery of dengue protease inhibitors. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 Jun;9(3):327-43.

Torresi J, Ebert G, Pellegrini M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(5):1059-72.

Trung DT, Thao IT, Dung NM, Ngoc TV, Hien TT, Chau NV, et al. Clinical features of dengue in a large Vietnamese cohort: intrinsically lower platelet counts and greater risk for bleeding in adults than children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1679.

Tsai JJ, Jen YH, Chang JS, Hsiao HM, Noisakran S, Perng GC. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun*. 2011;3(5):53040.

Tumioto GL, Gregianini TS, Dambros BP, Cestari BC, Alves Nunes ZM, Veiga AB. Laboratory surveillance of dengue in Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2013. *PLoS One*. 2014;9(8):e104394.

Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 9):2605-14.

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.

Villabona-Arenas CJ, de Oliveira JL, Capra CeS, Balarini K, Loureiro M, Fonseca CR, et al. Detection of four dengue serotypes suggests rise in hyperendemicity in urban centers of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2620.

Villabona-Arenas CJ, de Oliveira JL, de Sousa-Capra C, Balarini K, Pereira da Fonseca CR, Zanotto PM. Epidemiological dynamics of an urban Dengue 4 outbreak in São Paulo, Brazil. *PeerJ*. 2016;4:e1892.

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.

Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. Single-reaction, multiplex, real-time rt-PCR for the detection, quantitation, and serotyping of dengue viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(4):e2116.

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

Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):E2046-53.

Wengler G, Wengler G, Nowak T, Wahn K. Analysis of the influence of proteolytic cleavage on the structural organization of the surface of the West Nile flavivirus leads to the isolation of a protease-resistant E protein oligomer from the viral surface. *Virology*. 1987 Sep;160(1):210-9.

Wichmann O, Yoon IK, Vong S, Limkittikul K, Gibbons RV, Mammen MP, et al. Dengue in Thailand and Cambodia: an assessment of the degree of underrecognized disease burden based on reported cases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e996.

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.

Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2872-8.

Yacoub S, Mongkolsapaya J, Screaton G. Recent advances in understanding dengue. *F1000Res*. 2016;5.

Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzymelinked 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.

Zhang X, Tang S, Cheke RA. Models to assess how best to replace dengue virus vectors with *Wolbachia*-infected mosquito populations. *Math Biosci*. 2015;269:164-77.

Zubair M, Ashraf M, Ahsan A, Nazir NU, Hanif H, Khan HA. Dengue viral infections in Pakistan and other Asian countries: a comprehensive review. *J Pak Med Assoc*. 2016;66(7):884-8.

## 8 ANEXOS

8.1 Artigo 1: A review on dengue diagnosis and epidemiology by a regional reference laboratory from 1986 to 2011, Rio de Janeiro, Brazil.

Situação do manuscrito: Artigo publicado no Dengue Bulletin

Referência: Flavia Barreto dos Santos, Ana Maria Bispo de Filippis, Eliane Saraiva Machado de Araújo, Monique da Rocha Queiroz Lima, Fernanda de Bruycker Nogueira, Nieli Rodrigues da Costa Faria, Jaqueline Bastos Santos Simões, Simone Alves Sampaio, Priscila Conrado Guerra Nunes, Manoela Heringer da Silva, Dinair Couto Lima, Rita Maria Ribeiro Nogueira

8.2 Artigo 2: Biossegurança em transporte de material biológico no âmbito nacional: um guia breve

Situação do manuscrito: Publicado em Rev Pan-Amaz Saude

Referência: Caio Augusto Martins Aires, Carlos Felipe Machado de Araujo, Mauricio Lisboa Nobre, Leonardo Alves Rusak, Ulisses Gonçalves de Assis, Diego Camilo Montenegro Lopéz, Vivian da Cruz Franco, Manoela Heringer, Allan Peres da Silva, Moyra Machado Portilho, Maria Eveline de Castro Pereira, Maria de Nazaré Correia Soeiro.

