

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ROGERIO VALLS DE SOUZA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INFECÇÃO
PELOS VÍRUS DENGUE TIPO 1, 2 E 3,
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

2008

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INFECÇÃO
PELOS VÍRUS DENGUE TIPO 1, 2 E 3
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ROGERIO VALLS DE SOUZA

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José de Andrada Serpa

RIO DE JANEIRO

2008

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FOCRUZ - RJ

Souza, Rogério Valls

Contribuição ao estudo da infecção pelos vírus da dengue tipo 1, 2 e 3, no Estado do Rio de Janeiro. / Rogério Valls de Souza. – Rio de Janeiro, 2008.

xiii, 100 f.

Tese (doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, 2008
Bibliografia: f. 88 – 100

1. Estudo da dengue no Estado do Rio de Janeiro. I. Título

ROGERIO VALLS DE SOUZA

**Contribuição ao estudo da infecção pelos
vírus dengue tipo 1, 2 e 3, no Estado do Rio de Janeiro.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação de
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José de Andrada Serpa

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Clara Galhardo Gutierrez

Prof. Dr. Fernando A. Bozza

Prof. Dr. Paulo Barroso Feijó

Profa. Dra. Claire Kubleka

Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha

À memória de
Jovina Maria da Conceição

Agradecimentos

À Dra Maria José Andrada-Serpa, presença constante desde a fase de elaboração do projeto de tese, execução e redação, mas em especial, pela orientação nos momentos em que eu não via alternativas, para viabilizar esse estudo.

Ao Corpo Clínico do antigo Hospital Evandro Chagas do Instituto Oswaldo Cruz e do atual Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pois todos sabemos que o atendimento durante uma epidemia de dengue, é uma tarefa coletiva, que demanda todo o esforço e dedicação possíveis de serem mobilizados.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação pelo estímulo e apoio na elaboração desse trabalho

À Dra Maria Clara Galhardo Gutierrez, pelo apoio nas diversas fases de elaboração dessa tese e constante estímulo a ultrapassar as dificuldades.

Aos profissionais da Seção de Imunodiagnóstico, em especial, Sueli de Carvalho Maia e Ingebourg Georg, pelo cuidado na organização do fluxo do material para diagnóstico desde 1986 e a partir de 2001, pela competência técnica na execução dos exames sorológicos.

À Dra Rita Maria Ribeiro Nogueira, presença constante em nossos estudos e referência nas mais de duas décadas de estudo da dengue no Brasil.

Às companheiras no estudo dessa arbovirose e que agora estão trabalhando em outras fronteiras do conhecimento das doenças virais, em especial Dra Marise Miagostovich e Dra Elizabeth Lampe, cujas contribuições fazem parte dessa tese.

Aos meus filhos, Ana, Júlia e Miguel pela perspectiva de futuro, confirmada em cada dia que estamos juntos e para Letícia, companheira que nem em meus melhores sonhos, eu imaginaria ter ao meu lado.

Souza, R V. **Contribuição ao estudo da infecção pelos vírus Dengue tipo 1, 2, e 3, no Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2008. 100 f. Tese. [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Essa tese é composta de uma revisão da literatura que aborda aspectos históricos, da circulação desses arbovírus no mundo e no Brasil, informações sobre a epidemiologia e biologia molecular dos vírus Dengue e procura situar o estado atual do conhecimento relativo à imunopatogenia e às manifestações clínicas das diferentes formas de apresentação da doença. Quatro artigos descritos seguir são a principal contribuição: **1) Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Esse artigo resulta da atividade de vigilância epidemiológica realizada em colaboração com Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz na área metropolitana do Rio de Janeiro, onde são caracterizadas 5.324 amostras de casos suspeitos de infecção por vírus dengue nos anos 2000-2001. Detectamos a circulação de DENV-1, DENV-2 e DENV-3. A técnica da reação em cadeia da polimerase após restrição sítio-específico demonstrou que os vírus DENV-1 e DENV-2 pertenciam aos mesmos genótipos das epidemias de 1986-1987 e 1990-1991, respectivamente. Em relação à DENV-3, confirma a circulação de cepa proveniente do subcontinente indiano. São também descritos sinais de maior gravidade associados à circulação de DENV-3, quando comparados à DENV-1 e DENV-2. **2) Inducible nitric oxide synthetase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection.** Esse artigo é uma contribuição original ao estudo do papel do óxido nítrico (NO) na resposta imune ao DENV-1. Observa-se a expressão de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em monócitos de pacientes com febre da dengue, através da citometria de fluxo. A mesma metodologia detectou antígeno de vírus Dengue em monócitos humanos até 3 dias após infecção *in vitro*. Os monócitos apresentaram aumento da produção de iNOS, de maneira inversamente proporcional à redução do antígeno viral. Demonstramos que doadores de NO como o Nitroprussiato de Sódio, reduzem a detecção de antígeno viral pós-infecção, enquanto inibidores da produção de NO como a N^G-metil L arginina aumentam a proporção de células C6/36 infectadas. Esses dados demonstram o papel dos monócitos na produção de NO, assim como a sua importância no controle da replicação viral. **3) Correlation of serum neopterin levels with disease severity in dengue patients.** Esse artigo compara as dosagens séricas de neopterina em três momentos: fase aguda, defervescência da febre e convalescença, em três grupos de pacientes, i.e., pacientes com dengue grave, pacientes com febre da dengue e controles sadios, estabelece a cinética de neopterina nesses três grupos. Demonstra que na fase aguda pacientes com dengue grave ou não apresentam níveis elevados de neopterina em relação aos controles, enquanto na convalescência os pacientes com dengue grave permanecem com níveis elevados. Na fase de defervescência definida como o intervalo entre 6-10 dias de doença observamos que, em especial nesse período, os pacientes graves podem ser discriminados dos casos de febre da dengue e dos controles sadios. Esses resultados demonstram pela primeira vez a cinética da neopterina em pacientes com diferentes níveis de gravidade de doença. **4) Aspectos clínicos e laboratoriais relacionados à introdução de Dengue 1, 2 e 3, no Estado do Rio de Janeiro.** Esse estudo descreve as manifestações clínicas e laboratoriais observadas em três períodos epidêmicos, relacionados à introdução dos

sorotipos endêmicos no Brasil. Demonstramos que com a introdução de DENV-2 e DENV-3, houve uma maior frequência de manifestações clínicas associadas à gravidade como vômitos, dor abdominal e hemorragias, acompanhadas de alterações laboratoriais sugestivas de um comprometimento sistêmico maior, traduzido pela maior intensidade das alterações das provas de função hepática e trombocitopenia. O estudo da resposta imunológica demonstrou uma associação da resposta secundária com esse perfil de agravamento nas infecções por DENV-2, porém, no período de circulação de DENV-3, observamos uma maior frequência de vômitos, dor abdominal, elevação de transaminases, leucopenia, trombocitopenia em pacientes com resposta imune primária. Esses dados confirmam o agravamento do perfil clínico e laboratorial da doença associada à introdução de DENV-2 e DENV-3 e demonstra o potencial patogênico de DENV-3, mesmo em infecções primárias por flavivírus.

Palavras-chave: 1 Dengue, 2 Vigilância, 3. Imunopatogenia, 4. Quadro Clínico.

Souza, R V. **Contribution to the understanding on dengue virus type 1, 2 and 3 infection in the State of Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2008. 100 f. Thesis. [Doctor in Science-Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

This thesis has an introduction with a review of the literature on the historical aspects of the spread of dengue virus in the World and Brazil. It brings information about the molecular biology and epidemiology of dengue virus as well as the current knowledge on immunopathogenesis and clinical features of the disease. However, the main contribution are the four studies that follow: 1) **Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** This study presents results obtained on the virological surveillance of dengue virus (DENV) transmission in the Metropolitan Region of the State of Rio de Janeiro, in the period 2000-2001. A total of 5324 serum samples were analyzed. The introduction of DENV-3 to the region in December 2000 resulted in the co-circulation of three serotypes: DENV-1, DENV-2 and DENV-3. Despite the introduction of a new serotype, an outbreak due to DENV-1 was observed in the city of Niteroi. The restriction site-specific PCR patterns obtained for DENV-1 and DENV-2 isolated in that period showed that those strains belonged to the subtypes previously circulating in the state. DENV-3 RSS-PCR patterns confirmed that these viruses belonged to subtype C (Sri Lanka/India strains), represented by the strain circulating on the American continent. 2) **Inducible nitric oxide synthetase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection.** Mononuclear phagocytes are considered to be main targets for DENV. Nitric oxide (NO), usually produced by activated mononuclear phagocytes, has antimicrobial and antiviral activities. The expression of DENV antigens and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human blood isolated monocytes were analyzed by flow cytometry using cells either from patients with acute Dengue Fever or after DENV-1 *in vitro* infection. DENV-1 susceptibility to iNOS inhibition and NO production was investigated using NG-methyl L-Arginine (NGMLA) as an iNOS inhibitor, which was added to DENV-1 infected human monocytes, and sodium nitroprussiate (SNP), a NO donor, added to infected C6/36 mosquito cell clone. Viral antigens after treatments were detected by flow cytometry analysis INOS expression in activated monocytes was observed patients with Dengue Fever and was absent in cells from healthy individuals. DENV antigens were observed early during *in vitro* infection, significantly diminished with time, indicating that virus replicated, however monocytes controlled the infection. On the other hand, the iNOS expression was detected at increasing frequency in *in vitro* infected monocytes, exhibiting an inverse relationship to DENV antigen expression. We demonstrated that the detection of the DENV-1 antigen was enhanced during monocyte treatment with NGMLA. This study is the first to reveal the activation of DENV infected monocytes based on induction of iNOS both *in vivo* and *in vitro*, as well as the susceptibility of DENV-1 to a NO production. 3) **Correlation of serum neopterin levels with disease severity in dengue patients.** Recent reports have demonstrated increased neopterin concentrations during acute viral infections; in addition few studies tried to correlate neopterin level to the severity of dengue fever. We now demonstrated persistent higher neopterin levels in severe dengue when compared to classical dengue fever. Serial serum neopterin determinations may be a biological marker for the detection of severe dengue fever. 4) **Clinical and laboratorial aspects related to the**

introduction of dengue virus 1, 2 and 3 in the State of Rio de Janeiro. This study describes clinical and laboratory aspects observed during three epidemics, related to the introduction of dengue virus serotypes presently endemic in Brazil. We demonstrated that with the introduction of DENV-2 and DENV-3, a higher frequency of severe manifestations such as vomiting, abdominal pain and hemorrhage as well as laboratory features suggestive of a more severe systemic compromising, translated by higher AST and ALT levels and thrombocytopenia were observed. The antibody response analysis revealed an association of previous described severe manifestations with secondary dengue, in cases with DENV-2 infection, but during the period of DENV-3 circulation, vomiting, abdominal pain, altered liver function tests, leucopenia and thrombocytopenia, were associated with a primary antibody response. These data confirm previous observations on DENV-3 virulence in primary infections

Keywords: 1 Dengue, 2 Surveillance, 3. Immunopathogenesis, 4. Clinical manifestations.

LISTA DE ABREVIACÕES

- ALT: Alanina aminotransferase.
- AST: Aspartato aminotransferase.
- CD: Cluster de diferenciação.
- CID: Coagulação intravascular disseminada.
- CK: Creatina-fosfoquinase.
- CXCL10: chemocina (motivo C-X-C) ligante 10.
- DC: Célula dendrítica.
- DC-SIGN: Molécula intercelular específica de adesão de célula dendrítica.
- DENV-1: Vírus dengue sorotipo 1.
- DENV-2: Vírus dengue sorotipo 2:
- DENV-3: Vírus dengue sorotipo 3:
- DENV-4: Vírus dengue sorotipo 4:
- FC R γ IIa: Receptor Fc γ IIa.
- FD: Febre da dengue.
- FHD: Febre hemorrágica da dengue
- HI: Inibição de hemaglutinação.
- HLA: Antígeno leucocitário de histocompatibilidade.
- IFN- γ : Interferon gama.
- IL-12: Interleucina 12
- IOC: Instituto Oswaldo Cruz.
- IPEC: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.
- MIF: Fator inibidor da migração de macrófagos.
- NK: Célula natural killer.
- NS: Proteína não-estrutural.
- OMS: Organização Mundial de Saúde.
- PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1.
- PRNT: Neutralização por redução de placas.
- PT: Tempo de protrombina.
- PTTa: Tempo parcial de tromboplastina ativada.
- TLR7: Receptor toll-like-7

RNA: Ácido ribonucléico.

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro.

SCD: Síndrome do Choque da Dengue.

sIL2R: Receptor de interleucina-2 fração solúvel.

TF: Fator tissular.

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa.

VCAM-1: Molécula de adesão vascular 1

SUMÁRIO

Introdução	1
1. Histórico	1
1.1. Dengue nas Américas	2
1.2. Dengue no Brasil	3
2. O agente etiológico	4
2.1. Relações antigênicas	5
2.2. Variações intratípicas	5
3. Patogenia	6
3.1. Patogenia na infecção primária	7
3.2. Patogenia na infecção secundária	8
4. Quadro clínico	11
4.1. Febre da dengue	12
4.2. Febre Hemorragia da dengue	13
4.3. Críticas à classificação da OMS e outros critérios de gravidade adotados em publicações recentes	16
4.4. Aspectos clínicos da dengue no Brasil	18
5. Diagnóstico	18
6. Tratamento	20
7. Prevenção	23
7.1. Vacina	23
Justificativa	25
Objetivos	25
Primeiro artigo	26
Segundo artigo	37
Terceiro artigo	50
Quarto artigo	65
Discussão	82
Conclusões	87
Sugestões	88
Referências bibliográficas	89

Introdução

1. Histórico

Os primeiros relatos de dengue, compreendido como síndrome febril, de início súbito, acompanhada de mialgia generalizada, artralgia, cefaléia, dor retroorbital e hiperemia conjuntival com a presença eventual de exantema, acometendo extensas parcelas da população de determinada região, foram encontrados em 1779 por Siler (1) em lugares tão distantes como a ilha de Jacarta, na Ásia, e no Cairo e Alexandria, no Egito. Posteriormente, as minuciosas observações de Benjamin Rush sobre a epidemia ocorrida na Filadélfia em 1780, relacionando fatores ambientais, tais como: a elevação da temperatura e a proliferação de mosquitos, ao aparecimento dos primeiros casos. O quadro clínico relatado por Rush permanece como uma das melhores descrições das manifestações clínicas dessa arbovirose, não deixa margem à dúvida em relação à etiologia do surto ocorrido nessa região (2).

Cabe lembrar ainda os escritos de Carlos Finlay, citado por Siler, em que discute a etiologia de uma síndrome febril que acometeu colonizadores recém-chegados às, então, Antilhas Francesas, no ano de 1648, considerada como uma epidemia de "febre amarela frustra". O autor cubano discrimina os conhecidos sintomas da febre amarela, dos observados na região, e levanta a hipótese de se tratar de casos de dengue. Durante o século XIX são descritas epidemias nos quatro continentes, África, Ásia, América e Europa.

Em 1903, Graham forneceu pela primeira vez, evidências da transmissão por artrópode expondo voluntários a mosquitos coletados em casas com pessoas doentes, sem, no entanto, identificar corretamente a espécie transmissora. Esta descoberta coube a Bancroft em 1906, através da identificação dos hábitos diurnos da espécie transmissora, assim como pela infecção de voluntários, concluindo, então, ser o *Aedes aegypti*, o vetor da dengue (1).

Ashburn e Craig demonstraram em 1907, o caráter ultramicroscópico e filtrável do agente etiológico, através da inoculação em voluntários de sangue previamente tratado com filtros retentores de bactérias (1).

Simmons e cols. (3) em 1930, estabeleceram o papel do *Aedes albopictus*, na transmissão do dengue e a ocorrência de infecção inaparente em macacos, sugerindo a existência de um ciclo selvático na ausência do homem, fato posteriormente confirmado por Rudnik (4) e Yuwono (5).

Ao final da Segunda Guerra Mundial, Sabin (6) fez importantes contribuições em relação a esta arbovirose, tais como: a) a definição de dois sorotipos virais (Hawaii e New Guinea B, C e D), posteriormente relacionados como Dengue tipo 1 e Dengue tipo 2; b) o tamanho da partícula viral; c) as vias de infecção; d) substâncias químicas inativantes, e) o espectro clínico da doença em infecções experimentais, e f) a duração da imunidade homóloga e heteróloga.

Neste período, o fato mais importante, no entanto, foi o desenvolvimento do modelo de infecção em camundongos recém-nascidos, realizado de forma independente por pesquisadores japoneses e por Sabin, o que resultou na observação da atenuação da capacidade do vírus em provocar doença humana e conseqüentemente nos primeiros ensaios de vacinação, assim como, na elaboração de testes sorológicos que permitiram a identificação de anticorpos neutralizantes (7).

Após a Segunda Guerra Mundial, um novo padrão da doença aparece no Sudeste Asiático, inicialmente nas Filipinas em 1954 e posteriormente na Tailândia em 1958, acometendo principalmente crianças, com casos mais graves, sendo freqüente a evolução para o óbito. São isolados, então, por Hammon (8) além dos sorotipos anteriormente identificados por Sabin, os vírus Dengue tipo 3 e 4.

Halstead (9) em trabalho de revisão, identifica na literatura, epidemias de febre hemorrágica, ocorridas na Austrália em 1897, sul dos Estados Unidos da América em 1922, África do Sul em 1927, Grécia em 1928, Formosa em 1931 e vários países do Sul e Sudeste da Ásia.

1.1 Dengue nas Américas

Após o período de 1940 a 1970 em que a circulação de vírus Dengue ocorreu de forma limitada resultado dos esforços para erradicação do *Aedes aegypti*, em 1977, é detectado o vírus Dengue tipo 1 na Jamaica e em extensas epidemias nos países caribenhos, incluindo Cuba, onde não era detectada atividade da doença desde 1946. Esta pandemia envolveu países da América Central, como Honduras, El Salvador, Belize, chegando ao México no final de 1978 e ao sul dos Estados Unidos em 1980, onde ocorreram casos autóctones. Os países do norte da América do Sul também foram afetados (10)

Na década de 80 observa-se um grande aumento do número de casos da doença na região, sendo o evento mais importante a epidemia de 1981 de dengue hemorrágico em Cuba, pelo sorotipo 2, onde foram registrados 344.203 casos, com 116.151

hospitalizações, 10.312 pacientes desenvolveram síndrome de choque com 158 óbitos, sendo 101 em crianças (11). Ainda em 1981, é detectado o vírus Dengue tipo 4, em países do Caribe, disseminando-se, posteriormente, para países da América Central, México e norte da América do Sul (10).

O sorotipo 1 reintroduzido no Brasil em 1986, é responsável por epidemias em países como Bolívia, Paraguai e Equador em 1988, que não haviam registrado casos de dengue por várias décadas.

A década de 80 termina com uma epidemia de dengue hemorrágico na Venezuela em 1989 (12). Houve isolamento de vírus Dengue tipo 1 (DENV-1), vírus Dengue tipo 2 (DENV-2) e vírus Dengue tipo 4 (DENV-4), porém, com predomínio de DENV-2, que foi o único sorotipo detectado nos casos fatais.

Em 1994, é re-introduzido no continente o DENV-3 que não era detectado desde a década de 1970 (13). Epidemias por esse sorotipo, foram registradas em países da América Central (14) e em 2000 foi detectado no Brasil, onde foi o principal agente das epidemias verificadas nos dois anos seguintes 2001 e 2002.

1.2 Dengue no Brasil

O primeiro surto da doença em que houve isolamento viral aconteceu em fins de 1981, em Boa Vista, Roraima, onde foram isolados os DENV-1 e DENV-4. Entre os casos notificados, não foram detectados sinais de gravidade (15). Este surto por ter ocorrido em área enzoótica de febre amarela, chamou a atenção para o risco de reurbanização dessa doença.

Em 1986, durante investigação de uma epidemia de doença febril no Município de Nova Iguaçu, foi isolado DENV-1 (16). Nos anos 1986/87 foram verificadas epidemias por esse sorotipo nos Estados do Rio de Janeiro, Alagoas e Ceará. Os Estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e São Paulo também notificaram casos, porém, em menor número (10).

Em abril de 1990 é isolado o sorotipo 2 na cidade de Niterói (17). A epidemia se estendeu por toda a região metropolitana. Os isolamentos virais revelaram a co-circulação dos sorotipos 1 e 2.(18).

Com a introdução de DENV-2, casos mais graves começaram a ser notificados. Na década de 1990, foram confirmados 893 casos de Febre Hemorrágica de Dengue (FHD) no Brasil, com 44 óbitos, 75% dos quais ocorreram no Estado do Rio de Janeiro (19).

O isolamento de DENV-3 em 2000, novamente no Estado do Rio de Janeiro, deu início a um novo período epidêmico nos anos 2001-02, em que foram registrados 288.245 casos apenas em 2002, tornando-se a maior epidemia já registrada no Estado, 1.831 casos de FHD foram notificados, com 91 óbitos. Entre os casos fatais foi detectado apenas DENV-3, apesar de ter sido detectada a presença também de DENV-1 e DENV-2 em menor proporção durante essa epidemia (20).

2.O agente etiológico.

O vírus Dengue é um **arbovírus** (**arthropod-borne**), classificado desde 1985, entre os membros da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (21), cujo protótipo é o agente da febre amarela, sendo conhecidos quatro sorotipos, Dengue 1, 2, 3 e 4.

O vírus maduro consiste de um genoma composto de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples, com polaridade positiva, circundado por nucleocapsídeo de aproximadamente 30nm de diâmetro e recoberto por um envelope lipídico, resultando em uma estrutura de aproximadamente 50 nm.

São reconhecidas três proteínas estruturais: C, principal componente do nucleocapsídeo; M, proteína associada à membrana e E, proteína do envelope. A proteína preM ou prM, precursora da M, é detectada durante a fase intracelular. A formação da proteína M é um evento terminal na morfogênese do vírion, e resulta em um grande aumento da sua infecciosidade. A proteína E contém o sítio de ligação ao receptor celular, a proteína de fusão (7), além de apresentar os principais epitópos associados à formação de anticorpos neutralizantes.

As proteínas não-estruturais são sete, conhecidas pelas siglas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5. A primeira proteína desse grupo, NS1, apresenta duas formas: uma ligada à membrana e uma forma secretora (sNS1) detectável por testes diagnósticos recentes (22) e que além de ser um importante alvo do sistema imune do hospedeiro, tem sido associada à patogenia das formas graves (23). A NS2a é necessária para a proteólise do término carboxil da NS1. A NS2b é um co-fator da NS3, que possui atividade de protease, atuando no processamento pós-tradução da poliproteína, apresentando ainda atividade de RNA helicase e de nucleosídeo trifosfatase. As proteínas NS4a e NS4b, parecem atuar como co-fatores da replicação do RNA viral, além de possuírem a capacidade de inibir a sinalização para produção de interferon tipo I (24) e por fim, à NS5, é atribuído o papel de RNA polimerase (25).

O RNA viral se comporta como um RNA mensageiro (RNAm), e portanto, funciona como molde tanto para a replicação, como para a tradução do genoma. Enquanto a primeira ocorre no citoplasma, a tradução ocorre no retículo endoplasmático. A poliproteína é processada por proteases do hospedeiro e do vírus. Na fase de formação do nucleocapsídeo, a proteína C interage com o RNA. Durante a exocitose a prM que estabiliza a proteína E, é clivada um pouco antes da saída do vírus, deixando um pequeno fragmento M ancorado no envelope viral (26).

2.1.Relações antigênicas.

Reações sorológicas cruzadas em amostras coletadas na fase de convalescença de dengue com outros flavivírus, foram observadas por Sabin em 1950 (27), sendo reconhecidas respostas anamnéticas em indivíduos imunizados contra a febre amarela quando infectados por outros vírus da mesma família. A existência de um complexo dengue, foi definida em estudos realizados por Russel em 1970 (28), através da detecção de determinantes antigênicos na proteína NS1. Esta observação foi complementada, utilizando anticorpos monoclonais, com a identificação de antígenos estruturais e não estruturais específicos do complexo dengue, e de epitopo na glicoproteína do envelope, compartilhado por todos os flavivírus (29).

2.2.Variações intratípicas.

A ocorrência de epidemias de dengue com variáveis graus de gravidade, por um mesmo sorotipo, estimulou a pesquisa de variações intratípicas. Nas Américas, por exemplo, a circulação de uma cepa americana do vírus Dengue 2 no Peru, ocorreu sem relato de formas graves (30). Em contraste, a cepa introduzida na década de 1980, em países como Cuba e Venezuela, causa desde então, graves epidemias em todo continente americano (31).