8.3 Capítulo de livro: Molecular Biology Approaches For Dengue Diagnosis And Research in Brazil: an overview.

Situação do manuscrito: Publicado em Advances in Medicine and Biology.

Referência: Fernanda de Bruycker-Nogueira, Nieli Rodrigues da Costa Faria, Priscila Conrado Guerra Nunes, Manoela Heringer, Thais Chouin-Carneiro, Patricia de Carvalho Sequeira, Monique da Rocha Queiroz Lima, Rita Maria Ribeiro Nogueira, Ana Maria Bispo de Filippis, Flavia Barreto dos Santos.



## A review on dengue diagnosis and epidemiology by a regional reference laboratory from 1986 to 2011, Rio de Janeiro, Brazil

*Flavia Barreto dos Santos,<sup>#</sup> Ana Maria Bispo de Filippis,  
Eliane Saraiva Machado de Araújo, Monique da Rocha Queiroz Lima,  
Fernanda de Bruycker Nogueira, Nieli Rodrigues da Costa Faria,  
Jaqueline Bastos Santos Simões, Simone Alves Sampaio,  
Priscila Conrado Guerra Nunes, Manoela Heringer da Silva,  
Dinair Couto Lima, Rita Maria Ribeiro Nogueira*

*Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Av Brasil 4365, Manguinhos,  
Rio de Janeiro, RJ, 21045-360, Brazil*

### Abstract

Dengue fever (DF) activity in Brazil during the past 25 years has been evidenced by a large number of cases in most states. Dengue viruses 1 to 3 (DENV-1, DENV-2 and DENV-3) were introduced in Rio de Janeiro in 1986, 1990 and 2000, respectively. In 2010, DENV-4 re-emerged 28 years after its first isolation. DENV-1 caused an explosive “virgin soil” epidemic in 1986–1987. The introduction of DENV-2 in 1990 caused the first cases of dengue haemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Introduction of DENV-3 caused severe epidemics in 2002, with the largest number of DF/DHF cases and deaths. In 2007–2008, the country experienced the most severe epidemic in terms of morbidity and mortality and severe cases in children. Phylogeny performed on DENV-2 identified distinct lineages of the Asian–American genotype. In 2009 and 2010, DENV-1 re-emerged and was prevalent in many Brazilian states. Phylogenetic studies also demonstrated distinct lineages of DENV-1. Since 1986, when virus isolation and immunoglobulin M (IgM) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were first used, laboratory diagnosis has played an important role in disease surveillance and epidemiology. After the introduction of DENV-2 in 1990, the characterization of immune response performed by the haemagglutination inhibition test was replaced by IgG-ELISA. In the 1990s, real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rtRT-PCR) and sequencing were used for nucleic acid detection and characterization. rtRT-PCR and immunohistochemistry proved to be essential for the confirmation and study of fatal dengue cases. NS1 capture tests were used for the early diagnosis of DENV infections after 2007. Since the introduction of DENV, a total of 47 346 suspected dengue cases were received by the Laboratory of Flavivirus, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, a regional reference laboratory for dengue diagnosis for the Brazilian Ministry of Health, from March 1986 to December 2011. The authors’ experience has shown that the implementation of new diagnostic techniques over the years has constituted important and reliable tools for dengue surveillance in Brazil.

**Keywords:** Brazil; Dengue virus; Diagnosis; Epidemiology.

<sup>#</sup>E-mail: flaviab@ioc.fiocruz.br

## Biossegurança em transporte de material biológico no âmbito nacional: um guia breve

Biosafety in transportation of biological material at national level: a brief guide

Bioseguridad en transporte de material biológico en ámbito nacional: una guía breve

Caio Augusto Martins Aires

Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Carlos Felipe Machado de Araujo

Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Maurício Lisboa Nobre

Laboratório de Hanseniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Leonardo Alves Rusak

Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Ulisses Gonçalves de Assis

Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Diego Camilo Montenegro Lopéz

Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Vivian da Cruz Franco

Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Manoela Heringer

Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Allan Peres da Silva

Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Moyra Machado Portilho

Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Maria Eveline de Castro Pereira