Estudos da década de 1980, através da análise de oligonucleotídeos do RNA viral, demonstraram a variabilidade genética dentro de cada sorotipo (32). Porém, apenas com o sequenciamento de genes, foi possível comparar as diferentes cepas virais. Essa metodologia permitiu a definição de genótipos, agrupando cepas com elevada semelhança na região do genoma viral estudada. Não há uma coincidência em relação aos genótipos estabelecidos pelos diferentes grupos de pesquisa (33) (34). No caso de DENV-2, são descritos cinco genótipos, dois dos quais circulam no continente

americano como já mencionado. Em relação ao DENV-3, são caracterizados 4 subgrupos, porém, nas Américas, desde a sua re-introdução, em 1994, na Nicarágua (35), circula, apenas um genótipo, proveniente do subcontinente indiano, o qual tem sido associado à epidemias de maior gravidade. Algumas restrições em relação ao uso do sequenciamento de genes para o estabelecimento de genótipos têm sido levantadas, como o estudo de regiões diferentes do genoma pelos grupos de pesquisa, ausência de padronização dos procedimentos estatísticos para a análise comparativa, e no caso de DENV-1 e DENV-4, o reduzido número de cepas analisadas (36).

Apesar dessas limitações, a definição de um genótipo de DENV-2 do Sudeste Asiático associado a epidemias mais graves como a de Cuba em 1981 e do Brasil em 1990 (37) em contraposição, ao genótipo americano, caracterizado como o agente da epidemia ocorrida no Peru, assim como, a maior patogenicidade da cepa de DENV-3 atualmente em circulação no Continente Americano, são contribuições importantes à epidemiologia molecular dos vírus Dengue (36).

3. Patogenia

No ser humano, as células preferenciais de replicação dos vírus Dengue são os macrófagos, monócitos e células dendríticas. Existem também evidências de infecção de linfócitos B (38). Na literatura discute-se, se os achados de autópsia como a presença de antígenos virais no endotélio dos sinusóides hepáticos, endotélio vascular dos pulmões (39), neurônios (40) e hepatócitos (41), indicam replicação viral *in vivo*, nesses sítios, porém, isto ainda não foi demonstrado de forma conclusiva.

O receptor celular do vírus ainda é objeto de investigação, porém, são definidas duas formas de acesso ao citoplasma da célula. Na infecção primária, a principal molécula envolvida é a DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin) (42), presente em células dendríticas na derme. Nas infecções secundárias (por um outro sorotipo), o segundo mecanismo de entrada descrito, seria através de receptores para a fração FC do anticorpo induzido na primeira infecção e que também estão presentes nas células apresentadoras de antígeno. Esse anticorpo, através de uma reação cruzada, se ligaria ao novo sorotipo infectante e teria a sua entrada facilitada através da ligação aos receptores FC gama IIa (FC γ RIIa), no seu sítio de multiplicação (43).

Qual a participação do endotélio vascular na síndrome de extravasamento plasmático das formas graves, tem sido uma questão levantada desde que os estudos anatomopatológicos demonstraram a ausência de lesão dessa barreira celular (44). Os estudos experimentais envolvendo modelos de infecção de células endoteliais têm sido questionados, uma vez que não há evidência de infecção produtiva dessas por vírus dengue (45). Porém, níveis plasmáticos elevados de moléculas celulares de adesão vascular-1 (VCAM-1) (46, 47) e a detecção de células endoteliais circulantes, evidenciam a presença de dano vascular (48). Estudo recente, demonstrou a produção por células endoteliais não infectadas, de quemocina ligante-10 (CXCL10), na presença de mononucleares ativados, ou de interferon- γ (IFN- γ), o que pode estar relacionado ao seqüestro de linfócitos nos locais de multiplicação viral e à presença de linfopenia no início dos quadros de dengue (49).

3.1 Patogenia na infecção primária

Após a inoculação na derme, há a migração para o local de células dendríticas (DC) imaturas derivadas da linhagem monocítica altamente permissíveis à infecção viral, esse contato, resulta na ativação dessas células e de outras não infectadas adjacentes, que passam a expressar moléculas de superfície como HLA-DR, CD11b e CD83 (50) e migram para os linfonodos regionais, onde são capazes de recrutar linfócitos, ocorrendo, desta forma, infecção de outras células do sistema fagocítico mononuclear como macrófagos e monócitos e linfócitos B.

É detectada no local da infecção a secreção de IFN- α , IFN- γ , fator de necrose tumoral α (TNF- α) e pequenas quantidades de IL-12 pelas DC (50). A resposta de IFN- α parece estar relacionada à ativação de receptores toll-like-7 (TLR7) (51). A presença de IFN do tipo I é um importante estímulo para proliferação de células natural killer (NK), cujos receptores HLA classe I, assim como a capacidade de reconhecer uma grande variedade de moléculas expressas pelas células infectadas, as torna no principal instrumento para eliminação das células infectadas. A produção de óxido nítrico pelas células apresentadoras de antígeno, também é reconhecido como importante fator de controle na replicação viral (52).

O vírus utiliza como forma de evasão da resposta imune, a capacidade de proteínas não estruturais, NS4a e NS4b, de inibirem a sinalização para a síntese de interferon do tipo I, assim como reduz a produção de óxido nítrico e induz a célula dendrítica a

produzir IL-10, o que interfere com o processo de maturação dessas células e favorece a replicação viral (53) (45) (49).

Esse período pré-viremia costuma variar de 3 a 5 dias, após o que observa-se uma viremia, cuja duração em geral coincide com a da febre, nessa fase são detectados vários marcadores associados à ativação de linfócitos, macrófagos e células dendríticas, como TNF- α , receptores solúveis de TNF (sTNFR), IL-2 (sIL2R) e IFN- γ (54, 55) e apoptose celular como o CD95 solúvel (56). Os casos com menor gravidade, isto é, de febre da dengue, exibem, no entanto, reduzidos níveis de viremia, e dos marcadores inflamatórios (57), assim menor período de detecção de imunocomplexos circulantes e de ativação do complemento (23) (58).

Estudos imunogenéticos realizados em Cuba (59) e no México (60) sugerem que a presença do alelo HLA-DR4 confere proteção contra formas graves de dengue. Deve-se ressaltar que esse alelo apresenta alta frequência na população ameríndia das Américas (59) e foi associado a uma redução do risco para formas graves. Fatores associados à gravidade como o polimorfismo no gene TAP (61), responsável pela apresentação de antígenos aos linfócitos, parecem estar associados a um risco maior de FHD, assim como o polimorfismo no gene do receptor celular de vitamina D e do receptor FC γ -IIA (62). Como já foi discutido, o genótipo viral, também parece desempenhar um papel no desenvolvimento das formas graves da doença.

Uma situação especial de casos graves em infecção primária por vírus Dengue é aquela observada em crianças abaixo de 1 ano de vida. Como a sua patogenia está relacionada à presença de anticorpos maternos, discutiremos em conjunto com os casos associados à infecção secundária.

3.2 Patogenia na infecção secundária

A situação de hiperendemicidade e co-circulação de vários sorotipos de vírus Dengue resultante da ruptura ambiental, movimentação de tropas e de populações observadas na II Guerra Mundial no Sudeste da Ásia, e mais recentemente associada ao grande crescimento das áreas urbanas e do transporte aéreo, estabeleceram uma situação inédita na qual grandes parcelas da população nessa região, passaram a apresentar múltiplas infecções por esse arbovírus. Este fato coincidiu com o aparecimento de epidemias de formas graves da doença, acometendo principalmente crianças e com uma

distribuição por faixa etária bimodal, com um primeiro pico entre 6 meses e 1 ano de idade e um segundo entre 2 e 6 anos (63).

Estudos da década de 1960 (64) (65) demonstraram elevada proporção de casos com gravidade e resposta imune secundária para vírus Dengue, enquanto que os casos graves com infecção primária, concentravam-se entre os pacientes com menos de 1 ano de idade. A partir dessas observações, foi formulada a hipótese de doença modificada pela presença de anticorpos heterólogos, isto é, induzidos por infecção anterior por um outro sorotipo (66).

Essas observações clínico-epidemiológicas da década de 1960 foram complementadas com trabalhos *in vitro* utilizando monócitos de sangue periférico e diluições progressivas de soro imune, demonstrando que em baixas diluições havia neutralização, porém, a partir de determinada diluição, as culturas de células exibiam uma elevação da replicação viral de até 20 vezes, em relação ao controle (67).

A partir de dados da cinética de anticorpos maternos, Kliks e col. (68) estudaram a capacidade de anticorpos de mães de pacientes menores de 1 ano com FHD, em aumentar a replicação viral em macrófagos infectados, os autores encontraram significativa correlação entre a idade de início da doença nas crianças e os níveis estimados de anticorpos pré-infecção. A partir da média de anticorpos neutralizantes maternos na amostra estudada, os autores estimaram em 8,3 meses a idade de maior incidência da doença, essa estimativa correspondeu à moda de idade observada em crianças com FHD menores de 1 ano em Bangcoc.

Esses estudos foram inicialmente criticados, devido à elevada incidência de infecção secundária na população estudada, o que dificilmente poderia caracterizar tal fato como fator de risco, pois apenas um pequeno grupo desenvolvia formas graves. A descrição de epidemias com síndrome de choque e casos fatais causados por infecção primária por vírus Dengue (69), parece reforçar o argumento dos críticos. Outro aspecto também ressaltado por esse grupo, é a definição adotada da doença, que permite que pacientes sem hemorragia sejam classificados como FHD, enquanto outros casos, às vezes, com evolução fatal devido a trombocitopenia e hemorragias graves, não eram incluídos nessa classificação (70, 71).

Estudos de coorte com 3.185 crianças, em idade escolar, realizadas em Rayong, Tailândia e com 12.139 crianças em duas cidades da área metropolitana de Rangun, Burma, (72) (73) tiveram como principal dificuldade o reduzido número de casos com diagnóstico de dengue que evoluíram para formas graves. Na primeira coorte, 22

pacientes tiveram diagnóstico de síndrome de choque, e todos apresentavam resposta imune secundária, o que não permitiu calcular o risco relativo (RR). Já na coorte em Burma, o RR foi estimado em 103,3 (14,3-746,6). Como se pode observar, o intervalo de confiança é muito grande, pois foram diagnosticados 93 pacientes com SCD, porém, apenas 2 casos com infecção primária. Nesses estudos o principal fator de risco foi infecção secundária por DENV-2.

A infecção secundária foi considerada como importante fator de risco para formas graves nas epidemias de 1981 e 1997 causadas por DENV-2 em Cuba. No primeiro caso a ausência de FHD em crianças nascidas após a epidemia de 1977 por DENV-1 e na segunda epidemia, a grande incidência de formas graves em adultos expostos à epidemia de 1977, parecem confirmar o papel importante da infecção secundária por DENV-2 na etiologia da FHD (74).

Em estudos longitudinais como o realizado em Bangcoc no período de 1973 a 1999, com 15.376 casos diagnosticados de dengue (75), desses 4.846 (31,5%) com isolamento viral, os autores mostraram que nos casos com FHD e infecção primária, o principal sorotipo isolado foi DENV-3, 230 casos (49%), enquanto na infecção secundária, predominou DENV-2 com 40% (1234/3106) dos casos com isolamento viral.

O agravamento do quadro clínico em um estágio da doença em que a viremia está sendo controlada, a curta duração desse período crítico e a ausência de infiltrados inflamatórios que explicassem as alterações de permeabilidade vascular, direcionou grupos de pesquisa para o estudo do perfil de produção de citocinas nas diferentes formas de apresentação clínica da dengue. Diversas citocinas, mas em especial, TNF- α , interferon- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-8, foram detectadas em níveis significativamente mais elevados nos casos mais graves (76) (54) (77). Estudos iniciais da imunidade celular, demonstraram a presença de linfócitos com resposta cruzada para sorotipos não relacionados à infecção corrente, assim como a detecção de receptores solúveis de IL-2, CD4 e CD8 solúveis, associados à ativação celular (78) (79). A ativação precoce, isto é, a partir do 2º dia de febre, de linfócitos T CD8 e Natural-Killer (NK), expressando CD69 em proporção significativamente mais elevada nas formas graves em relação aos casos de FD, sugere a participação dessas células na imunopatologia da FHD (80).

Foi definida uma resposta celular na infecção secundária, menos eficaz em combater a infecção viral corrente, pois grande parte dos linfócitos de memória prolifera direcionados para os epitopos do vírus responsável pela primeira infecção, o que resulta

numa subpopulação linfocitária produtora de citocinas inflamatórias - TNF- α e interferon- γ - que evolui para apoptose maciça. Também, foi demonstrada uma menor capacidade de liberação de grânulos citotóxicos, resultando em uma menor capacidade para lisar as células infectadas. (81, 82) (56). Essa reação foi denominada pecado original antigênico. A sua contrapartida humoral, já havia sido descrita por Halstead (83), que demonstrou na infecção secundária, uma maior produção de anticorpos para o primeiro sorotipo infectante.

A correlação entre o título de viremia e a gravidade da doença foi sugerida em coorte na Tailândia, na qual eram incluídos pacientes com no máximo 72 h de febre. Picos de viremia 100-1000 vezes maiores em pacientes com SCD em comparação aos casos de febre do dengue, foram observados. Nesse estudo inicial, a viremia foi estimada em termos da dose infectante média em mosquitos (84). Estudo quantificando o RNA viral, confirmou os resultados anteriores e permitiu detectar o RNA viral na fase de defervescência nos casos de FHD, associado a imunocomplexos, enquanto nos casos sem gravidade, não havia mais RNA detectável (85).

Parece haver uma correlação entre a concentração da proteína não estrutural NS1 com a viremia e a gravidade da doença (86). Este peptídeo é um importante alvo da resposta humoral e foi atribuído aos anticorpos para NS1 um papel na ativação do endotélio em experimentos *in vitro* (87). Estudo com séries de pacientes, porém, revelou a importância desses anticorpos na ativação do complemento e um possível papel na síndrome de extravasamento plasmático (23). Os autores mostraram níveis elevados de C5a e do complexo terminal de ativação do complemento C5b-9 no líquido pleural de casos de síndrome de choque.

Técnicas que permitem avaliar a relação entre a expressão de um grande número de genes em células mononucleares do sangue periférico e a apresentação clínica da dengue, confirmam os dados que definem uma resposta inicial associada à ativação dos genes pertencentes ao sistema do interferon tipo 1, correspondendo a uma evolução benigna, enquanto os genes relacionados à ativação de células B e T, produção de citocinas, ativação do complemento e apoptose de células T, se correlacionam com formas mais graves da doença (88).

4.Quadro Clínico

Habitualmente as manifestações clínicas da infecção por vírus Dengue têm sido descritas de forma bipolar, isto é, como benignas, onde se incluem os quadros oligoassintomáticos e a febre da dengue (FD), ou formas graves, com uma fisiopatologia distinta, chamadas em conjunto de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), onde se encontram também, os casos de Síndrome do Choque da Dengue (SCD).

As críticas de Rosen à concepção bipolar da apresentação clínica, que permite que pacientes sem hemorragia sejam classificados como FHD, enquanto outros casos às vezes com evolução fatal devido a trombocitopenia e hemorragias graves, não o são (70), tiveram inicialmente pouca repercussão na literatura médica, porém, com a ampliação da área de transmissão de dengue, em especial as epidemias nas Américas, acometendo faixas etárias diferentes das originalmente observadas, puseram essas questões novamente em destaque (89-91).

Apresentaremos inicialmente as definições clássicas de Febre da Dengue e Febre Hemorrágica da Dengue e a seguir discutiremos outras definições de formas graves que têm sido utilizadas na literatura.

4.1 Febre da Dengue

Em termos de vigilância epidemiológica é definida como uma febre de curta duração, isto é, até 7 dias, associada a pelo menos dois sinais inespecíficos, como: cefaléia, dor retrorbital, mialgia, artralgia, prostração ou exantema. Além de ter estado nos últimos 15 dias, em área de transmissão de dengue.

Após a picada do *Aedes aegypti*, único transmissor da doença nas Américas, há um período de incubação de 2 a 7 dias, mas que pode se estender por até 15 dias, findo o qual ocorre uma súbita elevação da temperatura, usualmente acompanhada por cefaléia frontal e dor retrorbital. Mialgia generalizada, às vezes de maior intensidade na região lombar, artralgia, hiperemia conjuntival e eritema facial, estão presentes desde o início do quadro. A partir do segundo dia de doença, os sintomas digestivos tornam-se mais evidentes com queixas de anorexia, náuseas e a presença de vômitos. São referidos ainda nesse período, alterações do paladar e um exantema macular de curta duração.

A duração da febre varia de 3 a 7 dias, com duração média de 5. Ao final desta, é freqüente o aparecimento de exantema que se inicia no tronco, disseminando-se posteriormente, podendo acometer região palmar e plantar. O aspecto predominante é morbiliforme, mas por vezes pode ser máculo-papular, ou mesmo escarlatiniforme nas áreas de confluência. O prurido pode estar presente e caracteristicamente predomina em

palma das mãos e planta dos pés, mas pode ter caráter disseminado e ocorrer tanto antecedendo como após o exantema ou ainda se apresentar de forma isolada, sem relação com o rash. É descrito ainda neste período, uma hiperestesia cutânea e um exantema petequial em membros inferiores poupando áreas circunscritas e arredondadas, que Nimmannitya na Tailândia correlaciona aos achados de Sabin (6) em infecções experimentais, em que o local de inoculação intradérmica do vírus é poupado quando da apresentação do rash. É relatada uma elevação da temperatura concomitante ao aparecimento do exantema terminal, configurando uma curva térmica bifásica.

Fenômenos hemorrágicos podem estar presentes durante todo o curso da doença, porém, são mais frequentes no final da febre, coincidindo com a queda das plaquetas que pode ocorrer nessa fase. São em geral de pequena intensidade e predominam os sangramentos de pele e mucosa, como petéquias e epistaxe. A prova do laço é relatada em proporção variável de pacientes tendo sido detectada em 36% dos casos com diagnóstico confirmado atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz, durante a epidemia de Dengue tipo 1 em 1986-1987.

As alterações laboratoriais mais frequentes são leucopenia e neutropenia no início do quadro, evoluindo nos dias subseqüentes com linfocitose. Em reduzida proporção de pacientes, detecta-se plaquetopenia, podendo atingir níveis abaixo de $100.000/\text{mm}^3$. Alteração das enzimas hepáticas também tem sido descrito, inclusive como fator prognóstico para formas graves (92). Com freqüência a aspartato aminotransferase (AST) encontra-se mais elevada que a alanina aminotransferase (ALT), diferente do que ocorre nas hepatites virais.

A inespecificidade das manifestações clínicas levou autores à tentativa de estabelecer novas definições que permitissem distinguir os casos de dengue. Os sinais/sintomas incluídos com maior freqüência nesses modelos são a presença de febre elevada, hemorragias, exantema e ausência de sintomas respiratórios, já os dados laboratoriais mais citados são: leucopenia, trombocitopenia e elevação de transaminases (93) (94) (95). Uma revisão sistemática recente desses estudos (96), critica a falta de validação dos modelos propostos em situações epidemiológicas diferentes das que os geraram; a necessidade de modelos diferenciados de acordo com a faixa etária e a ausência de definição do período da doença em que eles poderiam ser utilizados

4.2 Febre Hemorrágica da Dengue

A doença tem início semelhante à febre do dengue, com temperatura elevada $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ e que em geral não ultrapassa 7 dias de duração, acompanhada de sintomas inespecíficos como cefaléia, dor retrorbital, mialgias, náuseas e vômitos. A partir do 3º dia, coincidindo, com a defervescência da febre, inicia-se uma fase crítica que se manifesta clinicamente por um aumento do fígado, dor abdominal relacionada à efusão de plasma para a cavidade peritoneal, vasodilatação cutânea e maior intensidade dos sintomas digestivos com náuseas e vômitos. Os quadros com maior extravasamento plasmático apresentam sinais de hipovolemia, que no paciente adulto é evidenciado pela hipotensão postural e na criança por um estreitamento da pressão de pulso, devido ao aumento da resistência vascular periférica. Por vezes, há dispnéia secundária à presença de derrame pleural usualmente à direita. Nesta fase a prova do laço está positiva em 45% dos casos, segundo estudo realizado no Vietnã e os sangramentos são mais freqüentes (97). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), define-se o caso como febre hemorrágica da dengue, quando além da febre, presença de hemorragias, ou de pelo menos uma prova do laço positiva, há trombocitopenia $\leq 100.000/\text{mm}^3$ e sinais de extravasamento plasmático demonstrado pela elevação do hematócrito $\geq 20\%$ na fase crítica em relação à convalescença, ou em relação à média da população, de acordo com o sexo e a faixa etária do paciente, ou ainda pela presença de derrames cavitários ou hipoproteinemia (98).

A dor abdominal intensa, freqüente em casos mais graves, tem sido confundida com quadros de abdome agudo, sendo algumas vezes diagnosticada como colecistite aguda, apendicite aguda ou peritonite (99) (100). Estudo ultrassonográfico seriado sugere que o espessamento da parede da vesícula biliar é um achado precoce e freqüente em casos de FHD, podendo antecipar a detecção de líquido em cavidade pleural e na cavidade abdominal (101) (102). A importância do diagnóstico diferencial com quadros de resolução cirúrgica, deve-se ao fato de que condutas invasivas além de desnecessárias, podem acarretar em piora do prognóstico.

A gravidade da doença é classificada pela O.M.S. em 4 graus como pode-se observar no quadro I. Na experiência cubana, em torno de 20% dos pacientes internados, apresentaram síndrome de choque do dengue (febre hemorrágica do dengue graus III e IV). Em estudo de 124 crianças com sinais de insuficiência circulatória (103), observa-se que em 31,5% dos casos, não havia sinais de sangramentos e o quadro

foi atribuído exclusivamente à hipovolemia, secundária ao extravasamento plasmático que caracteriza as formas graves da dengue.

Quadro 1 Classificação da gravidade Dengue Hemorrágico*. (O.M.S, 1997)
Grau I - Febre acompanhada de sintomas inespecíficos, sendo a prova do laço positiva considerada como a única manifestação hemorrágica.
Grau II - Sangramentos espontâneos além das manifestações dos pacientes do grau I
Grau III - Insuficiência circulatória manifestada por pulso rápido e fraco, redução da pressão de pulso ≤ 20 mmHg ou hipotensão, pele pegajosa, extremidades frias e inquietação.
Grau IV - Choque profundo, com pressão arterial e pulso não detectáveis.

* Os graus III e IV compõem a síndrome do choque do dengue

Outras alterações laboratoriais encontradas com frequência na fase crítica, são a hipoalbuminemia, considerada sinal de aumento da permeabilidade capilar e a elevação das aminotransferases hepáticas. O hemograma apresenta elevação do hematócrito, leucopenia e neutropenia na fase febril e linfocitose na defervescência. Prolongamento do tempo parcial de tromboplastina ativada (PTTa) e do tempo de protrombina (PT), além da trombocitopenia, são encontrados em 60% e 30% dos casos respectivamente (104).

Não foi definida uma correlação entre gravidade da doença e ativação dos fatores de coagulação (105). Mesmo em pacientes com SCD, as alterações de PTTa e de PT não correlacionaram-se com sangramento ou gravidade do choque (106). Nesse mesmo estudo, os níveis mais elevados de inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e menores níveis de proteína S, apresentaram correlação com a gravidade do sangramento mas não com o extravasamento de plasma.

A presença de níveis elevados de fator tissular (TF), antígeno do fator de von Willebrand e trombosmodulina solúvel, sugere que a alteração da coagulação é secundária a ativação imune do endotélio e de células fagocíticas mononucleares, que têm capacidade de expressar TF, o que resulta em uma coagulopatia de consumo compensada, que apenas em casos de choque prolongado, pode evoluir para uma síndrome de coagulação intravascular disseminada (CID) (106, 107).

A trombocitopenia pode ocorrer tanto na febre do dengue como na FHD, e seu mecanismo parece ser multifatorial, envolvendo a diminuição de produção por depressão medular (108) e o aumento da destruição por ativação do complemento via anticorpos ou imunocomplexos adsorvidos à membrana plaquetária (109). Porém, na FHD o nível de plaquetas correlaciona-se com a gravidade da doença, isto é, com o

volume do derrame pleural e a presença de instabilidade hemodinâmica (110, 111). É interessante a observação de autores que avaliando a gravidade do sangramento, não encontraram correlação desta com a contagem de plaquetas (106, 110).

A procura de marcadores laboratoriais de gravidade na fase aguda resultou na definição de alguns parâmetros, que, no entanto, ainda não foram objeto de estudos visando incorporá-los ao manejo clínico do paciente. Alterações da AST, creatina-fosfoquinase (CK), têm mostrado correlação com a gravidade da doença (92, 112).

Como já abordado no tópico sobre patogenia, um perfil de citocinas associado à ativação imune, caracteriza as formas graves. São achados freqüentes, no final da fase febril a elevação de IFN- γ e na defervescência, níveis elevados de IL-10, receptores solúveis de IL-2 e TNF- α e níveis elevados das frações C3a e C5a do complemento (113) (114). As alterações podem ser quantitativas, como também, sua duração parece ser mais longa na FHD (58). Publicação recente encontrou níveis elevados de MIF nos casos com evolução fatal (115). A detecção dessas alterações é, no entanto, dispendiosa e sua implantação na rotina de atendimento deverá ser avaliada em função do custo-benefício de cada marcador.

Uma carga viral mais elevada também está associada aos quadros mais graves, o método de reação em cadeia da polimerase em tempo real, abordado com mais detalhes no tópico sobre diagnóstico, tem sido o exame utilizado para sua quantificação, porém além de caro, demanda pessoal qualificado. A disponibilidade de métodos quantitativos de dosagem da proteína NS1, cujos níveis parecem correlacionar-se com a viremia, pode tornar esse parâmetro útil para discriminar os casos graves (116) (117).

4.3 Crítica à classificação da OMS e outros critérios de gravidade adotados em publicações recentes.

Como já mencionado, a crítica à classificação da OMS iniciou-se com o estabelecimento da própria definição de febre hemorrágica do dengue. Com as dificuldades de sua aplicação no continente americano, há o início de um período em que novas definições começaram a ser utilizadas em estudos clínicos (14) (90). O principal alvo das discussões tem sido a síndrome de choque, o estudo realizado por Harris na Nicarágua (14), demonstrou que em 37 casos de choque, apenas 20 (54%) preenchem os critérios estabelecidos. O mesmo grupo tem utilizado parâmetros mais abrangentes, onde a hipotensão, é estabelecida pela medida da pressão arterial, sem a

necessidade da presença dos sinais associados ao choque, como taquicardia, oligúria e alteração sensório-motora e definem como caso grave a presença de quaisquer um dos seguintes critérios: hipotensão arterial, como definido acima, plaquetas $\leq 50.000/\text{mm}^3$ ou hemorragias internas (digestiva, metrorragia ou hematúria) sem especificar a gravidade do sangramento (90). Mesmo grupos tradicionais de pesquisa em dengue na Tailândia, têm reconhecido casos com gravidade fora dos padrões estabelecidos pela OMS. (113)

É importante ressaltar, que os critérios da OMS foram propostos a partir da experiência tailandesa na década de 1960 e não foram validados por estudos prospectivos nem no Sudeste Asiático, nem em outras populações atualmente acometidas por essa arbovirose. Pequenas modificações na definição da doença podem aumentar a sensibilidade do sistema de notificação como foi o caso da SIDA/AIDS após as alterações de 1993, que resultaram em aumento de 204% nas notificações (118). Estudos em dengue estimam que alterações como o estabelecimento de um patamar de 50% no hematócrito, ou reduzir para 10% o critério para definir hemoconcentração, dobraria a identificação de casos de FHD (119) . Por outro lado, a queda da especificidade que resultaria de definições mais abrangentes, pode prejudicar a capacidade de discriminar os casos graves e por conseqüência, os estudos que permitam compreender a patogenia e definir esquemas terapêuticos para esse grupo de maior gravidade.

As manifestações incomuns têm recebido destaque em casuísticas fora do Sudeste Asiático, talvez relacionado à diferença de faixa etária e presença de comorbidades, que caracteriza as formas graves nessas regiões (120). Tem chamado a atenção, as alterações de provas de função hepática (121), que podem raramente evoluir para insuficiência hepática (122), a miocardite (123) e o comprometimento neurológico na fase aguda, que pode se manifestar, como cefaléia, alterações do nível de consciência, convulsões e edema cerebral, às vezes com evolução fatal (124). Complicações pós-infecciosas, também têm sido descritas, como a polirradiculopatia aguda e púrpura trombocitopênica auto-imune (125).

Recentemente pesquisadores tem ressaltado a necessidade de trabalhos prospectivos envolvendo equipes multiprofissionais, envolvendo as áreas de Epidemiologia, Saúde Pública, Medicina Interna e Pesquisa Básica, afim de estabelecer um instrumento de fácil utilização e que permita resolver os problemas de classificação das formas habituais, assim como também abranger os relatos de formas incomuns, com

acometimento do sistema nervoso central, sistema cardiovascular e aparelho digestivo (91).

4.4 Aspectos clínicos da dengue no Brasil

Desde a detecção da reintrodução do *Aedes aegypti* na década de 1970 (126) e a primeira epidemia com isolamento de vírus Dengue 1 e 4, em Boa Vista-RR em 1981 (15), a dengue tem sido uma doença de adultos, com um predomínio de pacientes acima de 15 anos variando de 90% a 77,4%, no período 1998 a 2001, sendo a faixa etária mais acometida nesse período, de 20-40 anos (19). A partir de 2007, tem sido observada uma maior incidência em crianças menores de 15 anos (127), que culminou na epidemia de 2007/08 no Rio de Janeiro, onde 48% (128) das internações ocorreram em menores de 15 anos.

A dificuldade em enquadrar os quadros mais graves, levou o Ministério da Saúde a criar um sub-grupo na classificação, denominado dengue com complicação (129), que inclui pacientes com: alterações, graves do sistema nervoso; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; plaquetopenia igual ou inferior a 50.000/mm³; hemorragia digestiva; derrames cavitários; leucometria global igual ou inferior a 1.000/mm³ e os óbitos.

5. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de infecção por vírus Dengue pode apenas ser feito pelo laboratório. Os métodos disponíveis são: o isolamento viral, a detecção de antígenos virais, a detecção de anticorpos IgM e IgG e os métodos moleculares que podem informar não só o sorotipo, como também quantificar a carga viral infectante.

A neutralização por redução de placas (PRNT), é considerada o teste sorológico mais sensível e específico além de permitir definir o sorotipo infectante na infecção primária, porém, a interpretação dos resultados em infecções secundárias em diante é menos confiável. Por necessitar de duas amostras, fase aguda e convalescência, cultura de vírus e de células, assim como a demora para obter-se os resultados, têm limitado essa técnica a objetivos de pesquisa, não sendo utilizada na rotina diagnóstica.

Outro método muito utilizado até a década de 1980 e considerado até então o teste padrão, é a inibição de hemaglutinação (HI), pois além de permitir diferenciar entre infecção primária e secundária, é de execução mais fácil que a PRNT. Títulos acima de 1:1280, em uma amostra de sangue colhida na fase aguda ou na convalescência,

permitem definir a infecção como secundária, já títulos menores, exigem que se obtenha amostras pareadas, afim de se observar uma elevação de 4x os títulos iniciais, o que permite estabelecer uma infecção como aguda. As dificuldades técnicas, pois é realizada com hemácias de ganso e a falta de especificidade em áreas com circulação de mais de um flavivírus, ou com alta taxa de imunização para flavivírus como o da febre amarela, são fatores limitantes para o seu uso.

O ensaio imunoenzimático é o método mais utilizado atualmente, pois permite o diagnóstico com apenas uma amostra, pela detecção de anticorpos de fase aguda, IgM, a partir do quinto dia de doença, assim como a detecção de IgG em amostras pareadas ou colhidas na convalescença. Deve-se ressaltar, no entanto, que a persistência dos anticorpos IgM por até 3 meses na infecção primária, faz com que o diagnóstico com apenas uma amostra positiva na fase aguda, seja considerado provável e não definitivo. A sensibilidade do teste quando comparada à HI, varia de 90 a 97% (130), porém, na infecção primária como foi o caso na epidemia de 1986/87 no Rio de Janeiro, pode chegar a 99% (131)

Os métodos que permitem um diagnóstico definitivo, assim como a definição do sorotipo infectante são o isolamento viral, realizado em nosso meio em cultura de células de mosquito C6/36, com a posterior identificação do sorotipo por anticorpos monoclonais e a reação em cadeia da polimerase, que no caso de um vírus RNA, tem que ser precedida pela transcrição reversa para a síntese do DNA complementar de uma região do genoma viral consensual aos quatro sorotipos. Nas Américas o protocolo desenvolvido por Lanciotti (132) é o mais utilizado, e sua contribuição pode ser avaliada em estudo no Rio de Janeiro (133), onde 41 em 100 amostras com sorologias pareadas positivas, porém, com isolamento viral negativo, mostraram-se positivas pelo PCR.

Nos casos fatais quando disponível material de necrópsia, técnicas de imunohistoquímica, permitem a confirmação do diagnóstico. Na epidemia por Dengue-3 no Rio de Janeiro, esse método permitiu a confirmação de 48% dos casos examinados, enquanto o PCR confirmou o diagnóstico em 28,8% dos casos com material a fresco, isto é, em solução salina, com a vantagem de poder definir o sorotipo (134).

Outra importante contribuição do PCR é a definição do subtipo (genotipo) viral, que permite traçar a origem do vírus assim como prever sua patogenicidade (34). Existem sondas para os quatro sorotipos e os respectivos subtipos que podem ser separados por eletroforese em gel de acordo com seu peso molecular (135).

Novos protocolos e a técnica de PCR em tempo real têm contribuído para o diagnóstico rápido e quantificação da carga viral, essa como já mencionado, correlaciona-se com a gravidade da doença. Resultados com sensibilidade acima de 92% e especificidade próxima a 100%, quando comparados ao isolamento viral, podem ser obtidos em poucos minutos (34, 136).

Métodos rápidos de imunocromatografia para detecção de anticorpos têm apresentado baixa sensibilidade (137, 138), embora outros autores associando pesquisa de antígeno com anticorpo para NS1, obtiveram sensibilidade acima de 90% (22).

6. Tratamento

A febre do dengue é uma doença de acompanhamento ambulatorial, onde se visa o controle da febre e o estímulo da ingestão hídrica, que como já foi demonstrado, reduz o risco de hospitalização(139). Devem ser evitados os antitérmicos a base de salicilatos, pelo risco de lesão da mucosa gástrica e sua atividade antiagregante plaquetária. O uso de antieméticos é importante para o controle das náuseas e vômitos e no caso de persistência desses, está indicada a hidratação parenteral. O reconhecimento de sinais de agravamento ao final do período febril, é fundamental para alterar o prognóstico e reduzir a letalidade.

As linhas básicas do atendimento aos casos de FHD foram estabelecidas pela OMS em 1975 e publicadas em um guia (140), baseado na identificação dos sinais e sintomas característicos do período de extravasamento plasmático, que ocorre nesses casos ao final do período febril e na manutenção do volume intravascular, obtida pela reposição das perdas de volume intravascular com cristalóides e caso não haja resposta, com soluções de colóides, sendo o dextran o mais utilizado no Sudeste da Ásia. Os parâmetros estabelecidos para reposição foram os sinais vitais e o hematócrito. A letalidade foi reduzida de 14% para menos de 1%. Em avaliação recente, os autores consideram que além das medidas definidas, o reconhecimento precoce dos sinais de choque, foi fundamental para a melhora do prognóstico (141).

Nas Américas, a reduzida proporção de casos graves em relação aos casos de febre da dengue, assim como o reduzido número de leitos para internação hospitalar, tem resultado no predomínio da assistência em unidades de saúde primária, que por permanecerem abertos 8-12h/dia e fecharem nos feriados e fins-de-semana, levam a uma descontinuidade no acompanhamento dos pacientes, que são internados apenas

quando em estágio avançado de gravidade. Para contornar essa situação, a partir da experiência cubana de 1981, foi desenvolvido o conceito do que passou a chamar-se de “sinais de alerta” (ver quadro II), cuja presença mesmo na ausência de sinais de choque, seria indicação de tratamento diferenciado e sempre que possível, de internação (142).

Quadro 2

.Sinais de Alerta (142)	
•	Dor abdominal intensa
•	Vômitos persistentes
•	Inquietação
•	Sonolência
•	Prostração
•	Palidez intensa
•	Derrames cavitários

Esses sinais de alerta até o momento não foram objeto de estudo que visasse validá-los na assistência aos pacientes com dengue, apesar disso, têm sido incorporados de forma variada, isto é, sinais, sintomas e dados laboratoriais, foram acrescentados ou retirados em manuais de tratamento no Brasil e nos manuais de organismos internacionais (129, 143). Outro aspecto interessante, é que não está definido o público alvo, se o paciente/familiares, afim de que busquem atendimento rápido, ou para os profissionais de saúde menos qualificados, com o objetivo de triagem dos casos mais graves. O que se observa é que de acordo com a lista desses sinais, apenas um profissional médico pode detectá-los, como é o caso de derrames cavitários, sugerido pelos pesquisadores cubanos acima citados, ou hipotensão arterial, hipotensão postural, pressão arterial convergente, aumento repentino do hematócrito e hepatomegalia dolorosa, listados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2005).

Estudos de prevalência em casos fatais, revelam que o sinal mais freqüente é a dor abdominal, cuja observação varia de 26% em Porto Rico (144) a 35,7%, no Rio de Janeiro (120), outros sinais com menor freqüência em ambos estudos foram vômitos persistentes, 13 e 21,4% e agitação/sonolência 17 e 19%, respectivamente. O reconhecimento de sinais de agravamento no contexto de uma epidemia, é um instrumento valioso para redução da letalidade, porém, a ausência de definições importantes como a sensibilidade, especificidade, intervalo de tempo ótimo para início

do tratamento após seu reconhecimento, assim como a falta de padronização dos sinais, sintomas e dados laboratoriais a serem utilizados, dificulta a sua utilização na rotina da atenção ao paciente.

A recente discussão sobre a indicação de soluções cristalóides ou colóides para a fase de ressuscitação com líquidos de pacientes em choque (145), levou ao questionamento sobre o melhor esquema para a reposição inicial de pacientes com SCD. Trabalho realizado no Vietnã(146), com reduzido número de pacientes, comparando inicialmente duas soluções colóides, dextran e gelatina, com duas soluções de cristalóides, sugeriu que a utilização de colóides poderia ser benéfica. No entanto, o mesmo grupo realizou posteriormente um ensaio clínico envolvendo 383 crianças com SCD (147), comparando dextran ou hidroxietilamido com solução de Ringer lactato e não detectou vantagem no uso inicial de colóides para expansão plasmática. O acompanhamento do extravasamento de plasma com medidas seriadas do hematócrito, permitiu observar nesse estudo, que o efeito osmótico das soluções de dextran e hidroxietilamido, tem curta duração, e após 2 a 6 horas há um rebote, com nova elevação do hematócrito. Essa observação, levou os autores a questionar a utilização dessas soluções em casos com resposta inadequada após a expansão com cristalóides, como recomendado nos manuais oficiais de tratamento, dado que por serem obtidos de proteínas animais, como é o caso do dextran e das gelatinas, há o risco de reações anafiláticas (147). É sabido também, que essas substâncias têm atividade antiagregante plaquetária e podem alterar o tempo tromboplastina por alteração no fator VIII (148), o que pode resultar em agravamento das alterações de coagulação presentes nas formas graves. No entanto, no estudo citado realizado no Vietnã, foram observadas reações febris com o uso de colóides, mas os testes de coagulação e as hemorragias detectadas, não apresentaram piora.

A observação de casos com resposta inadequada à infusão de líquidos e com sinais de sobrecarga hídrica, foi sugestivo de alterações do sistema cardiovascular. Estudos iniciais (149, 150), utilizando eletrocardiograma, ecocardiograma e ventriculografia por radioisótopo, realizados na fase de defervescência, verificaram respectivamente, alterações de repolarização, redução de fração de ejeção e hipocinesia global, que revertiam ao normal na convalescência. Foram, no entanto, pouco conclusivos, pois não correlacionaram as alterações encontradas com a gravidade da doença. Desde então, a caracterização de um componente cardiovascular na Síndrome de Choque da Dengue, tem sido mais estudada, e publicação recente composta por 91 pacientes, demonstra

uma correlação entre gravidade e alteração da função cardíaca avaliada pelo ecocardiograma (151). Portanto, no ambiente hospitalar, casos com sinais de sobrecarga hídrica, e/ou instabilidade hemodinâmica apesar de uma reposição adequada de fluidos, devem ser investigados para possível disfunção miocárdica.

7. Prevenção

A reintrodução do *Aedes aegypti* na década de 1970 trouxe consigo o diagnóstico da falência do modelo centrado no combate químico, sem participação da comunidade e sem integração intersetorial. Após a disseminação pelo território nacional dos vírus DENV-1 e DENV-2, foi instituído em 1996, o Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa). O resultado do PEAa foi praticamente nulo, uma vez que, em 2001, com a introdução no Rio de Janeiro do DENV-3 houve uma rápida disseminação desse sorotipo causando um dos maiores surtos epidêmicos, comprovando a falência dessa abordagem.

Ainda em 2001 foi realizado um seminário internacional, convocado pela Organização Panamericana da Saúde, para avaliar as ações de combate ao vetor, que resultou no atual “Plano Nacional de Controle da Dengue” (PNCD) (152) de 2002, cujas metas seriam: a) reduzir a menos de 1% a infestação predial em todos os municípios; b) reduzir a menos de 50% o número de casos de dengue de 2003 em relação a 2002 e nos anos seguintes 25% cada ano e c) reduzir a letalidade por FHD a menos de 1%.

Como se pode observar, pela recente epidemia no Rio de Janeiro em 2008, e pelos dados do Ministério da Saúde (153), nenhuma das metas foi alcançada, portanto, acreditamos que o combate ao vetor apesar de ser o único método conhecido de prevenção da dengue, não tem se mostrado ainda exequível no Brasil.

7.1 Vacina

Desde os trabalhos de Sabin na década de 1950 (6), tentativas de atenuação dos vírus Dengue para a elaboração de uma vacina têm esbarrado na incapacidade de produção de um imunógeno tetravalente. A hipótese de facilitação imune (74), tornou essa questão ainda mais crítica. Grupos trabalhando em formulações com vírus atenuado, vacinas quiméricas vivas e de DNA infectante estão em estágios variados de desenvolvimento, porém, sem uma perspectiva de uma vacina eficaz, pouco

reatogênica, segura e barata, cuja utilização possa se prever a curto ou médio prazo. O aporte recente de recursos através do “Pediatric Dengue Initiative”, promovido pela Fundação Bill e Melinda Gates, é uma esperança de melhores resultados no desenvolvimento desse muito necessitado imunobiológico (154).

Justificativa

O Estado do Rio de Janeiro se tornou um dos principais centros de estudo da dengue no Brasil, a partir da identificação do vírus Dengue tipo 1 em março 1986, pelo Laboratório de Flavivírus-IOC, como agente da epidemia de doença febril em Nova Iguaçu, que nos meses subseqüentes, se espalhou para toda área metropolitana do Rio de Janeiro. O então Hospital Evandro Chagas do Instituto Oswaldo Cruz implantou um ambulatório para o atendimento desses casos em maio de 1986. Essa atividade de assistência aos pacientes com sintomas de dengue prossegue desde então, de forma ininterrupta até os dias atuais. Prestamos assistência aos pacientes durante as epidemias de 1990/1991, quando houve a introdução de DENV-2 e de 2001-2002 na introdução de DENV-3. Essa atividade ininterrupta teve como um dos objetivos, a função de ambulatório sentinela para detecção da circulação de vírus Dengue em nosso Estado.

Por outro lado, nesse período pudemos acompanhar a modificação do quadro clínico e laboratorial, nos sucessivos períodos epidêmicos, o que nos conduziu a estabelecer um banco de dados, onde pudéssemos analisar as diferentes manifestações da doença.

A colaboração com o Laboratório de Imunologia Viral do IOC, nos forneceu estrutura que permitiu estudar mecanismos imunes e imunopatogênicos da dengue em unidades fora do *campus* da FIOCRUZ

Por último, a colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Patogenia Viral do IPEC, na pessoa da Dra Maria José de Andrada-Serpa, nos permitiu utilizar a soroteca estabelecida a partir de 2001, para estudos da patogenia da dengue.

Objetivos

- Identificação e caracterização molecular dos agentes virais associados às epidemias de doenças febris agudas, em colaboração com o Laboratório de Flavivírus-IOC.
- Descrever as manifestações clínicas e laboratoriais, associadas à circulação dos múltiplos agentes virais em nosso Estado.
- Contribuir para o estudo dos mecanismos imunes e patogênicos associados aos diferentes agentes virais, em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Patogenia Viral-IPEC e do Laboratório de Imunologia Viral-IOC.

1) Primeiro artigo

Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil.



Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil

T.S. De Simone^{a,*}, R.M.R. Nogueira^a, E.S.M. Araújo^a, F.R. Guimarães^a, F.B. Santos^a, H.G. Schatzmayr^a, R.V. Souza^b, G. Teixeira Filho^c, M.P. Miagostovich^a

^a *Laboratory of Flavivirus, Department of Virology, Oswaldo Cruz Institute, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

^b *Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

^c *Health Secretary of the State of Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

Received 29 April 2003; received in revised form 23 September 2003; accepted 23 September 2003

KEYWORDS

Dengue virus;
DENV-3;
Reverse transcriptase
PCR;
Restriction site-specific
PCR;
Brazil

Summary This study presents the results obtained in the monitoring of dengue virus (DENV) transmission in the Greater Metropolitan Region of the State of Rio de Janeiro, in the period 2000–2001. A total of 5324 serum samples from suspected cases of dengue were analysed in order to confirm dengue infection. The introduction of DENV-3 to the region in December 2000 resulted in the co-circulation of three serotypes: DENV-1, DENV-2 and DENV-3. In this study, virus isolation and/or reverse transcriptase PCR (RT–PCR) confirmed 52.3% (42/79) of DENV-3 cases, showing the importance of acute serum samples in the virological surveillance of the disease. Despite the introduction of a new serotype, an outbreak due to DENV-1 was observed in the municipality of Niteroi. The restriction site-specific PCR (RSS–PCR) patterns obtained for DENV-1 and DENV-2 isolated in that period showed that those strains belonged to the subtypes previously circulating in the state. DENV-3 RSS–PCR patterns confirmed that these viruses belonged to subtype C (Sri Lanka/India strains), represented by the strain circulating on the American continent. These data showed the importance of an active surveillance programme in countries where dengue is endemic.

© 2004 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During the past two decades, the incidence of dengue infection has increased considerably in

endemic areas, particularly in the American region, where dengue viruses (DENV) have shown a hyperendemic feature, as a result of the circulation of multiple serotypes in many countries of the continent (Gubler, 1998).

In Brazil, the introduction of DENV-1 and DENV-2 in 1986 and 1990, respectively, both through the State of Rio de Janeiro, resulted in several

*Corresponding author. Fax: +55-21-2598-4373.
E-mail address: tsimone@ioc.fiocruz.br (T.S. De Simone).

epidemics occurring almost all over the country (Figueiredo, 2000; Miagostovich et al., 1993; Nogueira et al., 1990, 1999; Schatzmayr et al., 1986). Since the introduction of DENV more than 2.7 million dengue cases and nearly 2090 dengue haemorrhagic/dengue shock syndrome cases (DHF/DSS) were reported in the country, until the seventeenth epidemiological week of 2002 (Da Silva et al., 2002).

The dramatic increase of dengue infections in Brazil has led to the establishment of a National Dengue Diagnosis Network (Schatzmayr et al., 1996) to monitor dengue transmission and the geographical distribution and movement of all virus serotypes, since virological surveillance has been accepted as one of the most important tools in providing an early warning to prevent major dengue epidemics.

The Laboratory of Flavivirus, as a Regional Reference Center for Dengue Diagnosis, maintains a surveillance programme in the State of Rio de Janeiro, since this state is an important location for the introduction of DENV and its dissemination over the country. The system involves virological and serological surveillance with the main aim of detecting the introduction of new virus serotypes, and possibly new viral genotypes, in order to reduce DENV transmission and advise health authorities on improving vector control measures.

This report presents the laboratory investigation performed in 5324 suspected dengue cases from the epidemic which occurred during the period 2000–2001 in the Greater Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brazil.

2. Material and methods

2.1. Study site

The State of Rio de Janeiro with 14 391 282 inhabitants covers an area of 43 696 054 km² on the coast of the southeast region of the country. The majority of the population, 11 094 994 inhabitants, lives in the Greater Metropolitan Region of the state which includes the capital, Rio de Janeiro, the largest city in the State with 5 937 253 inhabitants and 17 other municipalities (IBGE, *Censo Demográfico*, 2000). The city of Rio de Janeiro is a very important tourist city, with a major human contingent circulating through its international airport. The average temperature ranges from 23 to 25 °C, reaching peaks of 42 °C during the summer, and the average annual rainfall is 1000 mm.

The current study was conducted in the Greater Metropolitan Region, which has contributed the

highest percentage of dengue cases reported in the state and which has been the port of entry for DENV into Brazil.

2.2. Samples

Serum samples were obtained from 5324 suspected dengue cases during the period 2000–2001 from different health care units and hospitals. Specimens were sent to the Department of Virology, Laboratory of Flavivirus, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, together with clinical and epidemiological data.

A total of 597 convalescent serum samples was obtained from 2 to 4 weeks after onset of disease, but in some cases was taken after a longer interval. Aliquots of acute serum samples were stored at –70 °C for virus isolation and –20 °C for serological diagnosis until use.

Ethical clearance was obtained from the Ethical Committee in Research from the Oswaldo Cruz Institute, Ministry of Health, Brazil, being approved by the resolution number CNS196/96 on 21 October 2002.

2.3. Dengue diagnosis

The routine laboratory diagnosis of dengue was performed using virological and serological methods, depending on the date of onset of disease and the collection of specimens. Acute serum samples, collected until the seventh day after the onset of the disease, were processed for virus isolation and for reverse transcriptase PCR (RT–PCR). For RT–PCR the specimens were selected according to the presence of any information that suggested a more severe disease such as thrombocytopenia, abdominal pain, tourniquet positive test, hypotension, or haemorrhagic manifestations and/or by the geographical origin of the patient. Only sera from areas without previously notified dengue cases were tested by RT–PCR. The immunoglobulin M (IgM) antibody capture ELISA (MAC–ELISA) was carried out in serum samples collected after the third day of the onset of disease and in all cases when paired sera were available.