Comissão Interna de Biossegurança, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Maria de Nazaré Correia Soeiro

Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

### RESUMO

Frequentemente as amostras biológicas precisam ser transportadas a partir do momento de sua coleta até a análise final. Este processo pode ocorrer dentro de uma única instituição ou entre diferentes instituições na mesma cidade, podendo também ser direcionado para outros estados e países. Isto implica, muitas vezes, na utilização de diferentes tipos de transporte (terrestre, fluvial ou aéreo) no envio deste material. Nas etapas podem ocorrer situações de risco, considerando a natureza do material transportado e as possíveis consequências, em caso de acidentes, durante o deslocamento. Neste sentido, este breve guia tem o objetivo de esclarecer acerca dos regulamentos, normas e diretrizes relacionados ao transporte de material biológico no âmbito nacional.

**Palavras-chave:** Biossegurança; Transporte de Contaminantes; Exposição a Agentes Biológicos.

### INTRODUÇÃO

O transporte de amostras biológicas é realizado para diversos fins, como pesquisa, ensino ou diagnóstico, em níveis nacional e internacional<sup>1</sup>. Estudos demonstram que, quando há necessidade de que os ensaios sejam realizados em lugares afastados do local

de coleta, o transporte e armazenamento dos espécimes clínicos tornam-se variáveis importantes, que podem afetar a viabilidade e a função dos componentes da amostra. O efeito da temperatura dentro da embalagem e o tempo entre a coleta e o processamento da amostra podem resultar na deterioração do material e acarretar possíveis erros nas análises amostrais<sup>2,3</sup>.

Além disso, perdas na sensibilidade de testes para a detecção de micro-organismos em geral podem ocorrer em transportes inadequados, quando comparados a transportes realizados de maneira apropriada<sup>4</sup>. Dando suporte a estes achados, outros estudos reportam a degradação de material genético viral presente em amostras de sangue, quando exposto a temperaturas inadequadas<sup>5</sup>.

#### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Caio Augusto Martins Aires  
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz/Bacteriologia  
Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar  
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Rocha Lima, 3º andar. Bairro: Manguinhos  
CEP: 21040-360 Rio de Janeiro-Rio de Janeiro-Brasil  
Tel.: +55 (21) 2562-1636  
E-mail: caio.aires@outlook.com

*Chapter 1*

## **MOLECULAR BIOLOGY APPROACHES FOR DENGUE DIAGNOSIS AND RESEARCH IN BRAZIL: AN OVERVIEW**

*Fernanda de Bruycker-Nogueira,  
Neli Rodrigues da Costa Faria,  
Priscila Conrado Guerra Nunes, Manoela Heringer,  
Thais Chouin-Carneiro, Patricia Carvalho de Sequeira,  
Monique da Rocha Queiroz Lima,  
Rita Maria Ribeiro Nogueira,  
Ana Maria Bispo de Filippis  
and Flavia Barreto dos Santos\**

Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ,  
Rio de Janeiro, Brazil

### **ABSTRACT**

Dengue is a major public health in tropical and subtropical regions of the world and currently there are no specific therapies and vaccines available. In Brazil, explosive epidemics have been occurring since the 80's and over the years, the dramatic increase of dengue cases in the country has led to the establishment of a National Dengue Diagnosis Network in 1999 to monitor dengue viruses (DENV) transmission and spread as surveillance has been accepted as one of the most reliable tools for the prediction of dengue epidemics. The implementation of molecular techniques in the 90's was imperative for DENV diagnosis. The use of conventional reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, such as the one described by Lanciotti and colleagues and suggested by Pan American Health Organization is the most widely

---

\*Corresponding author: Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Marquês, Rio de Janeiro, RJ, 21045-360, Brazil. Tel.: +55 21 2562 1926; fax: +55(21) 2562 1779. E-mail address: [flaviab@ioc.fiocruz.br](mailto:flaviab@ioc.fiocruz.br) (F.B. dos Santos).

**Complimentary Contributor Copy**