Dengue infection was confirmed by virus isolation and/or RNA viral detection by RT–PCR and by IgM seroconversion. Individuals whose anti-dengue IgM tested positive in a single serum sample were also considered to be dengue cases, since all patients presented signs and symptoms of dengue infection according to WHO criteria (WHO, 1997).

2.4. Virus isolation

A total of 3262 serum samples was used for virus isolation by inoculation into monolayers of C6/36 *Aedes albopictus* cell line (Igarashi, 1978). Dengue virus isolates were identified by indirect fluorescent antibody test (IFAT) using serotype-specific monoclonal antibodies as previously described by Gubler et al. (1984). The monoclonal antibodies were kindly provided by Dr D. Gubler (CDC, Colorado, USA).

2.5. Reverse transcriptase PCR

RT-PCR for detecting and typing DENV was performed as described by Lanciotti et al. (1992) in 550 acute serum samples.

2.6. Restriction site-specific PCR (RSS-PCR)

Molecular subtyping of 99 DENV strains was performed using RSS-PCR according to Harris et al. (1999) and Miagostovich et al. (2000).

2.7. Serological methods and antigens

2.7.1. IgM antibody capture ELISA

The MAC-ELISA (Kuno et al., 1987) was carried out in 3631 suspected dengue cases. DENV-1 (Hawaii strain), DENV-2 (New Guinea strain) and DENV-3 (H-87) antigens used in the serological tests were prepared from infected suckling mouse brains by using the sucrose acetone extraction method (Clarke and Casals, 1958). The Evandro Chagas Institute, Belém, Pará, Brazil kindly provided DENV-3 antigen.

2.7.2. Immunoglobulin G (IgG) antibody detection ELISA (IgG-ELISA)

The IgG-ELISA previously described by Miagostovich et al. (1999) was performed for the characterization of dengue immune response as primary or secondary infection in DENV-3 cases previously confirmed by virus isolation and/or RT-PCR.

3. Results

3.1. Epidemiological findings

The number of cases reported in the State of Rio de Janeiro showed a low DENV activity in 2000 with a total of 4281 notified cases (SES/RJ, 2002) characterizing an interepidemic period. In the following year, a total of 69 269 cases was reported with 82.9% occurring in the Greater Metropolitan Region. Rio de Janeiro (24 329), Niterói (12 557) and Nova

Iguaçu (5491) were the most affected municipalities in the region. In the municipalities of Rio de Janeiro and Nova Iguaçu co-circulation of three serotypes was observed, while in Niterói an outbreak due to DENV-1 was responsible for the majority of cases, although DENV-2 activity was also reported.

3.2. Laboratory findings

Dengue infection was confirmed in 35.3% (1882/5324) of cases by the combined results obtained by virus isolation, RT-PCR and MAC-ELISA. The MAC-ELISA confirmed 1350 of 3631 (37.2%) cases in which 380 were paired sera. Dengue virus isolation was obtained in 15.6% (508/3262) of the acute serum samples inoculated onto C6/36 cells and RT-PCR performed in 550 acute sera detected 114 DENV infections (Table 1). From those 114 cases positive by RT-PCR, 69 (60.5%) were positive only by this methodology. Overall, the infecting serotype was identified by RT-PCR and/or virus isolation in 606 cases; 380 were DENV-1 (62.7%), 147 DENV-2 (24.3%) and 79 DENV-3 (13%).

The comparative analysis of the 388 acute sera tested by virus isolation and RT-PCR showed that seven cases (1.8%) were confirmed only by virus isolation, 48 (12.4%) only by RT-PCR, and 43 (12.4%) were positive, by both methodologies.

The monthly distribution of reported dengue cases in Rio de Janeiro, the laboratory investigated cases and virus isolation during 2000 and 2001 is shown in Figure 1. DENV-3 was first isolated in December of 2000 in the municipality of Nova Iguaçu, during a period of co-circulation of DENV-1

Table 1 Dengue diagnosis using virus isolation, reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and immunoglobulin M antibody capture ELISA (MAC-ELISA) in 5324 suspected cases

Virus identification	MAC-ELISA			Total
	Negative	Positive	Not done	
Isolation				
Negative	967	436	1351	2754
Positive	121	45	342	508
Not done	1193	869		2062
Total	2281	1350	1693	5324
RT-PCR				
Negative	235	106	95	436
Positive	55	24	35	114
Not done	1991	1220	1536	4747
Total	2281	1350	1693	5324

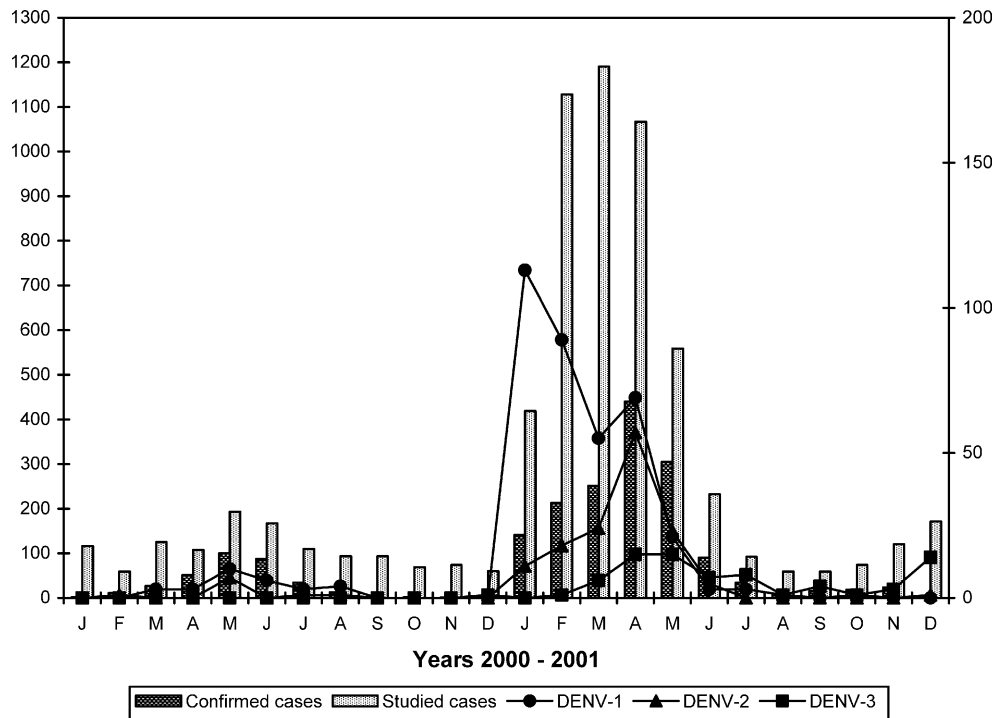


Figure 1 Distribution of studied dengue cases and dengue virus isolation by month, State of Rio de Janeiro, 2000–01.

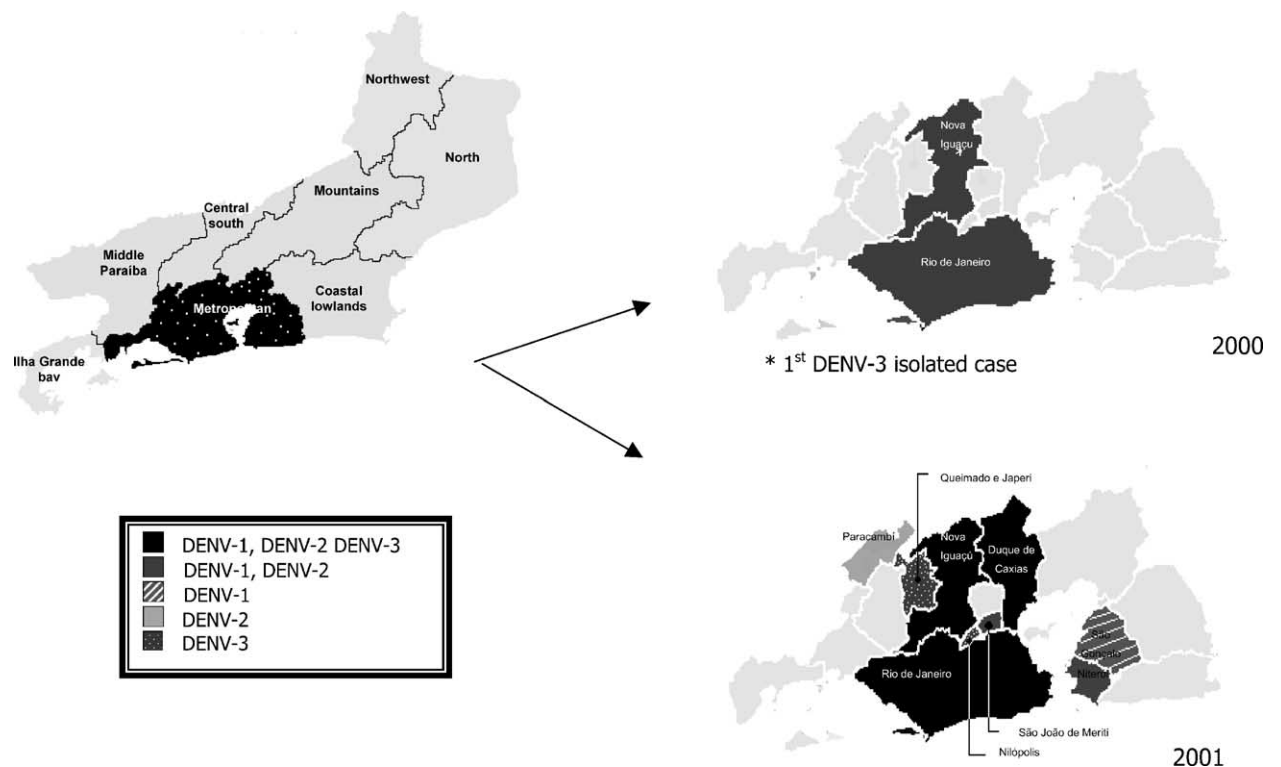


Figure 2 Dengue virus isolations and spread in the State of Rio de Janeiro, 2000–01.

and DENV-2. Despite intensified virological surveillance, the second DENV-3 case was not isolated until two months after the first in the municipality of Rio de Janeiro and resulted in the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 from March to June 2001. The high number of DENV-1 isolated from November 2000 to March 2001 was mainly due to an outbreak that occurred in the municipality of Niterói. Figure 2 shows DENV distribution in the State and the DENV-3 spread into the Greater Metropolitan Region during 2001.

The distribution of laboratory-investigated suspected dengue cases in the different municipalities showed that the counties most affected by DENV activity were Rio de Janeiro, Niterói, Nova Iguaçu and Mesquita (Table 2). Concomitant with the increased number of dengue cases observed in 2001, three deaths were confirmed in the municipality of Rio de Janeiro in April and May of 2001. All three fatal cases were confirmed by MAC–ELISA, one of them was identified as DENV-2 infection.

Statistical analysis (SPSS for Windows version 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) of the mean ages (years) of DENV-1 (30.9 ± 15.9), DENV-2 (34.3 ± 15.0) and, DENV-3 (30.9 ± 14.6) cases showed that there was no significant difference ($P = 0.108$; $F = 2.240$) between means. However, considering gender distribution, the mean age of female and male was 33.7 ± 16.0 and 30.2 ± 14.8 , respectively and the difference between these two means was statistically significant ($P = 0.019$; $t = -2.35$). The mean age of DENV patients according to gender and infecting serotype confirmed by virus isolation and/or RT–PCR are shown in Figure 3. Among the DENV-1 and DENV-2 patients, there was no significant dif-

ference between gender ($t = -1.57$, $P = 0.118$; $t = -0.337$, $P = 0.737$, respectively) while DENV-3 infection was significantly higher in young men ($t = -3.254$, $P = 0.002$).

The clinical evaluation of those cases divided according to the infecting serotype showed that 11.0% of DENV-1 (42/380), 17.7% of DENV-2 and 29.1% (23/79) of DENV-3 patients ($\chi^2 = 17.91$, $P = 0.0001$) presented at least one clinical or laboratory finding suggestive of more severe disease as haemorrhage, hypotension, abdominal pain and thrombocytopenia.

3.3. IgG and IgM antibody response to DENV-3

Dengue immune response was evaluated in 79 DENV-3 cases, where the infecting serotype was previously identified by virus isolation and/or RT–PCR. By using IgG–ELISA, the infection in 47 patients (59.5%) was characterized as being primary and in 29 (36.7%) as secondary. In three cases where the patient's data in relation to onset of disease were not available, the results were inconclusive.

IgM anti-dengue response was detected in 37 cases. Specific IgM response for DENV-3 antigen was observed in 17 (46%) of them, seven were primary and 10 were secondary infection.

3.4. Restriction site-specific PCR

In order to characterize the DENV strains, 33 DENV-1, 20 DENV-2 and 46 DENV-3 isolates were analysed by RSS–PCR. The results obtained from this analysis showed that DENV-1 belongs to subtype

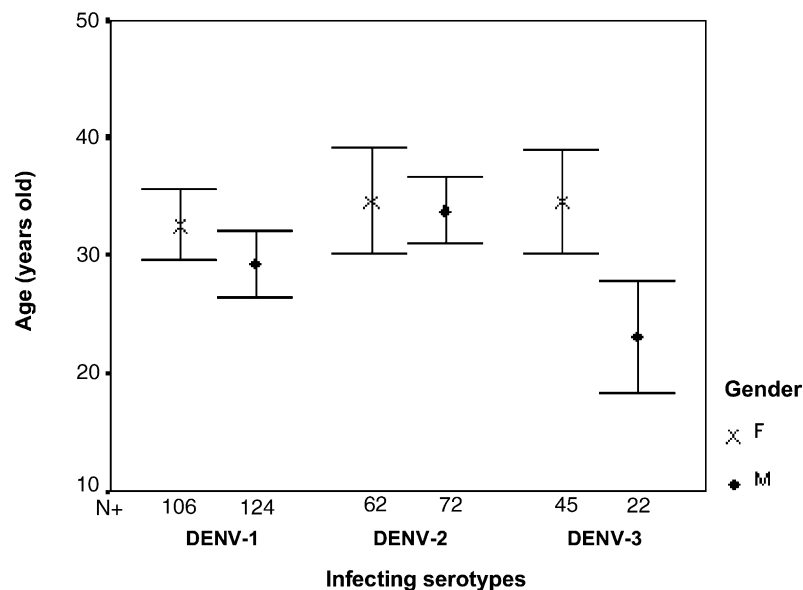


Figure 3 Mean age of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 patients according to gender, Rio de Janeiro, 2000–2001.

Table 2 Confirmed dengue cases by virus isolation, reverse transcriptase PCR (RT–PCR) and immunoglobulin M antibody capture ELISA (MAC–ELISA) during 2000–2001, according to its distribution by county in the Greater Metropolitan Region of the State of Rio de Janeiro, Brazil

Municipalities	Virus isolation		RT–PCR		MAC–ELISA	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001
Belford Roxo	0/4	5/42	–	2/9	0/4	21/63
Duque de Caxias	0/3	7/28	–	4/11	2/8	32/63
Mesquita	0/9	65/325	0/2	3/27	0/9	131/437
Niterói	0/5	172/374	–	10/33	50/226	302/639
Nova Iguaçu	9/453	128/1009	7/63	31/113	78/537	292/1440
Rio de Janeiro	19/207	95/714	6/43	43/214	190/369	663/809
Others ^a	0/19	8/70	1/11	7/24	10/39	46/157
Total	28/700 (4%)	480/2562 (19%)	14/119 (11.8%)	100/431 (23.9%)	330/1258 (26.2%)	1487/3608 (41.2%)
	21 DENV-1;6 DENV-2; 1DENV-3	326 DENV-1;112 DENV-2; 42 DENV-3	8 DENV-1; 5 DENV-2; 1 DENV-3	41DENV-1; 26 DENV-2; 33 DENV-3		

^a Data from the municipalities of Itaboraí, Itaguaí, Magé, Maricá, Nilópolis, Paracambí, São Gonçalo, São João de Meriti and Seropédica.

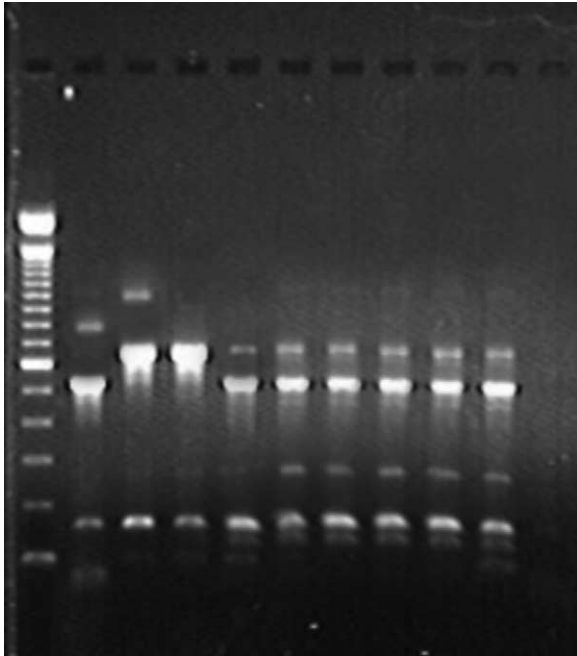


Figure 4 Agarose gel electrophoresis of restriction site-specific PCR DENV-3 products. Lane 1: 100-bp ladder molecular weight (Gibco BRL); lane 2: A1 pattern: Indonesia 1978, strain 439; lane 3: B1 pattern: Thailand 1984, strain 931; lane 4: B2 pattern: Thailand 1980, strain 500; lane 5: C pattern: Sri Lanka 1985, strain 383; Brazilian samples: lane 6: strain 69490; lane 7: strain 74033; lane 8: strain 74101; lane 9: strain 74510; lane 10: strain 74720; lane 11: negative control (water).

C, which is represented by strains circulating in the American continent. DENV-2 isolates presented a consistent pattern, although they did not match with any DENV-2 pattern previously described by the method. The DENV-3 strains belong to subtype C, which includes strains circulating in Sri Lanka/India, Nicaragua and some countries of Central America. **Figure 4** shows the results obtained by the RSS-PCR method used to subtype DENV-3 isolates circulating in the State of Rio de Janeiro in 2001.

4. Discussion

The reintroduction of DENV-3 into Nicaragua and Panama (CDC, 1995) in 1994, after an absence of 17 years and a rapid spread to all Central American countries (Rigau-Pérez et al., 2002), warned of the possibility of a new outbreak in Brazil, since the introduction of a new serotype has often been associated with the occurrence of major epidemics (Focks et al., 1995). In 1998 the isolation of DENV-3 in Limeira, São Paulo, from the serum of a man who had travelled to Nicaragua was reported (Rocco et al., 2001). However, that was an imported case

and did not result in transmission. The DENV-3 isolated in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro, in December 2000, was the first autochthonous case isolated in the country and was previously reported by Nogueira et al. (2001). Furthermore, the newly introduced serotype once again confirmed the State of Rio de Janeiro as an important epidemiological site for the introduction of DENV, as previously observed for DENV-1 and DENV-2 (Nogueira et al., 1990, 1999; Schatzmayr et al., 1986).

Nova Iguaçu is a low-income suburban city located 25 km from downtown Rio de Janeiro and it has a large population contingent that commutes daily to the surrounding areas. This facilitated the rapid spread to susceptible populations in Rio de Janeiro and other neighbouring cities in 1986, when DENV-1 was first isolated in that county (Miagostovich et al., 1993; Schatzmayr et al., 1986). During an entomological surveillance programme performed in Nova Iguaçu during 2001, due to the high DENV activity in that area, DENV-3 was recovered from the vector *Aedes aegypti* in a field investigation (Lourenço de Oliveira et al., 2002), showing that the geographical location of the virus-infected mosquitoes correlated with the residence of the first DENV-3 case. Entomological surveillance to monitor the infection in mosquitoes has been shown to be effective in predicting the risk of dengue transmission in a particular area, mainly when one serotype is isolated during the co-circulation of other serotypes (Bangs et al., 2001; Ibanez-Bernal et al., 1997; Kow et al., 2001). Furthermore, our findings showed that the first DENV-3 human case occurred when the municipality was presenting DENV-1 and DENV-2 activity.

The susceptibility to DENV-3 infection suggested a high risk for occurrence of a dengue epidemic in subsequent months. However, the introduction of the new serotype resulted in a co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in 2001 and the most significant epidemiological finding in the Greater Metropolitan Region was high DENV-1 activity in the municipality of Niterói and the occurrence of three deaths, one of them due to DENV-2 infection. In fact, that municipality presented the highest dengue incidence in the state that year (2755 cases/100 000 inhabitants; SES/RJ, 2002). The first fatal case that occurred in 2001, after DENV-3 introduction, was actually caused by DENV-2. The patient presented a secondary DHF/DSS infection that resulted in death four days after the onset of disease. Although there were no deaths due to DENV-3 in 2001, clinical and laboratory findings suggestive of severe disease was statistically significantly higher in DENV-3 cases. All serotypes produced a

higher incidence of infection in young adults but interestingly DENV-3 infected more young males, compared with females. These differences may be explained by the study sample.

An increased number of severe dengue cases associated with DENV-1 and DENV-2 was observed in Mexico in 1995 after the introduction of DENV-3 (Briseño et al., 1996; Figueroa and Ramos, 2000) and in Puerto Rico the reappearance of DENV-3 also resulted in a co-circulation of all serotypes but did not produce changes in endemic incidence of the disease (Rigau-Pérez et al., 2002).

Our laboratory findings reflected the increased number of reported cases that occurred in the state during 2001. An increase in DENV activity was characterized by virus detection in regions other than the Greater Metropolitan Region (data not shown), by the number of counties where the viruses were isolated and also by an increase in confirmed cases by different methods. The MAC-ELISA was once again of great importance in detecting an increased number of confirmed cases during epidemic periods as previously described (Nogueira et al., 1993). However, in this study methods for identifying DENV (virus isolation and RT-PCR) confirmed 52.3% (42/79) of DENV-3 cases, showing the importance of acute serum samples in the virological surveillance of the disease. In that period, RT-PCR played a definitive role in the surveillance system as a rapid diagnostic method and guided the implementation of immediate control measures, as the local authorities were notified of every new confirmed DENV-3 case. The superior performance obtained by RT-PCR compared with virus isolation has been previously described (De Paula and Fonseca, 2002; Miagostovich et al., 1997).

Despite intensified virological surveillance, it took about three months between the first and the second DENV-3 isolation, which occurred in the South Zone of the municipality of Rio de Janeiro. Historically, that area has been the least affected region in the municipality during epidemics. Despite the preventive measures, the virus spread to new locations and in March 2001, DENV-1, DENV-2 and DENV-3 transmission became obvious in the Greater Metropolitan Region. The difficulty in disrupting transmission is consistent with a high level of viraemia and it has been previously observed in DENV-3 epidemics (Hanna et al., 2001; Vaughn et al., 2000).

As previously observed (Nogueira et al., 1993, 1999), Rio de Janeiro, Niteroi and Nova Iguaçu are still the most affected areas in the Greater Metropolitan Region, mainly due to the high demographic density. The recurrence of DENV

transmission in exactly the same municipalities reflects favourable conditions for transmission of this virus and could help investigators to understand the cyclical incidence of the disease, to identify risk factors for infection and to motivate community participation in mosquito control.

The high percentage (59.5%) of DENV-3 isolation from primary infection could be explained by the prolonged duration of viraemia in those cases compared with those experiencing secondary infections (Vaughn et al., 2000). The analysis of 31 cases of DENV-1 and DENV-2 by IgG-ELISA titres (all of them with paired serum samples) showed that 82.4% (14/17) and 35.7% (5/14) respectively, had primary infections (data not shown). The DENV-2 antibody-dependent enhancement (ADE) could explain the fact that 64% (9/14) has been isolated from patients having secondary infections. Those findings were previously observed (Nogueira et al., 1993) and recently, the ADE observed in DENV-2 infections was confirmed in patients for the first time (Vaughn et al., 2000).

The IgM response is broadly reactive among DENV serotypes, although specific response in both primary and secondary infections was previously described (Gubler and Sather, 1988). Here, we observed 46% of IgM monotypic response detected in both DENV-3 primary and secondary infections. In 1986–1987, during a DENV-1 virgin soil epidemic in Rio de Janeiro, a monotypic response was observed in 50% of the cases (Nogueira et al., 1988). Although MAC-ELISA cannot be used to identify the infecting virus serotype, the immediate addition of the new antigen to the test as soon as the circulation of a new serotype is detected, has been the standard procedure to avoid false negative results in specific cases where a monotypic response is elicited.

An important benefit of virus isolation is that low passage viruses are available for molecular characterization of those isolates. The subtyping analysis of DENV-1 showed that those isolates presented the same pattern of those strains previously circulating into the country, subtype C/Caribbean genotype (Miagostovich et al., 2000). For DENV-2 we could confirm that R5S-PCR products had a consistent and reproducible pattern as described for Brazilian strains (Miagostovich et al., 2003). It was previously shown that DENV-2 R5S-PCR patterns obtained did not match the R5S-PCR patterns described by Harris et al. (1999). However, by E/NS1 junction sequencing it was demonstrated that those strains belong to DENV-2 Southeast Asian-like genotype. The genetic diversity could be explained as a result of an ongoing evolution of DENV and the results

obtained suggested this genotype is the only one circulating in the State.

We further analysed the DENV-3 isolated during the epidemic and once again confirmed the Sri Lanka/India (genotype III) as the subtype circulating (Miagostovich et al., 2002). This data suggested the probable Central American origin of our strain after its introduction in 1994 and dispersion in the American Continent (CDC, 1995). This genetic variant has been associated with major DHF/DSS epidemics in Sri Lanka and India and deaths in Mexico and Central American countries. Even though the observations of severe disease were more frequently observed in DENV-3 cases, we are unable to characterize those cases as DHF/DSS since no laboratory data were available.

The DENV-3 epidemic initiated in the summer of the following year (2002) was characterized as the most severe dengue epidemic to occur in the State of Rio de Janeiro (Nogueira et al., unpublished data). The large number of people susceptible to DENV-3 together with the high mosquito vector density was crucial for the establishment of a dengue epidemic when more than 220 000 cases were notified from January to May 2002 (SES/RJ, 2002). The favourable conditions for dengue transmission in Brazil allowed the rapid spread of this new serotype to 14 of 27 Brazilian Federal Units (Da Silva et al., 2002). The hyperendemicity, due to the DENV-1, DENV-2 and DENV-3 circulation, now observed in the country, has been shown to be an important risk factor for developing DHF/DSS aggravated by the virulent circulating genotypes, DENV-2 Southeast Asian-like and DENV-3 Sri Lanka/India.

Repeated warnings about the risk of the introduction of DENV to Brazil emphasize the importance of active surveillance programmes for early detection of the probable introduction of DENV-4, as soon as its high activity in bordering countries has been observed. In addition, our results emphasize the importance of the active virological surveillance that was able to detect the early stage of DENV-3 transmission and stress the Greater Metropolitan Region of the State as an important area for dengue epidemiology. While an effective vaccine is still not available, sustainable mosquito control involving the community and laboratory-based epidemiological surveillance are the best strategies to prevent dengue epidemics and to reduce the social and economic impact of DHF/DSS.

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors are grateful to José da Costa Farias Filho, José de Carvalho Filho, Luís Henrique Araújo de Miranda, Jaqueline Bastos Santos for technical assistance; Evandro Chagas Institute, Belém, PA for providing DENV-3 antigen; Dr Luis Antônio B. Camacho for statistical analysis; and to the Municipal Health Secretaries of the State of Rio de Janeiro, especially to Dr Maria Aparecida S. Pereira (Nova Iguaçu Municipality Health Secretary) for supporting the surveillance programme.

References

- Bangs, M.J., Tan, R., Listiyarningsih, E., Kay, B.H., Porter, K.R., 2001. Detection of dengue viral RNA in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to sticky lures using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Med. Entomol.* 38, 720–724.
- Briseño, B., Gómez-Dantés, H., Argot-Ramírez, E., Montesano, R., Vázquez-Martínez, A.L., Ibáñez-Bernal, S., Madrigal-Ayala, G., Ruíz-Matus, C., Flisser, A., Tapia-Conyer, R., 1996. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of dengue serotype 3 in Mexico. *Emerg. Infect. Dis. Dispatches* 2, 63–65.
- CDC, Center for Division Control and Prevention, 1995. Dengue 3 in Central America. *Dengue Surveillance Summary*. San Juan, Puerto Rico. 70, 1-3.
- Clarke, D.H., Casals, J., 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 561–573.
- Da Silva Jr., J.B., Siqueira Jr., J.B., Coelho, G.E., Vilarinhos, P.T.R., Pimenta Jr., F.G., 2002. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol. Bull.* 23, 1–7.
- De Paula, S.O., Fonseca, B.A.L., 2002. Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM-positive samples: comparison of whole blood, buffy coat and serum as clinical samples. *J. Virol. Methods* 102, 113–117.
- Figueredo, L.T.M., 2000. The Brazilian flavivirus. *Microbes Infect.* 2, 1643–1649.
- Figueroa, R., Ramos, C., 2000. Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Arch. Med. Res.* 31, 429–430.
- Focks, D.A., Daniels, E., Haile, D.G., Keesling, J.E., 1995. A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 489–506.
- Gubler, D.J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 480–496.
- Gubler, D.J., Sather, G.E., 1988. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever, in: *Simpósio Internacional sobre Febre amarela e dengue: Cinquentenário da Introdução da cepa 17D no Brasil*. Maio 15-19; Rio de Janeiro, Brazil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, pp. 291-322.
- Gubler, D.J., Kuno, G., Sather, G.E., Velez, M., Oliver, A., 1984. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 158–165.

- Hanna, J.N., Ritchie, S.A., Phillips, D.A., Serafin, I.L., Hills, S.L., van den Hurk, A.F., Pyke, A.T., McBride, W.J., Amadio, M.G., Spark, R.L., 2001. An epidemic of dengue 3 in far north Queensland, 1997-1999. *Med. J. Australia* 174, 178-182.
- Harris, E., Sandoval, E., Xet-Mull, A.M., Johnson, M., Riley, L.W., 1999. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS-PCR). *Virology* 253, 86-95.
- Ibanez-Bernal, S., Briseño, B., Mutebi, J.P., Argot, E., Rodríguez, G., Martínez-Campos, C., Paz, R., de la Fuente-San Roman, P., Tapia-Conyer, R., Flisser, A., 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med. Vet. Entomol.* 11, 305-309.
- IBGE, Censo Demográfico 2000 [Online]. [Accessed 6 April 2004]. Available from the World Wide Web: http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/tabela-grandes_regioes211.shtm.
- Igarashi, A., 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.* 40, 531-544.
- Kow, C.Y., Koon, L.L., Yin, P.F., 2001. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. *J. Med. Entomol.* 38, 475-479.
- Kuno, G., Gomez, I., Gubler, D.J., 1987. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 153-159.
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., Vorndam, V., 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 545-551.
- Lourenço de Oliveira, R., Honório, N.A., Castro, M.G., Schatzmayr, H.G., Miagostovich, M.P., Alves, J.C., Silva, W.C., Leite, P.J., Nogueira, R.M., 2002. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 799-800.
- Miagostovich, M.P., Nogueira, R.M.R., Cavalcanti, S.M.B., Marzochi, K.B.F., Schatzmayr, H.G., 1993. Dengue epidemic in the State of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 35, 149-154.
- Miagostovich, M.P., Santos, F.B., Araújo, E.S.M., Dias, J., Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M.R., 1997. Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 595-600.
- Miagostovich, M.P., Vorndam, V., Araújo, E.S.M., Santos, F.B., Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M.R., 1999. Evaluation of IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J. Clin. Virol.* 14, 183-189.
- Miagostovich, M.P., Santos, F.B., Gutiérrez, C.M., Riley, L.W., Harris, E., 2000. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1286-1289.
- Miagostovich, M.P., Santos, F.B., De Simone, T.S., Costa, E.V., Filippis, A.M.B., Schatzmayr, H.G., 2002. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 1-4.
- Miagostovich, M.P., Sequeira, P.C., Santos, F.B., Maia, A., Nogueira, R.M.R., Schatzmayr, H.G., Harris, E., Riley, L.W., 2003. Molecular typing of dengue virus type 2 in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 45, 17-21.
- Nogueira, R.M.R., Schatzmayr, H.G., Miagostovich, M.P., Farias, M.F.D.B., Farias Filho, J.C., 1988. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 219-225.
- Nogueira, R.M.R., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Schatzmayr, H.G., 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85, 253.
- Nogueira, R.M.R., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Souza, R.W., Zagne, S.M.O., Schatzmayr, H.G., 1993. Dengue epidemic in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1991: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol. Infect.* 111, 163-170.
- Nogueira, R.M.R., Miagostovich, M.P., Schatzmayr, H.G., Araújo, E.S.M., Santos, F.B., Filippis, A.M.B., Souza, R.V., Zagne, S.M.O., Nicolai, C., Baran, M., Teixeira Filho, G., 1999. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 297-304.
- Nogueira, R.M.R., Miagostovich, M.P., Filippis, A.M.B., Pereira, M.A.S., Schatzmayr, H.G., 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 925-926.
- Rigau-Pérez, J.G., Avala-Lopez, A., Garcia-Rivera, E.J., Hudson, S.M., Vorndam, V., Reiter, P., Cano, M.P., Clark, G.G., 2002. The reappearance of dengue-3 and subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 355-362.
- Rocco, I.M., Kavakama, B.B., Santos, C.L.S., 2001. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 43, 55-57.
- Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M.R., Travassos da Rosa, A.P.A., 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81, 245-246.
- Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M.R., Miagostovich, M.P., 1996. Dengue in Brazil: laboratory aspects and perspectives. *Virus Rev. Res.* 1, 17-21.
- SES/RJ, Secretaria de Saúde do estado do Rio de Janeiro, 2002. Quadro demonstrativo de casos notificados de dengue no estado do Rio de Janeiro de 1986-2002. Rio de Janeiro. Brazil.
- Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F.A., Nisalak, A., 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Inf. Dis.* 181, 2-9.
- WHO, 1997. *Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, 2nd edition. World Health Organization Geneva.

2) Segundo artigo

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection.

Research article

Open Access

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection

Patrícia CF Neves-Souza^{†1}, Elzinandes L Azeredo^{†1}, Sonia MO Zagne², Rogério Valls-de-Souza³, Sonia RNI Reis¹, Denise IS Cerqueira¹, Rita MR Nogueira¹ and Claire F Kubelka^{*1}

Address: ¹Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, CEP 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ²Departamento de Clínica Médica, Hospital Antonio Pedro, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil and ³Instituto de Pesquisas Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, CEP 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Email: Patrícia CF Neves-Souza - patneves@ioc.fiocruz.br; Elzinandes L Azeredo - elzinandes@yahoo.com.br; Sonia MO Zagne - sonia_maris@yahoo.com.br; Rogério Valls-de-Souza - rvalls@uol.com.br; Sonia RNI Reis - sonireis@ioc.fiocruz.br; Denise IS Cerqueira - denisece@ioc.fiocruz.br; Rita MR Nogueira - rita@ioc.fiocruz.br; Claire F Kubelka* - claire@ioc.fiocruz.br

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 18 August 2005

Received: 03 October 2004

BMC Infectious Diseases 2005, 5:64 doi:10.1186/1471-2334-5-64

Accepted: 18 August 2005

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/5/64>

© 2005 Neves-Souza et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Mononuclear phagocytes are considered to be main targets for Dengue Virus (DENV) replication. These cells are activated after infection, producing proinflammatory mediators, including tumour-necrosis factor- α , which has also been detected *in vivo*. Nitric oxide (NO), usually produced by activated mononuclear phagocytes, has antimicrobial and antiviral activities.

Methods

The expression of DENV antigens and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human blood isolated monocytes were analysed by flow cytometry using cells either from patients with acute Dengue Fever or after DENV-I *in vitro* infection. DENV-I susceptibility to iNOS inhibition and NO production was investigated using N^G-methyl L-Arginine (N^GMLA) as an iNOS inhibitor, which was added to DENV-I infected human monocytes, and sodium nitroprussiate (SNP), a NO donor, added to infected C6/36 mosquito cell clone. Viral antigens after treatments were detected by flow cytometry analysis.

Results

iNOS expression in activated monocytes was observed in 10 out of 21 patients with Dengue Fever and was absent in cells from ten healthy individuals. DENV antigens detected in 25 out of 35 patients, were observed early during *in vitro* infection (3 days), significantly diminished with time, indicating that virus replicated, however monocytes controlled the infection. On the other hand, the iNOS expression was detected at increasing frequency in *in vitro* infected monocytes from three to six days, exhibiting an inverse relationship to DENV antigen expression. We demonstrated that the detection of the DENV-I antigen was enhanced during monocyte treatment with N^GMLA. In

the mosquito cell line C6/36, virus detection was significantly reduced in the presence of SNP, when compared to that of untreated cells.

Conclusion

This study is the first to reveal the activation of DENV infected monocytes based on induction of iNOS both *in vivo* and *in vitro*, as well as the susceptibility of DENV-1 to a NO production.

Background

Dengue viruses (DENV) have been detected in several lymphoid organs originating from fatal cases of hemorrhagic disease, mainly in cells from the mononuclear phagocyte lineage [1]. Nevertheless, the frequency of disseminated virus detection in autopsies is low and microscopic injury is not sufficient to justify death during the Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) or Dengue Shock Syndrome (DSS). It is believed that disease severity is a result of an immunopathological response leading to hemorrhagic and vasodynamic alterations and shock.

Mononuclear phagocytes have been considered as main targets for DENV replication [2,3] and recently the virus was detected in dendritic cells originating from one individual 24 hours post DENV infection [4,5]. Morens *et al.* [6] have shown strain differences of DENV, originating either from mild or severe cases, with respect to their growth in human monocytes, suggesting that characteristics inherent to virus genome and replication were related with disease severity. Viral RNA was detected by RT-PCR in peripheral blood leukocytes [7] in humans during infection and DENV antigens were present in circulating monocytes [8], Kupffer cells and macrophages from different organs such as liver, spleen and lungs [9].

Pathogenesis may consist of virus penetration into monocytes or dendritic cells, cell activation and synthesis induction of cytokines, arachidonic acids and very likely nitric oxide. These factors would be involved not only in generating dengue disease [10] but also in the elimination of viruses [11].

The *in vivo* activation of mononuclear phagocytes by interferon (IFN)- γ during DENV infection can be expected, since this cytokine is detected in serum during the acute phase [12,13] and is also produced by peripheral leukocytes from patients with previous dengue records [14]

The *in vitro* production of IFN- α,β , interleukin-6 and tumour-necrosis factor (TNF)- α by infected fibroblasts and/or macrophages was described [15] as well as the production of platelet activating factors [16]. Recently, viral

titres during infection were correlated with the production of prostaglandin E₂, which is known to be vasoactive [17].

Considering that dengue is an acute and short-termed disease, and IFN- α,β and TNF- α are molecules that induce antiviral defence mechanisms [11], it is conceivable that DENV replication is greatly inhibited in mononuclear phagocytes, although inflammatory reactions may be activated as well. It is well known that NO is produced by IFN- γ activation of monocytes [18] and has antiviral activities against Herpes Simplex Viruses, Epstein Bar Virus and some Coxsackie and Tick-borne encephalitis viruses [16]. NO levels were found to be increased in patients with dengue [19] or *in vitro* infected Kupffer cells [20], however the production has not been detected in infected monocytes in culture [21].

The aim of this research is to investigate iNOS monocyte induction during acute DENV infection in patients and after *in vitro* infection by DENV-1. We demonstrated that monocytes isolated from several patients became activated and express iNOS, which leads to the production of NO by the cell. DENV-1 was susceptible to a NO donor treatment and, in addition, virus was detected at higher rates in infected cells after iNOS inhibition, indicating that NO might play a substantial role in controlling DENV-1 infection of monocytes in culture and *in vivo* during natural infection.

Methods

Patients and laboratory diagnosis

Blood samples were obtained from DENV infected patients in April 2000 in Foz do Iguaçu, PR, and from February to April 2001 and January to March 2002 in Niterói, RJ, Brazil. Patients were diagnosed based on clinical grounds as Dengue Fever (fever, headache, retro-orbital pain, myalgias, arthralgias, rash and prostration); some had hemorrhagic manifestations, platelet counts under 100,000/mm³, hypotension receiving parenteral hydration and hospitalisation. The diagnosis of DENV infection was confirmed by anti-dengue enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-IgM, or virus isolation. Informed written consent, approved by Fundação Oswaldo Cruz

Ethical Committee under Nr#111/00, was obtained from all dengue patients prior to blood draw.

Cell cultures

Aedes albopictus C6/36 cell clone was grown as monolayers at 34 °C on Leibovitz medium (L-15) supplemented with 200 mM glutamine, 1% non-essential amino acids solution, 19% tryptose phosphate broth, 100 U/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin and 5% foetal calf serum (FCS).

Preparation of virus stock and virus titration

DENV serotype 1, strain 16007 was provided by Dr. SB Halstead (Naval Medical Research Center, USA). Virus was titrated by serial dilution cultures in microtiter plates and detected by immunofluorescence as previously described [22]. Virus titre was calculated as 50 percent tissue culture infectious dose or TCID₅₀/ml [23,24]. Inactivated virus was prepared by incubating the inoculum for 24 hours at 37 °C and treating it with UV light (60 Hz, with distance of 20 cm) for 1 hour. Virus stock used was at a concentration of 3.18×10^7 TCID₅₀/ml.

Preparation of human peripheral blood mononuclear leukocytes (PBMLs)

Mononuclear leukocytes were obtained from heparinised venous blood originating from either DENV-infected patients or dengue seronegative adult donors. Cells were isolated through density gradient centrifugation (350 g, 20 minutes in Ficoll-Paque Plus Amersham Biosciences Corp, Piscataway, USA). Cells were suspended in RPMI 1640 supplemented with 200 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin and 10% FCS and afterwards incubated at 37 °C under humid atmosphere with 5%CO₂. Cells isolated from patients with acute dengue were suspended in supplemented RPMI 1640 containing an additional 10% DMSO and 50% FCS and maintained in liquid nitrogen.

Infection of adherent PBMLs and treatment with an iNOS inhibitor

Infections were performed on 24-well plates. Freshly isolated PBML suspended in RPMI 1640 medium and supplemented with 10% FCS were seeded at 2×10^6 cells/well. After an 18 hour-incubation, adherent cells were enriched by washing away unattached cells twice. Inoculum was diluted in 1 ml medium containing a multiplicity of infection approximately of 8 TCID₅₀/adherent cell DENV-1. After a 2 hour-incubation for adsorption, 1 ml medium was added to achieve 10% FCS. After an 18 hour-incubation, all culture medium containing virus was removed and cultures were further incubated with fresh medium for up to 6 days. In some experiments the iNOS inhibitor, N^G-methyl L-Arginine (N^GMLA), was added at a final concentration of 400 µM. Wells were set in triplicates for each different parameter in culture. Cell viability was deter-

mined in culture by Trypan blue exclusion during 6 days. Duplicates of cell control, inactivated and infectious DENV were assayed. Viability ratios were calculated by dividing cell counts from each day by counts made just after virus adsorption.

Infection of C6/36 cell line and treatment with a NO donor

Infections were performed on 24-well plates. C6/36 were seeded at 2×10^5 cells/well in medium with 5% FCS and allowed to form a monolayer for 24 h at 34 °C. Cell supernatant was removed and adherent cells were washed twice with medium without FCS. Wells were filled with 1 ml fresh medium containing DENV-1 or only medium in a 1:10 dilution from initial inoculum containing a multiplicity of infection of 1.59 TCID₅₀/cell for DENV-1. After a 90 minute-adsorption, 1.0 ml medium was added to achieve 2% FCS, containing sodium nitroprussiate (SNP), a NO donor, resulting in final concentrations of 10 or 100 µM [25]. Viruses were allowed to grow for two days in incubated cultures. Triplicate wells were set for each culture parameter. Viability of treated cells was confirmed by Trypan blue exclusion or propidium iodine uptake.

Virus labelling of infected C6/36 cells, single and double labelling of infected adherent PBMLs for flow cytometry analysis

Cells were recovered by scratching with plastic microtip using cold medium and were set at 1×10^6 /microtube; they were centrifuged (350 g, 5 min) and washed once with 1 ml PBS pH 7.4 with 2% FCS and 0,01% NaN₃. Surface labelling was performed with FITC-labelled antibodies to CD14 (DAKO, Denmark, 1:100 dilution) for 45 min directly on adherent viable PBMLs under ice bath. This was done to confirm that ~95% of the monocyte gated cells would be CD14+ on the infection day. Intracellular staining after infection was performed according to previously described [26] with slight modifications. Briefly, it required a fixation with 0.5 ml cold paraformaldehyde at 4% in PBS for 10 min and, after centrifugation, membrane permeabilization was carried out with 1 ml 0.1% saponine in PBS with FCS and NaN₃. Monoclonal antibody Dengue Complex-reactive (Chemicon, USA, 1:200 dilution in PBS with saponine, FCS and NaN₃) was added to cells for a 60-minute incubation. Cells were washed once with 1 ml PBS with FCS and NaN₃ and further incubated with anti-mouse IgG labelled with PE or FITC (DAKO, USA, 1:50 dilution in PBS with saponine, FCS and NaN₃) for 30 minutes. After washing, infected adherent PBMLs were further incubated with FITC-labelled antibody to iNOS (B&D Transduction Laboratories, USA, 1:100 dilution) for 45 minutes. Alternatively, for double staining CD14 and DENV, cells were firstly labelled with PE-labelled antibodies to CD14 (DAKO at dilution 1:100) for 30 minutes 4 °C, washed, fixed with 0,5 ml cold 2% paraformaldehyde for 10 minutes and,

after centrifugation, membrane permeabilization was carried out with 1 ml 0.1% saponine PBS with FCS and NaN_3 and further labelled with Alexa 654 – labelled monoclonal antibody to Dengue for 30 minutes. Matching isotype antibodies were used for DENV and iNOS labelings. Finally cells were washed twice, resuspended in 1% paraformaldehyde and kept at 4 °C up to 3 days until acquisition by flow cytometry. Cells were acquired (10,000 events for cell lines and 5,000 for gated monocytes) on a FACS® Calibur flow cytometer (Beckon & Dickinson, USA) and analysed using FlowJo Software (TreeStar Inc., CA, USA). Isotype-matched antibodies were used as a negative control for all stainings.

Statistical analyses

Two-way Student's *t* test was performed using GraphPad Prism version 4.02 for Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>) in order to determine the significance of differences in percentages of virus labelling found in cells infected under various conditions. Altered parameters were considered significant when $P < 0.05$.

Labelled cell rates in healthy donors were firstly tested for normality using the Prism program (values passed the normality test of Kolmogorow-Smirnov) and then cell patient frequencies were tested for sample positivity by Student's *t*-Distribution ($t_{n-1} = 10, \alpha = 0.025 = 2.228$ or $t_{n-1} = 9, \alpha = 0.025 = 2.262$) calculating a referential limit value for negativity, according to the following formula: *Average of values from control samples* + [*Standard Deviation of values from control samples* $\times t_{(n-1; \alpha = 0.025)}$]. Determinations above referential limit values were considered positive.

Results

Characterization of target cells for DENV and iNOS expression in peripheral blood mononuclear leukocytes (PBMLs) originating from patients with Dengue Fever

Previous reports demonstrated human monocytes as targets for DENV in cultures [1,27]. Therefore, monocyte and lymphocyte subsets present in PBMLs originated from patients with acute Dengue Fever were analysed by flow cytometry (FACS). Figure 1 displays the cell size and granularity profiles of PBMLs from a healthy donor (Figure 1A) and a dengue patient (Figure 1C). CD14+ gated cells were selected (Figure 1B) and plotted as logical monocyte gate in the FSCxSSC dot plot (R1 in Figure 1C). Monocyte (R1) and lymphocyte (R2) gates selected were used for further studies. Approximately 95% cells of the R1 are CD14+ cells.

The monocyte and lymphocyte profile by FACS after DENV and iNOS immune-labelling were studied. Representative dot plots of DENV Antigens (Ag) and iNOS positive detection in monocytes from dengue patients

(Figures 1E and 1H, respectively) are compared to monocytes from healthy individuals (Figures 1D and 1G) and lymphocytes from patients (Figures 1F and 1I). Patient monocytes presented DENV-Ag during the first eleven days of disease onset (Figures 1E and 2A) compared to control monocytes (Figures 1D and 2A). Patient cells collected at later stages of disease did not display detectable viral antigen (data not shown). Among the 35 dengue patients 25 expressed DENV-Ag above the referential limit value for negativity in the Student's *t*-Distribution and no difference was detected between early (1–5 days) and late (6–11 days) infection. Among 22 patients tested for iNOS expression (Figures 1H and 2B), 10 were positive as compared to controls (Figures 1G and 2B). Cells from the lymphocyte gate do express neither DENV-Ag ($0.80 \pm 0.77\%$) nor iNOS ($3.7 \pm 2.57\%$) (Figures 1F and 1I, respectively). The highest incidence of iNOS activation was from 6 to 10 days of disease (8 out of 20 patients). Among 11 patients with platelet counts $< 100,000/\text{mm}^3$, six had iNOS+ cells above the referential limit value for negativity. Seven of these patients also had hypotension, were hospitalised and submitted to parenteral rehydration. Among 11 patients with normal platelet levels merely 4 had significantly elevated iNOS+ cell ratios. iNOS expression, present in a significant frequency among dengue patients, could not be associated with severity in this sampling.

Characterization of DENV target cells, DENV-Ag detection and iNOS expression in monocytes after in vitro infection

Adherent human PBMLs were incubated for 3–6 days with infectious and inactivated DENV and evaluated for presence of DENV-Ag and iNOS expression. Cell viability was determined daily by Trypan blue exclusion. After 3 days of culture, cells incubated with the inactivated virus remained $42 \pm 7\%$ viable and with infectious virus $42 \pm 23\%$ viable as compared to the day 0. On day 6 $37 \pm 2\%$ cells were viable for inactivated and $44 \pm 3\%$ for infectious virus, showing no differences between the two virus incubations. Control cell rates of viability were higher, $58 \pm 8\%$ at day 3 and $69 \pm 19\%$ at day 6. Although infectious viruses may not be crucial in increasing monocyte mortality, viral antigens alter cell viability.

Kinetics of virus detection in mononuclear phagocytes varies according to virus strain and multiplicity of infection (MOI) used (Cologna *et al.*, 2003). At the MOI used here for DENV-1 strain 16007 (8 TCID₅₀/adherent cell) preliminary results displayed low rates of infection on the first day (in average $17 \pm \%$), increasing at day 2 (average 31%). No iNOS labelling was detected on these first days of infection. Therefore, experiments were performed using infections from 3 to 6 days.

Figure 3B shows an image obtained under confocal microscopy in a field with a high frequency of infected adherent

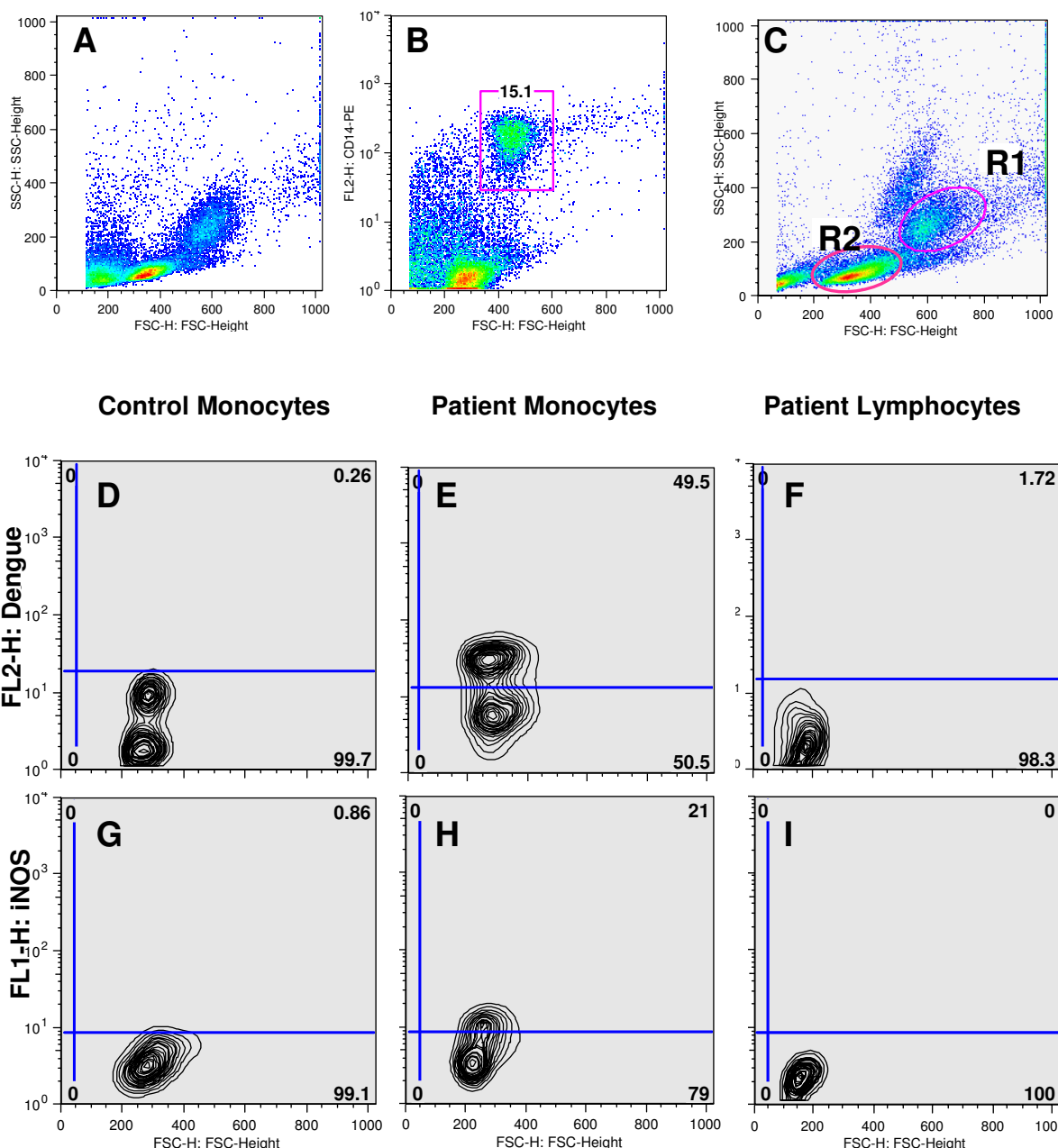


Figure 1
Dot and contour plots showing DENV-Ag and iNOS monocyte and lymphocyte expression in dengue patients. Human PBMLs from a healthy individual (Figures 1A, 1D, 1G) were used as control. Cells from a 4-day dengue infected patient (Figures 1B, 1C, 1E, 1F, 1H, 1I) were labelled with anti-CD14-PE and CD14+ gated cells – R1 (Figure 1B) were considered as logical gate or *monocyte gate* and R2 is as the *lymphocyte gate* in the FCS vs. SSC dot plot (Figure 1C). R1 and R2 were used for further analysis during this work. Alternatively, human PBMLs were labelled either with an antibody to DENV Ags and anti-mouse IgG-PE (Figures 1D-1F) or with anti-iNOS-FITC (Figures 1G-1I) and analysed by FACS in either the R1, monocyte gate (Figures 1D-1F) or in the R2, lymphocyte gate (Figures 1F-1I). x-axis represent mean of cell population size (FCS) and y-axis represent cell granularity (SSC) or fluorescence intensity.

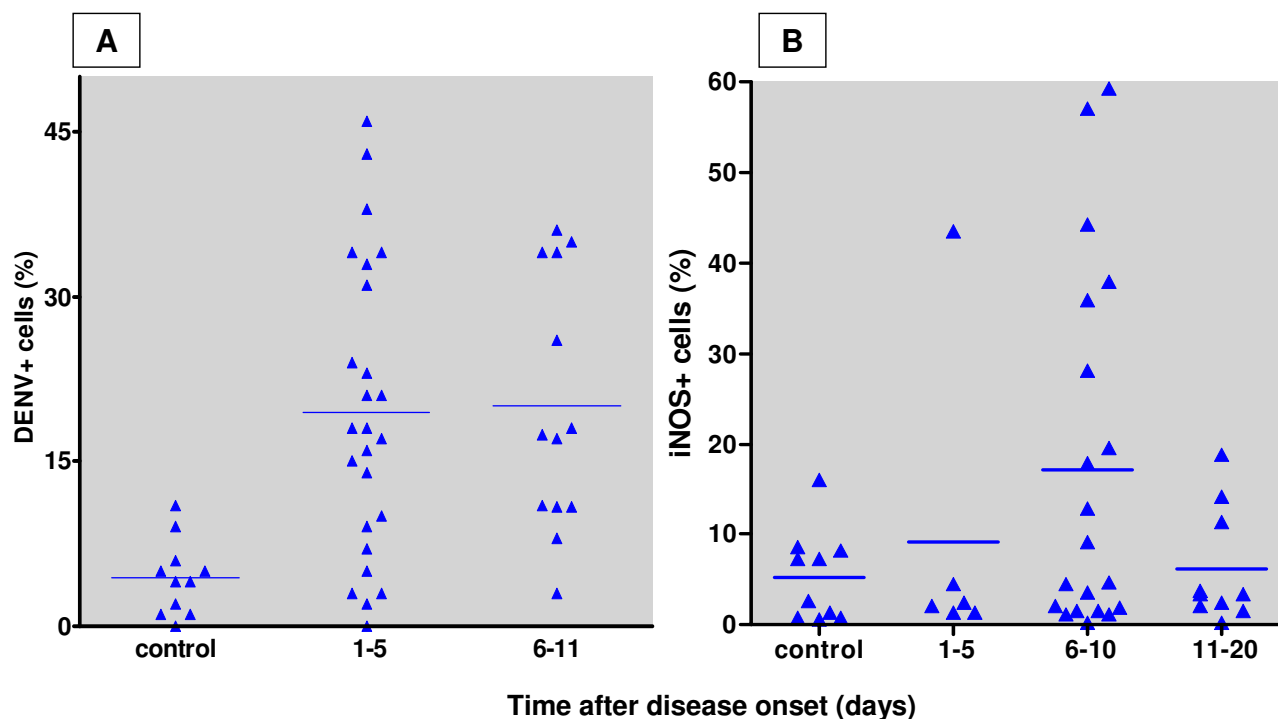


Figure 2

Frequencies of DENV-Ag+ and iNOS+ monocytes in dengue patients. Human PBMLs from dengue individuals were labelled with an antibody to DENV-Ag and an anti-mouse IgG-PE or with an antibody to iNOS FITC-labelled and data obtained by FACS in the monocyte gate. Percentages of DENV-Ag+ infected cells were determined in 11 healthy individuals and 35 with dengue (Figure 2A; 2 patients were measured in duplicate samples at different time points). Percentages of iNOS+ infected cells were determined in 10 healthy individuals and 22 with dengue (Figure 2B; 14 patients were measured in duplicate samples at different time points). Horizontal lines represent percentage averages of labelled cells from the population of individuals in each of the discrete categories.

mononuclear leukocytes compared to the absence of fluorescent cells in control cells (Figure 3A). DENV-Ag+ cells were detected by flow cytometry among CD14+ cells, although very small rates of CD14+ cells were also labelled for DENV-Ag (Figures 4A and 4B are labelling controls for Figure 4C). For further evaluations during *in vitro* infection, we studied the monocyte population, using the CD14+ logical gate, which presented the same profile as the R1 shown in Figure 1B).

In Figure 4D we observed that infected monocytes displayed specific DENV-Ag expression when compared to monocyte incubation with inactivated virus and an isotype-matched antibody, suggesting virus replication during infection. iNOS was specifically expressed in monocytes infected with DENV. Mock-infected monocytes by inactivated DENV did not yield viral antigens during culture. The inactivated virus consistently induced low

rates of iNOS+ monocytes, however differences were statistically insignificant when compared to controls. The infectious virus in all experiments resulted in significantly higher rates of iNOS+ monocytes than in control cultures. Infectious virus, if not crucial, certainly play an important role in inducing iNOS. Control cells displayed only low levels of background labelling for both DENV-Ag and iNOS.

During *in vitro* infection DENV-Ag were markedly expressed in monocytes and detected on day 3 either by confocal microscopy (Figure 3B) or by flow cytometry (Figure 4). However, from day 4 to 6 Ags detection disappeared rapidly (Figure 4E) with insignificant rates of labelled cells (Student's T-test). iNOS is apparently detected in cells already at day 3, but it reaches significantly higher frequencies of positive cells at days 5 and 6 (Figure 4E).

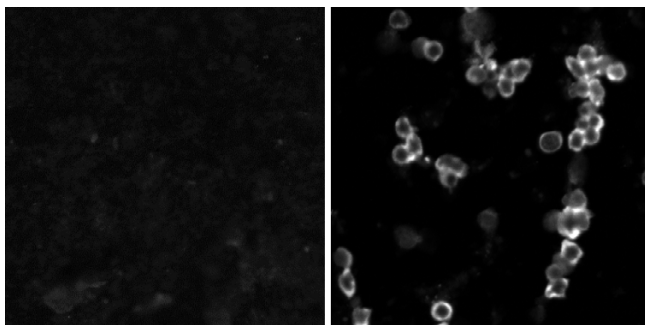


Figure 3
Confocal microscopy of DENV-Ag expression after *in vitro* infection of monocyte-rich cultures. Adherent human PBMLs were incubated for three days either with cell culture medium (Figure 3A, 189.5 $\mu\text{m}/\text{field}$), or with infectious DENV (Figure 3B, 125 $\mu\text{m}/\text{field}$). Cells were labelled with antibody to DENV-Ag and anti-mouse IgG-FITC.

DENV-Ag detection in infected cells after treatment with an iNOS inhibitor – N^GMLA or with a NO donor – SNP

Nitric oxide antiviral activity induced by viruses in mononuclear phagocytes may be inhibited by N-monomethyl-L-arginine acetate (N^GMLA) [28]. Monocyte-enriched cultures were treated with N^GMLA and simultaneously infected with DENV. DENV-Ag⁺ cells were present in significantly higher frequency among infected cells in treated cultures after 4 days, as compared to infected and untreated cultures (Figure 5A, 5B). Figure 5A presents a flow cytometry histogram with an increased DENV-Ag⁺ cell population in presence of N^GMLA treatment as compared to untreated infected cultures, with significantly higher percentages of labelled cells (Figure 5B). Thus, the inhibition of iNOS facilitates DENV-1 replication, suggesting that NO production might be involved in the control of virus replication.

Dengue virus has limited rates of infection in monocytes and after a few days infection is controlled accompanied by the induction of several factors that may act as inhibitors of viral replication [21,29]. Since C6/36 cells are extremely susceptible to DENV infection and allow intense virus replication, these mosquito cells should be suitable to test the effect of a potential antiviral molecule. Therefore, C6/36 cultures were infected with DENV and simultaneously treated with sodium nitroprussiate (SNP), a known NO donor, which was added at concentrations of 10 or 100 μM . After 2 days of infection and treatment, DENV-Ag⁺ cells were detected using FACS. An uninfected cell control was used in order to detect unspecific labelling. SNP induced a significant inhibition of DENV-Ag expression in infected C/36 cells in both tested concentra-

tions, when percentages of positive cells were compared to those in untreated infected cells (analysis by Student's T test; Figures 5C and 5D). Therefore, inhibition of DENV-1 replication by NO production is evident during the present experiments.

Discussion

DENV was detected for the first time by flow cytometry in peripheral monocytes of infected patients. Earlier reports demonstrated viral particles in monocytes, lymphocytes or endothelial cells from tissues and blood clot of patients [9,30]. Infectious DENV [3] or PCR detection of nucleic acid [7] in PBMLs were even at higher incidence than in serum. We did not detect viral antigens in lymphocytes despite others having done so [9,30]. This may be due to the viral strain used or alternatively the genetic constitution of the human PBML donors. Monocytes are important targets for DENV either *in vitro* [31] or *in vivo* [8]. Supporting our previous report [26], we present here that DENV likely replicates in monocytes since detected antigens increase with time and no antigen is detected when inactivated virus is used. This indicates that viruses probably replicate for a short period and, during cell infection, mechanisms are activated that are able to control further replication.

Interferon (IFN)-mediated antiviral action is still considered to be among the most important intracellular mechanisms against viruses, however recently a mechanism in which viral proteins might be involved in blocking IFN signalling during dengue virus infections has been described [32] supporting the conjecture that other complementary antiviral activities may be acting during dengue infection as well [33].

We have exhibited here that DENV can be detected in peripheral monocytes of patients with acute Dengue Fever, and that these cells are activated as demonstrated by the expression of iNOS studied *ex vivo*. Equivalent data was obtained with *in vitro* infected monocytes from healthy individuals, and virus presence can be modulated by inhibiting iNOS or generating NO in cell culture, indicating that this molecule is likely to have a role in controlling DENV-1 genome expression within monocytes.

During acute Dengue Fever, iNOS expression in monocytes differed among patients probably due to individual variations. Inducible NOS is encoded by the NOS2A gene, haplotype 2 is associated with self-limiting hepatitis C infections [34] and NO production was associated with less severe forms of dengue [19].

Viral replication inhibition by NO has been considered with even increasing importance. The ability of NO to inhibit virus replication was first described in 1993

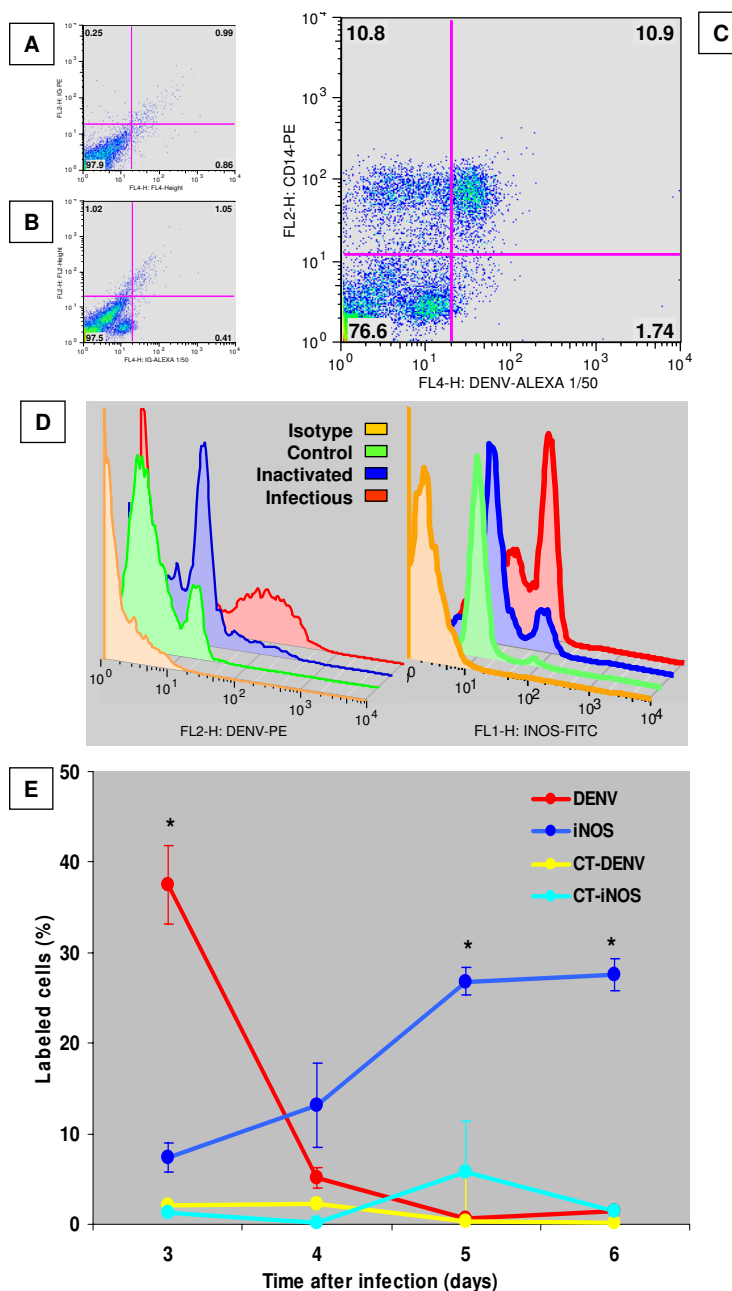
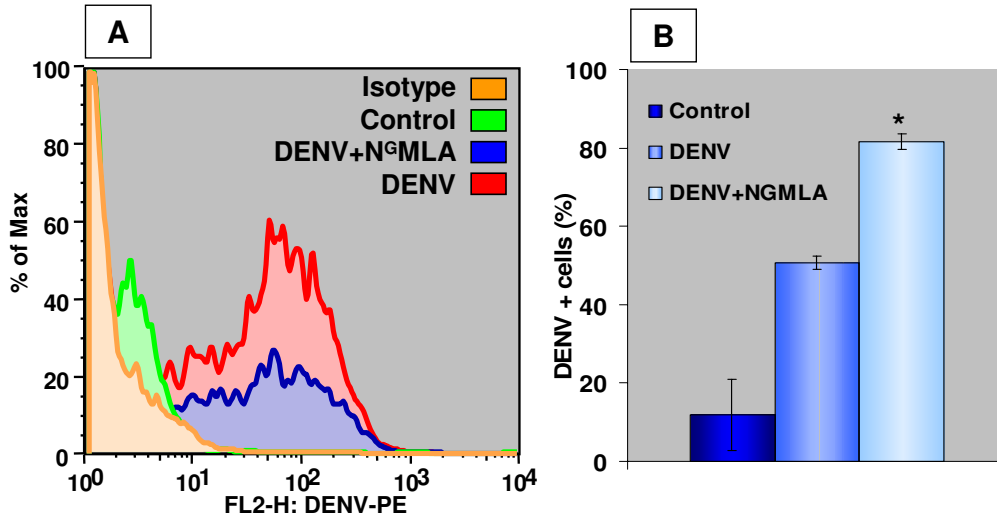


Figure 4

DENV-Ag and iNOS expression after *in vitro* Dengue infection of monocytes. Adherent human PBMLs were incubated for three days with infected DENV (Figures 4A, 4B and 4C). Cells were labelled either with isotype matched antibodies (Figures 6A and 6B) or antibodies to CD14-PE (y-axis) and DENV-Complex-Alexa-654 (x-axis) and were analysed by FACS (Figure 4C, *ungated*). Cells incubated for three to six days with cell culture medium, inactivated DENV or infectious DENV were labelled with antibody to DENV-Ag and anti-mouse IgG-PE and/or anti-iNOS-FITC and analysed by FACS. Isotype matched antibodies were used for both labelings (Figure 4D, 3 days for DENV-Ag and 6 days for iNOS labelling). x-axis represent mean of fluorescence intensity and y-axis represent percentage of maximum cell number counts. Figure 4E shows a kinetic curve comparing DENV-Ag and iNOS expression on cells from the monocyte gate. Each point represent average \pm SEM percentages from samples set in triplicates. * $P < 0.05$ and in Student's T-test showing difference in DENV-Ag and iNOS expression compared to uninfected controls (CT). Data are obtained from one representative experiment out of three performed with different cell donors.

Monocytes + iNOS inhibitor



C6/36 Cells + NO donor

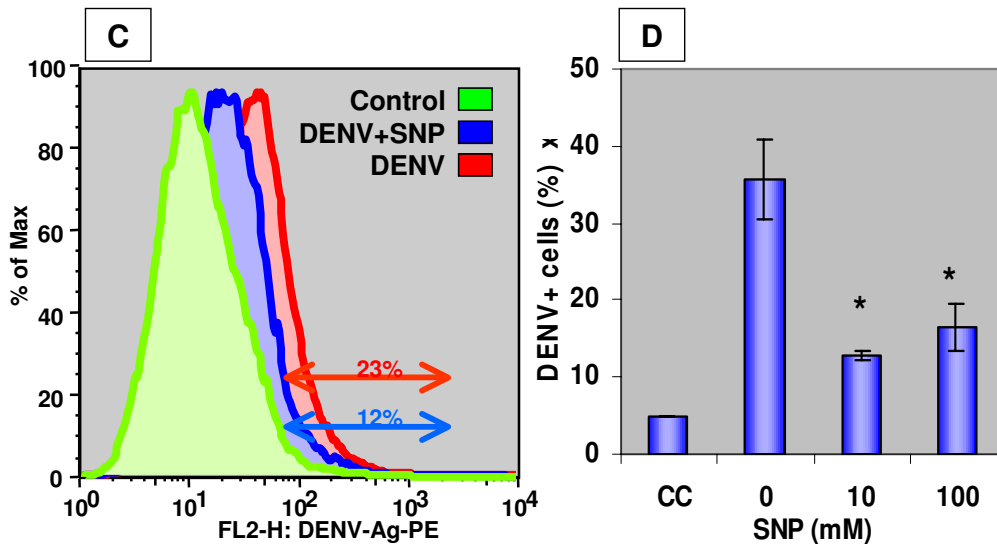


Figure 5
Effect of an iNOS inhibitor and of a NO donor on DENV-Ag expression after cell infection. Figures 5A and 5B – Effect of iNOS inhibitor – NGMLA on monocyte infection. Adherent PBMLs were incubated with either Mock C6/36 cell supernatant or DENV inoculum for 4 days in presence or absence of 400 μ M NGMLA. Figure 4A shows histogram with profile of infected monocytes after NGMLA treatment and labelling controls. Figure 4B shows percentages of DENV-Ag+ in gated monocytes obtained by flow cytometry. Figures 5C and 5D -. Effect of NO donor – SNP, on C6/36 cell infection. C6/36 cells were incubated with DENV for 2 days in absence or presence of 10 or 100 μ M SNP. Figure 4C shows a histogram with profiles of infected C6/36 cells obtained by FACS from a culture treated with 10 μ M SNP or controls. The histogram gates have been made where $\geq 99\%$ than cells in the cell control are excluded. Figure 4D shows percentages of DENV-Ag+ cells calculated from ungated cells after labelling with antibody to DENV-Complex and anti-mouse IgG-PE. In histograms x-axis represent mean of fluorescence intensity and y-axis represent percentage of maximum cell number counts. Cells were labelled with antibody to DENV-Complex followed by anti-mouse IgG-PE. Average \pm SEM are represented from samples set in triplicates. * $P < 0.05$ in Student's T-test showing difference in DENV infection after treatment. Data are obtained from one representative experiment out of two for each cell type using two different monocyte donors.

[33,35,36] and thereafter many other studies have been developed. While some viruses were reported to be susceptible to NO action, others were resistant [35]. The mechanisms by which NO induces viral modulation are diverse, such as inactivation of viral cysteine protease by NO-dependent S-nitrosylation [36] or inhibition of Epstein-Barr virus reactivation. The inhibition of virus replication by NO was found to be mediated by IFN- γ [33,37] and dependent upon the induction of the signal transducer and activator of transcription (STAT) STAT1 phosphorylation [38]. Antiviral NO-mediated effect may also be activated by IFN- α , since it has been observed that mononuclear leukocytes activated *in vitro* by IFN- α or from Hepatitis C virus infected patients undergoing IFN- α therapy produce NO [39]. Some flaviviruses had their NO susceptibility tested and an effective inhibitory mechanism was determined for Japanese encephalitis virus [40], but studies on Tick-borne encephalitis virus (TBEV) revealed no antiviral effects by NO [35]. The fact that dengue patients may have monocytes activated by circulating IFN- γ [12-14] is consistent with induction of iNOS during acute disease as reported here for both *in vivo* and *in vitro* infection.

NO may play a role in severity of viral hemorrhagic fevers (Sanchez *et al.*, 2004) probably when produced in high concentrations, by affecting vascular tone and contributing to virus-induced shock. As previously mentioned, NO was detected in sera from patients with dengue [19] and correlated with the less severe form of the disease. Hence, NO may be exerting both protective and pathological action, depending upon the concentration produced [41]. Since our panel consisted of few patients, a correlation was not possible; iNOS⁺ cell rates were increased in some patients from both groups presenting mild or severe disease. Espina *et al.* [21] were not able to detect NO production by monocytes in culture. This apparent contradiction with our data of induced NOS may be explained by the use of a different detection technique: Griess reagent detects nitrite in cell culture supernatant which may be below method sensitivity since the density of monocytes in culture is not high. We did not succeed in detecting NO by this method in human monocyte cultures, and we only detected NO in murine macrophages after proper stimulation at high cell culture density [20]. Moreover, detection of NO produced *in vitro* by infected Kupffer cells [20] was carried out by a fluorimetric assay, much more sensitive than the Griess Reaction.

Only few reports show human mononuclear cells from healthy individuals generating NO production following treatment with cytokines, pathogens, and/or pathogen-derived products [39,42]. Until a few years ago expression of iNOS in humans was questioned [43] or difficult to

detect [20,44]. It may be possible that iNOS induction and expression dependent on synergistic signals to macrophage/monocyte [45,46], and cytokines and virus products may be acting as different stimuli.

Replicating dengue viruses may be necessary for optimal iNOS induction, since rates of iNOS⁺ cells were much higher than when the inactivated virus was used. However, Kupffer cells infected with DENV induced NO and iNOS, in spite of the absence of viral progeny. Non-living products, such as peptides [47], originating from either other viruses [39,48] or parasites [49,50] can stimulate iNOS in macrophages/ monocytes and induce NO production.

Our data demonstrate that, when experimentally infecting their targets (e.g., monocytes), DENV-1 is able to induce a progressive expression of the enzyme iNOS, indicating that NO might be produced during *in vitro* infection as it is produced *in vivo*. At 6 days of infection, the iNOS detection is increased as compared to that of 3 days and is coincident with the DENV decrease, favouring the hypothesis that iNOS⁺ cells were promoting an inhibitory effect on viruses either directly by NO production or by other virus-induced mechanisms during this monocyte activation, such as IFN- α production [39]. Alternatively cells interacting with viral antigens are probably becoming activated and dying either by cell lysis or by virus induced apoptosis [21]. We also observed that surviving cells remained in culture for more than 10 days: either viruses are eliminated or cells become refractory by interferon-related mechanisms, in contrast with what is observed, e.g., for mosquito C6/36 cells, which are mostly destroyed by the virus. Here we observed that there is an enhancement of DENV-1 Ags detection, when infected monocytes were cultured with the iNOS inhibitor N^GMLA, indicating that DENV-1 is very likely susceptible to NO inhibitory activity. This result is confirmed by the observation that DENV-1 detection is strongly inhibited in C6/36 cultures by the presence of the NO donor, SNP. These findings are similar and supported by observations in other viral models [51].

With regard to DENV replication, further studies are warranted in order to elucidate which pathways are involved in NO-mediated inhibition of DENV-1. Despite C6/36 remain viable by Trypan blue or propidium iodide exclusions, it has to be considered that the NO action in virus targeted cells may involve apoptosis. Furthermore, it is not known whether or not other strains and serotypes will activate iNOS and be sensitive to NO action. There may be relevance in studying various strains from different serotypes and evaluate if susceptibility and resistance are strain and/or serotype specific.

Conclusion

The data presented here displays for the first time the presence of iNOS in monocytes from patients with acute dengue fever. Despite the fact that, in excess, NO may provide a deleterious effect on vascular permeability, evidence exhibited here favour a role for NO in the control of *in vitro* dengue infection within monocytes. This may hold true for natural human infection as well.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PCFNS and ELA participated equally in the study design, in the experimental work and in the preparation of the manuscript.

PCFNS carried out all the *in vitro* infections and assays and flow cytometry analysis.

ELA carried out all the work with patient blood collecting, storing cells and plasma and performing flow cytometry assays and analysis.

SMOZ established the connection with the Health Units in Niterói, examined the patients and registered the clinical data.

RVS examined the patients and registered the clinical data.

SRNIR helped with patient blood collecting, storing cells and plasma.

DISC helped to perform flow cytometry assays.

RMRN was responsible for the confirmatory diagnosis of dengue in Rio de Janeiro.

CFK oversaw the study and participated in its design and coordination, performed flow cytometry and statistical analysis and prepared the initial and revised drafts of the manuscript and figures.

Acknowledgements

Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Brazilian National Council for Research (CNPq) and Rio de Janeiro State Research Support Foundation (FAPERJ) financially supported this work. P.C.F. Neves-Souza and D.I.S. Cerqueira were fellows from CNPq and E.L. Azeredo was a pre-doctoral fellow from FIOCRUZ. We acknowledge the Dr. E. Pozzolo and Dr. Gilbert (Secretaria Municipal de Saúde de Foz do Iguaçu) for their support during the fieldwork and confirmatory diagnostics in Paraná, Brazil in 2000. We thank Dr. Marize Miagostovich and Ms. Eliana Saraiva for their assistance during laboratorial diagnosis in our Department, Dr. Marcelo Pelajo-Machado from Departamento de Patologia, IOC for the confocal microscopy and the technical support of Ms. Farid O F Von Sydow, as graduate

student from Instituto de Microbiologia, UFRJ, and Maryrose Lavatori and Mariana de Sousa Lopes and Mr. Mitchell R Lishon for the language revision.

References

- Halstead SB: **Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology.** *Science* 1988, **239(4839)**:476-481.
- Monath TP: **Pathobiology of the Flaviviruses.** In *he Togaviridae and Flaviviridae* Edited by: Schlesinger SSMJ. New York, Plenum Press; 1986:375-440.
- Scott RM, Nisalak A, Cheamudon U, Seridhoranakul S, Nimmannitya S: **Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever.** *J Infect Dis* 1980, **141(1)**:1-6.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumppheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Bix DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA: **DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells.** *J Exp Med* 2003, **197(7)**:823-829.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Bix DL, Hayes CG, Frankel SS: **Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection.** *Nat Med* 2000, **6(7)**:816-820.
- Morens DM, Marchette NJ, Chu MC, Halstead SB: **Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease.** *Am J Trop Med Hyg* 1991, **45(5)**:644-651.
- Wang HL, Lin KH, Yueh YY, Chow L, Wu Y, Chen HY, Sheu MM, Chen WJ: **Efficient diagnosis of dengue infections using patients' peripheral blood leukocytes and serum/plasma.** *Intervirology* 2000, **43**:107-111.
- Azeredo EL, Reis SRIN, Zagne SMO, Miagostovich M, Nogueira RM, Kubelka CF: **Detection of dengue virus in peripheral mononuclear cells from patients using flow cytometry: Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brazil.** ;2003.
- 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)**:1411-1418.
- Rothman AL, Ennis FA: **Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever.** *Virology* 1999, **257(1)**:1-6.
- Guidotti LG, Chisari FV: **Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response.** *Annu Rev Immunol* 2001, **19**:65-91.
- Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, Nogueira RM, Miagostovich MP, Kubelka CF: **Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever.** *Immunobiology* 2001, **204(4)**:494-507.
- Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Lew R, Innis BL, Kurane I, Rothman AL, Ennis FA: **Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity.** *J Infect Dis* 1999, **179(4)**:755-762.
- Kurane I, Innis BL, Nisalak A, Hoke C, Nimmannitya S, Meager A, Ennis FA: **Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production.** *J Clin Invest* 1989, **83(2)**:506-513.
- Kurane I, Ennis FA: **Production of interferon alpha by dengue virus-infected human monocytes.** *J Gen Virol* 1988, **69 (Pt 2)**:445-449.
- Akaike TMH: **Nitric oxide and virus infection.** *Immunology* 2000, **101(3)**:300-308.
- Chen RF, Yeh WT, Yang MY, Yang KD: **A model of real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of Dengue-2 infections.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001, **30(1)**:1-7.
- Jiang H, Stewart CA, Leu RW: **Tumor-derived factor synergizes with IFN-gamma and LPS, IL-2 or TNF-alpha to promote macrophage synthesis of TNF-alpha and TNF receptors for autocrine induction of nitric oxide synthase and enhanced nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity.** *Immunobiology* 1995, **192(5)**:321-342.

19. Valero N, Espina LM, Anez G, Torres E, Mosquera JA: **Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66(6)**:762-764.
20. Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Jaeck D, Kirn A, Deubel V: **Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident.** *J Virol* 1999, **73(6)**:5201-5206.
21. Espina LM, Valero NJ, Hernandez JM, Mosquera JA: **Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68(1)**:48-53.
22. Reed LJ, Muench H: **A simple method of estimating fifty per cent endpoints.** *Am J Hyg* 1938, **27**:493-497.
23. Miagostovich MP, Nogueira RM, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG: **Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1993, **35(2)**:149-154.
24. Schoepp RJ, Beaty BJ: **Titration of dengue viruses by immunofluorescence in microtiter plates.** *J Clin Microbiol* 1984, **20(5)**:1017-1019.
25. Akarid K, Sinet M, Desforges B, Gougerot-Pocidallo MA: **Inhibitory effect of nitric oxide on the replication of a murine retrovirus in vitro and in vivo.** *J Virol* 1995, **69(11)**:7001-7005.
26. Sydow FF, Santiago MA, Neves-Souza PC, Cerqueira DI, Gouvea AS, Lavatori MF, Bertho AL, Kubelka CF: **Comparison of dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000, **95(4)**:483-489.
27. Cologna R, Rico-Hesse R: **American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells.** *J Virol* 2003, **77(7)**:3929-3938.
28. Benencia F, Courreges MC: **Nitric oxide and macrophage antiviral extrinsic activity.** *Immunology* 1999, **98(3)**:363-370.
29. Chen YC, Wang SY: **Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide.** *J Virol* 2002, **76(19)**:9877-9887.
30. Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC, Chen SH: **Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes.** *J Virol* 2002, **76(23)**:12242-12249.
31. Halstead SB, Porterfield JS, O'Rourke EJ: **Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera.** *Am J Trop Med Hyg* 1980, **29(4)**:638-642.
32. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A: **Inhibition of interferon signaling by dengue virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100(24)**:14333-14338.
33. Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD: **Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase.** *Science* 1993, **261(5127)**:1445-1448.
34. Yee LJ, Knapp S, Burgner D, Hennig BJ, Frodsham AJ, Wright M, Thomas HC, Hill AV, Thursz MR: **Inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) haplotypes and the outcome of hepatitis C virus infection.** *Genes Immun* 2004, **5(3)**:183-187.
35. Kreil TR, Eibl MM: **Nitric oxide and viral infection: NO antiviral activity against a flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection in vivo.** *Virology* 1996, **219(1)**:304-306.
36. Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Rohenadl C, Lowenstein JM, Lowenstein CJ: **Antiviral mechanisms of nitric oxide: inhibition of viral proteinase.** *Immunity* 1999, **10**:21-28.
37. MacLean A, Wei XQ, Huang FP, Al-Alem AH, Chan WL, Liew FY: **Mice lacking inducible nitric-oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 responses.** *J Gen Virol* 1998, **79**:825-830.
38. Chesler DA, Dodard C, Lee GY, Levy DE, Reiss CS: **Interferon-gamma-induced inhibition of neuronal vesicular stomatitis virus infection is STAT1 dependent.** *J Neurovirol* 2004, **10(1)**:57-63.
39. Sharara AI, Perkins DJ, Misukonis MA, Chan SU, Dominitz JA, Weinberg JB: **Interferon (IFN)-alpha activation of human blood mononuclear cells in vitro and in vivo for nitric oxide synthase (NOS) type 2 mRNA and protein expression: possible relationship of induced NOS2 to the anti-hepatitis C effects of IFN-alpha in vivo.** *J Exp Med* 1997, **186(9)**:1495-1502.
40. Lin YL, Huang YL, Ma SH, Yeh CT, Chiou SY, Chen LK, Liao CL: **Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication.** *J Virol* 1997, **71(7)**:5227-5235.
41. Wolkow PP: **Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock.** *Inflamm Res* 1998, **47(4)**:152-166.
42. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, et al.: **Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages.** *Blood* 1995, **86(3)**:1184-1195.
43. Denis M: **Human monocytes/macrophages: NO or no NO?** *J Leukoc Biol* 1994, **55(5)**:682-684.
44. Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME: **Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi.** *J Immunol* 2001, **167(2)**:893-901.
45. Jaramillo M, Naccache PH, Olivier M: **Monosodium urate crystals synergize with IFN-gamma to generate macrophage nitric oxide: involvement of extracellular signal-regulated kinase I/2 and NF-kappa B.** *J Immunol* 2004, **172(9)**:5734-5742.
46. Plum J, Huang C, Grabensee B, Schror K, Meyer-Kirchath J: **Prosta-cyclin enhances the expression of LPS/INF-gamma-induced nitric oxide synthase in human monocytes.** *Nephron* 2002, **91(3)**:391-398.
47. Perez-Mediavilla LA, Lopez-Zabalza MJ, Calonge M, Montuenga L, Lopez-Moratalla N, Santiago E: **Inducible nitric oxide synthase in human lymphomononuclear cells activated by synthetic peptides derived from extracellular matrix proteins.** *FEBS Lett* 1995, **357(2)**:121-124.
48. Imanishi N, Andoh T, Sakai S, Satoh M, Katada Y, Ueda K, Terasawa K, Ochiai H: **Induction of Inducible Nitric Oxide (NO) Synthase mRNA and NO Production in Macrophages Infected with Influenza A/PR/8 Virus and Stimulated with Its Ether-Split Product.** *Microbiol Immunol* 2005, **49(1)**:41-48.
49. Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT: **Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages.** *J Immunol* 1997, **159(12)**:6131-6139.
50. Keller CC, Kremsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Perkins DJ: **Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells.** *Infect Immun* 2004, **72(8)**:4868-4873.
51. Rimmelzwaan GF, Baars MMJW, Lijster P, Fouchier RAM, Osterhaus ADME: **Inhibition of influenza virus replication by nitric oxide.** *J Virol* 1999, **73**:8880-8883.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/5/64/prepub>

3) Terceiro artigo

Submetido ao Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

Correlation of serum neopterin levels with disease severity in dengue patients.

Manuscript Number: TRSTMH-D-08-00441

Manuscript Title: Correlation of serum neopterin levels with disease severity in dengue patients

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

Dear Ms Maria José Andrada-Serpa,

Your submission entitled "Correlation of serum neopterin levels with disease severity in dengue patients" has been assigned the following manuscript number: TRSTMH-D-08-00441.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/trstmh/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Caroline Scott

Editorial Office

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

Correlation of serum neopterin levels with disease severity in dengue patients.

Rogério Valls de Souza, MD, MSc^a; Doris Schor, MSc^b; Fernando A Bozza, MD, PhD^a; Rita M.R.Nogueira MD, PhD^c; Maria José Andrada-Serpa, MD, PhD^{b*}.

^aLaboratório de Pesquisa Clínica em Doenças Febris Agudas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

^bLaboratório de Pesquisa em Patogenia Viral, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

^cLaboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Running Title: Serum neopterin and dengue fever.

***Corresponding author:**

Maria José Andrada-Serpa, MD, PhD

E-mail: mariajose.aserpa@ipecc.fiocruz.br and mjaserpa@gmail.com

Laboratório de Pesquisa em Patogenia Viral

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz

Avenida Brasil, 4365 – Rio de Janeiro, Brazil

CEP 21045-900

Tel.:+55-21-38659543, Fax. +55-21-22266488

Abstract

Recent reports have demonstrated increased neopterin concentrations during acute viral infections; in addition few studies tried to correlate neopterin level to the severity of dengue fever. We now demonstrated persistent higher neopterin levels in severe dengue when compared to classical dengue fever. Serial serum neopterin determinations may be a biological marker for the detection of severe dengue fever.

Key words: Dengue; Neopterin; Disease severity; Risk factors.

Introduction

Dengue fever is an arthropod-borne infection caused by four antigenically related flaviviruses denominated serotypes 1 to 4 and spread by the *Aedes* mosquitoes. Globally, as many as 1 in 100 people are infected each year by one or more of dengue virus (DENV); its incidence has increased enormously in the past 50 years.¹ Half the world's population (3.5 billion of people) is estimated to be at risk for dengue infection in tropical and subtropical regions. In Brazil, the reintroduction of DENV occurred in the 1980s and approximately 4.5 million dengue cases have been reported between 1981 and 2006.² Since 1986, dengue has become a nationwide public health problem. The introduction of DENV-1 in 1986, DENV-2 in 1990 and DENV-3 in 2001 in the city of Rio de Janeiro, resulted in major epidemics that spread throughout the country.² Clinical manifestations of DENV infection range from a self-limited dengue fever (DF) with mild constitutional symptoms – arthralgia, myalgia and headache - to a more severe disease with marked thrombocytopenia, haemorrhagic manifestations and plasma leakage, known as dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). As the initial clinical manifestations of dengue infection are nonspecific and the World Health Organization (WHO) criteria for the case definition of DF, DHF and DSS³ has been criticized for its low sensitivity for the detection of severe cases^{4,5} the identification of prognostic markers for the development of severe disease would be greatly advantageous.

Neopterin production is closely associated with the activation of the immune system, and is elevated in a number of infectious, autoimmune and inflammatory states.⁶ Neopterin, a pteridine derivative, is produced by human

monocytes/macrophages when stimulated by interferon- γ . In the present study, we investigate whether serum neopterin concentrations are associated with the development of severe dengue disease.

Materials and methods

This study was approved by the Ethics Committees of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas and Instituto Oswaldo Cruz from Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil and a written informed consent was obtained from every enrolled patient. Samples were obtained from January 2001 to December 2006.

We studied 117 patients with the diagnosis of dengue infection confirmed either by virus isolation, serotype specific reverse transcription polymerase chain reaction or anti-dengue enzyme-linked immunoabsorbent assay IgM. This group was divided in 21 patients (7 male and 14 female, age range 19-73 years) with severe dengue fever defined by: a) hospital admission and; b) platelets count $<50\ 000/\text{mm}^3$ and/or; c) hypotension defined as postural hypotension with decrease in systolic arterial pressure of 20 mmHg in supine position and/or systolic arterial pressure <90 mmHg and/or; d) plasma leakage manifested as hemoconcentration, with a variation of $\geq 20\%$ of the hematocrit and/or clinical signs of pleural effusion or ascites and/or; e) internal hemorrhage⁷, and 96 patients (56 male and 40 female, age range 14-70 years) with dengue fever as defined by the WHO criteria³ attended in outpatient clinics in Rio de Janeiro. Forty-one serum samples from blood donors (21 male and 20 female) were used as control group. Paired sera samples were obtained from 65 patients with dengue fever. Acute phase serum samples were defined as those collected

from the 1st to 5th day of fever onset, convalescent phase serum samples were those collected after 5th day of disease and defervescence samples were those collected in the interval between the 6th and 10th day of disease onset. The severe cases here reported are part of a study on dengue clinical manifestations and cytokine profile previously published ⁸.

Neopterin sera levels were determined using a commercially available immunoassay kit (IBL, Hamburg, Germany) according to manufacturer's instructions. The limit of detection was 0.32 to 0.50 nmol/L, and the reference level for health individuals was less than 10 nmol/L.

Statistical analysis was performed with Statistical Package for Social Science (SPSS). Nonparametric Mann-Whitney *U* and Kruskal-Wallis tests were used to assess differences in neopterin levels among patient's groups. Fisher exact test was used to evaluate the presence of thrombocytopenia, hemorrhagic manifestations and hypotension between DF and severe dengue disease. Correlation analyses were performed calculating Spearman rank correlation coefficients. A two-tailed $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

All patients were above 14 years of age and no difference was observed among the groups except for the severe dengue fever group where 2/3 of the patients were female. All patients with severe dengue disease were attended during the period of isolated DENV-3 circulation in the metropolitan area of Rio de Janeiro, i.e. 2002-2006 and patients with dengue fever had the three serotypes spread in Brazil. Platelets $\leq 50\,000/\text{mm}^3$ were more frequent among severe dengue

fever patients', as well as the presence of hemorrhagic manifestations and hypotension. Table 1 summarizes demographic, clinical and, laboratorial data.

All dengue patients had neopterin levels above control group in acute and convalescent serum samples ($p < 0.001$) (figure 1A and 1B).

A significant difference was found when acute phase serum neopterin levels of samples from dengue fever and severe dengue fever were compared with the control group serum (Kruskal-Wallis $p < 0.01$). However, no significant difference was observed in acute phase neopterin serum levels between patients with severe dengue and dengue fever (table 1, figure 1A). On the other hand, in convalescent phase, specifically, in serum samples collected from 6th to 10th of disease onset, i.e., in deffervescence, neopterin levels in patients with severe dengue fever continued elevated, with statistically significant difference when compared with dengue fever outpatients (table 1 and figure 2B).

A significant inverse correlation was found between neopterin level and platelets count in the acute phase ($r_s = -0.254$ $p < 0.05$) and in convalescence ($r_s = -0.421$ $p < 0.01$).

The kinetics of serum neopterin determinations (figure 2A) showed higher neopterin levels between the first and fifth days of disease; normal concentration were obtained after the 10th day of fever onset.

Discussion

Our results show a correlation between serum neopterin levels and dengue infection during the acute phase of the disease. In deffervescence phase, higher neopterin levels were found in severe dengue cases in relation to classical dengue fever cases.

The development of DHF has been associated with elevated levels of cytokines and activation of complement⁹. High levels of neopterin in the acute phase are expected in a disease characterized by early mononuclear cells activation⁷. Previous report on kinetics of neopterin release in dengue patients¹⁰ showed that high levels are observed since the first day of fever and then decrease after the fourth to fifth day of disease onset; also a short report on 9 patients with DHF/DSS, demonstrated that after the fifth day of disease, severe cases do show levels of neopterin higher than milder ones¹¹. The serum levels of neopterin in severe dengue cases in this study, are consistent with results of higher interferon- γ in these patients as previously reported by our group⁸. The description by Wang et al.¹² of a higher viral load and a slower viral clearance resulting in a prolonged state of immune activation in patients with greater disease severity, also corroborate the higher neopterin levels in deffervescence in these cases. Although a small number of patients were analyzed in this study, the results here presented put in perspective previous studies on neopterin kinetics in dengue patients, showing the correlation of its serum levels and acute dengue infection and the presence of higher levels in severe dengue infection in relation to classical dengue fever, during deffervescence.

Authors' contributions

RVS and MJAS conceived the research idea and designed the study; DS performed the neopterin quantification; RMRN performed dengue diagnosis; RVS and FAB carried out clinical assessment; RSV, FAB and MJAS analyzed and interpreted the data; RSV, FAB and MJAS drafted the manuscript. RVS and MJAS are guarantors of the paper.

Funding

This study was partially supported by the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), the Brazilian Ministry of Health, and the Brazilian National Research Council (CNPq).

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Ethical approval

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Instituto de Pesquisa Evandro Chagas and Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

References

1. Kyle JL, Harris E. Global Spread and Persistence of Dengue. *Annu Rev Microbiol* 2008; **62**:71-92

2. Nogueira RM, de Araujo JM and Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica* 2007; **22**:358-63
3. World Health Organization Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva :. 1997
4. Deen JL, Harris E, Wills B, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 2006; **368**:170-3.
5. Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, et al. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005;**73**:1059-62
6. Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther* 2001; **26**:319-29
7. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis* 1999;**179**:755-62
8. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* 2008; **8**:86
9. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 2006;**193**:1078-88
10. Chan CP, Choi JW, Cao KY, et al. Detection of serum neopterin for early assessment of dengue virus infection. *J Infect* 2006; **53**:152-8
11. Babb K, Carrington CV and Monteil MA. A preliminary study of neopterin as a potential marker for severe dengue virus infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; **93**:447-8

12. Wang WK, Chen HL, Yang CF, et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 2006; **43**:1023-30

Table 1**Demographic, clinical and, laboratorial data.**

Characteristic	Dengue fever	Severe dengue	
Sex (F/M)	40/56	14/7	
Age (mean ± SD)	32.8 ± 16	41.3 ± 18.1	
Dengue virus (N)	DENV-1 (3); DENV-2 (4); DENV-3 (64)	DENV-3	
Platelets ≤ 100 000/mm ³ (%)	33 (38.4)	16 (79.2)	<i>p</i> <0.01*
Platelets ≤ 50 000/mm ³ (%)	8 (9.3)	12 (52.1)	<i>p</i> <0.01*
Hemorrhagic manifestations (%)	9 (9.4)	15 (71.4)	<i>p</i> <0.01*
Hypotension (%)	0	8 (38.1)	<i>p</i> <0.01*
Neopterin (nmol/L)			
Acute phase (median level)	34.4	20.2	<i>P</i> =0.18**
Convalescent phase (median level)	10.4	23.2	<i>p</i> <0.01**

* Fisher exact test, ** Mann-Whitney test

Figure 1

Box plots of serum neopterin concentrations in severe dengue fever, DF and control group. Serum samples were divided in (A) acute phase (1st to 5th day of disease) and (B) convalescent phase (6 or more days).

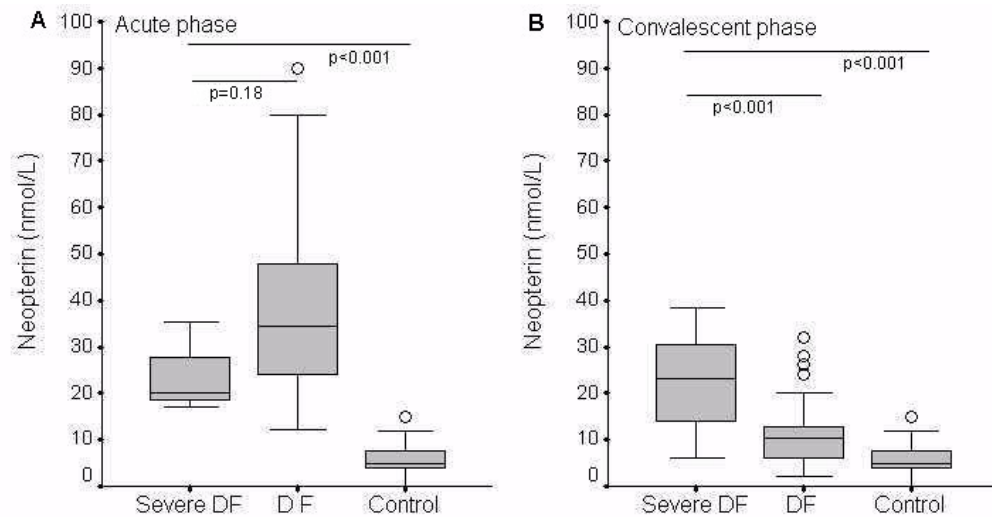
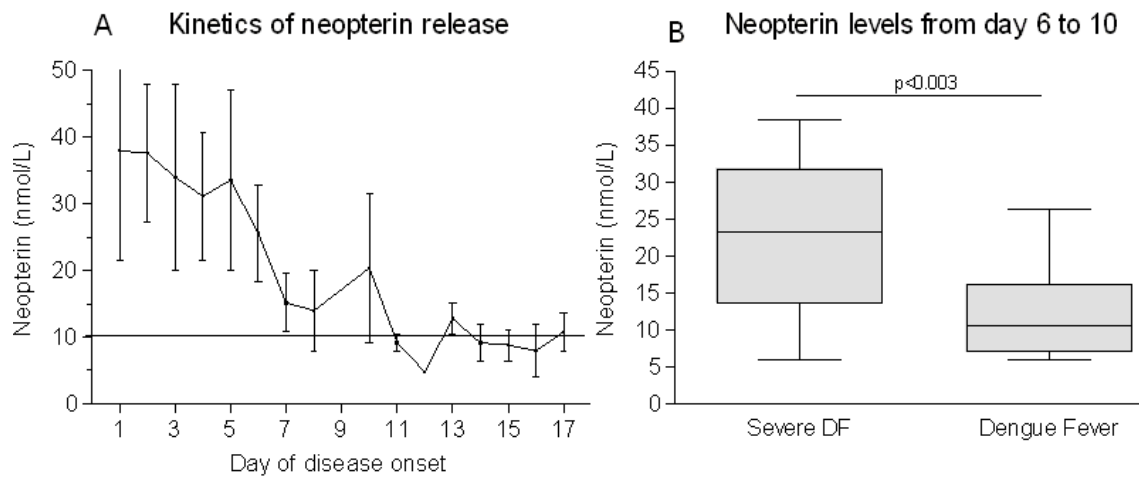


Figure 2

(A) Kinetics of neopterin release (mean and \pm SEM) according to the day after the onset of disease. (B) Box plot of serum neopterin concentrations of samples collected between the 6th and 10th days after the onset of symptoms. The difference between the two groups is statistically significant (Mann-Whitney).



4) Quarto artigo

Artigo a ser submetido.

Aspectos clínicos e laboratoriais relacionados à introdução de Dengue 1, 2 e 3, no Estado do Rio de Janeiro.

Artigo a ser submetido

Aspectos clínicos e laboratoriais relacionados à introdução dos vírus dengue 1, 2 e 3 na cidade do Rio de Janeiro.

Rogério Valls de Souza¹, Keyla Belizia Feldman Marzochi¹, Rita Nogueira², Elizabeth Lampe³, Ingebourg Georg⁴, Maria José de Andrada-Serpa⁵

¹Laboratório de Pesquisa em Doenças Febris Agudas, Instituto de pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ

²Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

³Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

⁴Setor de Imunodiagnóstico, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ

⁵Laboratório de Pesquisa em Patogenia Viral, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ

Título corrido: Aspectos clínicos e laboratoriais relacionados a três sorotipos de vírus dengue.

Palavras-chaves: Dengue, sorotipos, resposta imune, quadro clínico e laboratorial.

Correspondência:

Rogério Valls de Souza, MD

Laboratório de Pesquisa em Doenças Febris Agudas, Instituto de pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ.

Av. Brasil 4365, Manguinhos

Rio de Janeiro

Email: rogerio.valls@ipecc.fiocruz.br e rogeriovalls@superig.com.br

Resumo

Os vírus Dengue tipo 1, 2 e 3 (DENV-1, 2 e 3) atualmente endêmicos no Brasil, foram introduzidos inicialmente no Estado do Rio de Janeiro (RJ), de forma seqüencial, resultando em três grandes epidemias. A introdução seqüencial dos sorotipos virais de dengue possibilitou descrever o perfil clínico laboratorial relacionado a cada vírus Dengue, assim como correlacionar esse perfil à resposta imune, descrita como o principal mecanismo patogênico das formas graves de dengue. Foram analisados os registros médicos de 403 pacientes, atendidos no período de 1986 a 2002. Infecção por DENV-1 foi definida em 198 pacientes, infecção por DENV-2 em 77 casos e infecção por DENV-3 em 67 pacientes. A distribuição por sexo não apresentou diferença no período estudado, porém, a média de idade foi maior no período de maior circulação de DENV-2, no entanto, média situou-se entre 30-40 anos nos três períodos. Os sinais e sintomas mais freqüentes foram os associados à definição de febre da dengue como febre, cefaléia, mialgia, artralgia, prostração, anorexia e náuseas. Manifestações clínicas de maior gravidade foram observadas nos pacientes com diagnóstico de infecção por DENV-2, que apresentaram uma maior proporção de manifestações hemorrágicas e de dor abdominal. Observamos agravamento das manifestações clínicas com a circulação de DENV-2 e DENV-3, com maior freqüência de hemorragias, trombocitopenia e de alteração das provas de função hepática. De forma interessante, esse agravamento só se correlacionou com a presença de resposta imune secundária, no período de circulação de DENV-2, enquanto que, no ano de 2002, nos casos com isolamento de DENV-3, observamos as mesmas alterações predominando na resposta imune do tipo primário. O presente estudo descreve um agravamento do quadro clínico e laboratorial relacionado à introdução seqüencial dos vírus DENV-1,2 e 3 no Estado do Rio de Janeiro, assim como confirma as observações de autores nacionais e internacionais, do potencial patogênico da infecção por DENV-3, mesmo em infecções primárias por esse flavivírus.

Introdução

Os vírus de Dengue tipo 1, 2 e 3 (DENV-1, 2 e 3), atualmente endêmicos no Brasil, foram introduzidos inicialmente no Estado do Rio de Janeiro (RJ), de forma sequencial, resultando em três grandes epidemias (1). A introdução no Rio de Janeiro do vírus DENV-1, no ano de 1986, ocorreu em uma população, na qual inquéritos sorológicos haviam demonstrado a ausência de circulação prévia de flavivírus (2, 3). Nessa epidemia a taxa de isolamento viral foi elevada, atingindo 80% nos casos confirmados, que tiveram amostras processadas até o quarto dia de doença (4). Apesar da ocorrência de 91.862 casos, foi notificado apenas 1 óbito, embora estudos posteriores, em material de autópsia, tenham confirmado outros cinco casos fatais (5). O segundo período epidêmico de 1990-1991, correspondeu à circulação de vírus Dengue tipo 2 (DENV-2), o primeiro caso de febre hemorrágica do dengue (FHD) no Brasil, foi notificado durante essa epidemia (6), que registrou 105.576 casos, dos quais 462 de FHD e 8 casos fatais (7). O estudo sequencial da epidemia (8) mostra que ocorreram duas alças epidêmicas, a primeira no período de janeiro a julho de 1990 quando predominou a circulação de DENV-1, com manifestações clínicas semelhantes às observadas na primeira epidemia, enquanto que na segunda alça, houve o predomínio de DENV-2, o qual foi o único sorotipo isolado durante o ano de 1991. Nesse período foram notificados a quase totalidade dos casos de FHD observados durante essa epidemia (9).

O último sorotipo introduzido no Rio de Janeiro foi o DENV-3, detectado janeiro de 2001 (10). Durante o ano de 2001 houve a co-circulação com DENV-1 e DENV-2, porém, a partir de outubro 2001, com a elevação da temperatura média e das chuvas, devido à aproximação do verão, houve um aumento do número de casos associado à circulação do sorotipo 3. Realmente, o DENV-3 foi o principal sorotipo associado à epidemia de 2002, detectado em 321 dos 324 casos confirmados por isolamento viral ou pelo teste da reação em cadeia da polimerase (11). Os casos não relacionados ao sorotipo 3, isto é, DENV-1 em 2 casos e DENV-2 em 1 caso, foram isolados em janeiro de 2002, e um caso de DENV-1 foi proveniente de Município distante 280 km da área metropolitana.

O objetivo desse estudo é descrever o perfil clínico laboratorial relacionado à introdução dos três sorotipos de vírus Dengue no Estado Rio de Janeiro, assim como correlacionar esse perfil à resposta imune, descrita como o principal mecanismo patogênico das formas graves de dengue (12).

Material e Métodos

População estudada

Foram analisados os registros médicos de 403 pacientes, atendidos em uma unidade ambulatorial, no período de 1986 a 2002, nos quais foi possível resgatar dados clínicos e laboratoriais conforme rotina pré-estabelecida e que apresentassem pelo menos um dos seguintes critérios: a) diagnóstico de dengue por isolamento viral e/ou b) confirmação por sorologia, caso apresentassem o seguinte critério de gravidade: trombocitopenia (plaquetas $\leq 100000/\text{mm}^3$), hipotensão arterial ou hemorragia interna. Os dados clínicos e laboratoriais foram inseridos em um banco de dados. Todos os pacientes apresentavam diagnóstico clínico de dengue de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde: febre de curta duração, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaléia, dor retrorbital, mialgia, artralgia, prostração e/ou exantema. A infecção pelo vírus dengue foi confirmada por quaisquer dos seguintes métodos: a) ensaio imunoenzimático para a captura de IgM específica, MAC-ELISA, feito *in-house*, no período 1986 a 1991, sendo utilizado ainda na epidemia de 2001-2002 em conjunto com o kit da PanBio (Brisbane, Austrália) (11); b) por dosagem de IgG pelo método de Inibição da Hemaglutinação (HI) (13), no período de 1990/1991, ou por IgG ELISA, nos anos 2001-2002, conforme previamente descrito (14). O sorotipo viral foi determinado por isolamento viral em células de mosquito C6/36, com posterior identificação com anticorpos monoclonais.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Definições utilizadas

Utilizamos o seguinte critério virológico/epidemiológico de infecção por dengue: a) foi definido como infecção por DENV-1, todo paciente atendido nos anos 1986-1987, e com isolamento viral positivo para esse sorotipo; b) o diagnóstico de DENV-2 foi definido por isolamento viral e/ou ter sido atendido em 1991, período em que foi detectada apenas a circulação de DENV-2 na área metropolitana da cidade do Rio de Janeiro e, c) foi definido com infecção por DENV-3, todos os casos com isolamento desse vírus Dengue e/ou atendimento no ano de 2002.

A resposta imune primária foi definida pela ausência de IgG na primeira amostra de sangue colhida até o 5º dia de doença e/ou títulos de anticorpos $\leq 1/1280$ por HI ou,

$\leq 1/40.960$ por IgG ELISA, na amostra coletada na convalescença. Resposta imune secundária foi definida como a presença de IgG em amostra coletada até o 5º dia de doença e/ou títulos de anticorpos na convalescença $\geq 1/2.560$ por HI ou, $\geq 1/163.840$ na convalescença por IgG ELISA (8, 14).

O diagnóstico virológico foi definido como os casos com isolamento positivo, por cultivo em células de mosquito e caracterização do sorotipo por anticorpos monoclonais. A presença de trombocitopenia, hemoconcentração e/ou hipotensão arterial foram considerados critérios de gravidade de doença. Dias de doença foi definido como o número de dias do início dos sintomas ao dia do atendimento médico.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa Statistics Package for Social Science versão 11. A comparação entre os grupos nas variáveis categóricas foi feita utilizando o teste de qui-quadrado, enquanto as variáveis contínuas foram analisadas por testes paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Pelos critérios estabelecidos, a infecção por vírus Dengue 1 foi definida em 198 pacientes, infecção por Dengue 2 em 77 casos e infecção por Dengue 3 em 67 pacientes. A distribuição por sexo não apresentou diferença no período estudado, porém, a média de idade foi maior no período de maior circulação de DENV-2, isto é, 1990-1991, nos três períodos, no entanto, a média situou-se entre 30-40 anos (tabela 1). Os sinais e sintomas mais frequentes foram os associados à definição de febre da dengue como febre, cefaléia, mialgia, artralgia, prostração, anorexia e náuseas. Manifestações clínicas de maior gravidade foram observadas nos pacientes com diagnóstico de infecção por DENV-2, que apresentaram uma maior proporção de manifestações hemorrágicas e de dor abdominal (tabela 1). Foi também mais freqüente nesse grupo, o exantema. A presença de prurido e vômitos, apesar de mais freqüente nos pacientes com infecção por DENV-2 e 3, não alcançou significância estatística, os demais sinais e sintomas tiveram uma distribuição homogênea na infecção pelos três sorotipos (tabela 1).

Ocorreram 28 internações hospitalares, 89,3% (25/28) no período de circulação de DENV-2, 14 por hipotensão arterial/choque, porém, como durante a epidemia por DENV-3 a unidade de internação encontrava-se parcialmente desativada, não foi possível fazer uma análise comparativa.

Os exames complementares, na fase aguda (tabela 2), foram em média realizados nos primeiros três dias de febre, porém, a média nos casos de DENV-1, de 2,47 ($\pm 1,36$) apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos demais sorotipos. Foram detectadas, alterações das enzimas hepáticas, nas infecções pelos três sorotipos, porém, com valores médios mais elevados nos pacientes com infecção por DENV-2 e DENV-3, em relação à infecção por DENV-1. O hematócrito no período febril apresentou uma média mais elevada nos pacientes com infecção por DENV-2 em relação à DENV-3, porém, hemoconcentração superior a 20% foi observada somente em um reduzido número de pacientes, 13 casos no total. Com a utilização de um critério mais abrangente de hemoconcentração (10%), não houve diferença significativa entre os três tipos virais. Outras alterações laboratoriais observadas na fase aguda foram leucopenia e linfopenia nos casos associados à DENV-3 (tabela 2). Neutropenia (neutrófilos totais $\leq 2.000/\text{mm}^3$) foi detectada em 111 casos (35%), apresentando distribuição homogênea nos três sorotipos, porém, no período febril, os casos associados à DENV-3 apresentaram um percentual de formas jovens de neutrófilos, significativamente maior do que o observado nos outros vírus. Pacientes com DENV-3 apresentaram uma contagem de plaquetas significativamente inferior aos outros vírus (figura 1). A ocorrência de trombocitopenia foi rara nos pacientes com infecção por DENV-1 (3/197 casos), porém, a partir da introdução de DENV-2 tornou-se um evento freqüente 35/77 casos (45,5%), e no período epidêmico associado à circulação de DENV-3, esteve presente em 37/67 (55,2%) dos casos ($p < 0,05$).

Na fase de convalescença nos casos com infecção por DENV-3, níveis inferiores de contagem de leucócitos, neutrófilos e de plaquetas, provavelmente devido ao intervalo significativamente menor entre a primeira e segunda coleta do hemograma nesse grupo, 3,96 ($\pm 4,18$) dias, contra uma média de 18,03 ($\pm 14,76$) dias, nos demais grupos.

Foi possível definir o tipo de resposta imune em 286 pacientes. Os pacientes com infecção por DENV-1 e isolamento viral em 1986-1987 foram considerados como infecção primária, 198 casos, além desses, houve 11 casos com infecção primária e 1 com infecção secundária nas epidemias subseqüentes definidas por dosagem de IgG. Houve isolamento de DENV-2 em 50 pacientes no período 1990 a 2001, e foi possível definir a resposta imune em 18/19 (94,7%) como secundária e um como primária. Em relação a DENV-3, houve 50 isolamentos nos casos atendidos em 2001-2002, desses 16 (76,2%) apresentaram resposta primária e 5 (23,8%) secundária, em um total de 21

pacientes. Os casos com infecção secundária apresentam uma média de idade mais elevada, 41,57 (\pm 17,08) em relação aos casos com resposta primária 32,47(\pm 14,00).

Os vômitos e dor abdominal foram mais freqüentes nos casos com infecção secundária, os demais sinais e sintomas tiveram distribuição sem diferença significativa entre os dois grupos (tabela 3). Com relação aos exames laboratoriais (tabela 4), a média de linfócitos totais na fase aguda foi significativamente mais baixa nos casos com resposta primária, enquanto a elevação de aspartato aminotransferase (AST) e trombocitopenia foram mais freqüentes nos casos com infecção secundária. Na fase de convalescença observou-se uma contagem média mais elevada de linfócitos na resposta imunológica secundária, enquanto os demais itens do hemograma convergiram para uma média próxima à normalidade nos dois grupos.

Considerando que, as definições de infecção por sorotipo de vírus Dengue e de períodos epidêmicos se superpõem as análises por anos epidêmicos, como esperado, não apresentaram resultados diferentes dos já relatados nas análises por circulação de vírus (dados não mostrados).

Discussão

Apesar da infecção por um segundo sorotipo ser muito referida na literatura sobre imunopatogenia, temos poucos trabalhos comparando as manifestações clínicas e laboratoriais de pacientes com infecção primária e secundária. Esse estudo confirma observações anteriormente publicadas (8, 11) do agravamento do perfil clínico-laboratorial da dengue no Estado do Rio de Janeiro, a partir da introdução dos sorotipos 2 e 3 em 1990 e 2001 respectivamente, assim como discute aspectos clínicos e laboratoriais associados à resposta imune da infecção por flavivírus, que colocam em perspectiva à relação entre infecção secundária e a patogenicidade dos vírus dengue.

Observamos que a presença de sinais e sintomas associados aos sinais de alerta definidos por autores cubanos e presentes em guias de diagnóstico e tratamento (15) como vômitos, dor abdominal e hemorragias, foram mais freqüentes na resposta imune secundária e na infecção por DENV-2 (tabelas 1 a 4). Esse dado está em acordo com estudo recente, realizado na Martinica, em que os autores comparam infecção por DENV-2 e DENV-4, assim como a resposta imune e demonstram que os sintomas gastrointestinais e hemorragias, correlacionam-se com isolamento de DENV-2 e resposta imune secundária (16). É interessante destacar a variação dos sinais e sintomas observados durante a mesma epidemia de 2002 no Rio de Janeiro, pelos diversos

grupos, algumas vezes de forma paradoxal, como no caso de dor abdominal, que em um estudo houve associação com o diagnóstico de dengue (17), enquanto outro grupo considerou a ausência desse sintoma como um dos critérios de diagnóstico clínico (18). Esse fato demonstra a necessidade de avaliar a qualidade do dado clínico utilizado, que no último caso, parece estar produzindo um viés estatístico que resulta nesse tipo de conclusão. Em acordo com os dois grupos citados, a presença de exantema foi detectada em elevada proporção de pacientes, porém, na nossa casuística esteve associada à DENV-2, enquanto que, o prurido não apresentou associação à resposta imune ou à circulação viral no período.

Os dados virológicos mostraram uma correlação já mencionada na literatura, entre a resposta imune e o sorotipo de vírus dengue, em especial com relação ao DENV-2, cujo isolamento ocorreu em maior proporção nos casos de infecção secundária (19) (8), enquanto o isolamento de DENV-3 esteve mais associado à infecção primária, mesmo em áreas hiperendêmicas como o Sudeste da Ásia (20). No Brasil a associação de infecção primária e isolamento de DENV-3, foi superior a 50%, mesmo entre os casos fatais (11) (1), experiência semelhante à descrita por Harris e col. na Nicarágua (21) o que sugere não ser a resposta imune um mecanismo importante na imunopatogenia do genótipo III de DENV-3 em circulação nas Américas.

Alterações laboratoriais, na fase aguda, expressaram repercussões sistêmicas mais graves no período de circulação de DENV-2 e DENV-3, com alteração das provas de função hepática nos dois sorotipos. Na resposta imune secundária observou-se elevação significativa apenas de AST, a elevação das transaminases, e em particular da AST é relatada na literatura como um marcador de infecção por vírus Dengue, assim como de gravidade (22) (23). De forma semelhante, Thomas e col. (16) observou a elevação de transaminases relacionada a resposta imune secundária e à infecção por DENV-2. A leucopenia foi mais intensa no período de circulação de DENV-1 e DENV-3, o que sugere uma correlação com a resposta imune primária, mencionado por alguns autores (24), porém, em nossa série de casos, não houve diferença significativa. Por outro lado, a presença de linfopenia mais acentuada na infecção primária foi também descrita no estudo de Thomas e col. (16) sendo observada na nossa casuística nos períodos de circulação de DENV-1 e DENV-3. Halstead e col. (25) relataram desvio para esquerda no hemograma de pacientes na fase aguda da doença, em nosso estudo resultados semelhantes foram observados somente no período de circulação de DENV-3. Os neutrófilos totais mostraram-se diminuídos, porém, de forma homogênea em

relação à resposta imune e o sorotipo circulante. Na literatura encontramos relato de neutropenia mais acentuada em casos de infecção secundária (16).

A introdução de DENV-2 e DENV-3 resultou em uma grande proporção de casos com trombocitopenia, que de forma geral se correlacionou com os sintomas de maior gravidade, assim como com a resposta imune, como extensamente documentado na literatura (4) (14).

O presente estudo descreve um agravamento do quadro clínico e laboratorial relacionado à introdução seqüencial dos vírus DENV-1,2 e 3 no Estado do Rio de Janeiro, assim como confirma as observações de autores nacionais e internacionais, do potencial patogênico da infecção por DENV-3, mesmo em infecções primárias por esse flavivírus.

Conflito de interesse: Os autores atestam não terem nenhum conflito.

Agradecimentos: Os autores agradecem aos servidores do laboratório de análise clínica pela realização dos exames laboratoriais.

Apoio financeiro: CNPq, Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.

Referências

1. Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007 Nov;22(5):358-63.
2. Figueiredo LT, Cavalcante SM, Simoes MC. Dengue serologic survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Organ*. 1990;24(2):217-25.
3. De Paula Pinheiro F, Schatzmayr H, De Andrade Travassos Da Rosa AP, Homma A, Bensabath G. Arbovirus antibodies in children of rural Guanabara, Brazil. *Intervirology*. 1975;5(1-2):93-6.
4. Miagostovich MP, Nogueira RM, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993 Mar-Apr;35(2):149-54.

5. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araujo ES, de Filippis AM, et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 May-Jun;94(3):297-304.
6. 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 Apr-Jun;86(2):269.
7. Siqueira JB, Jr., Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jan;11(1):48-53.
8. 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 Aug;111(1):163-70.
9. Zagne SM, Alves VG, Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Tavares W. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 Nov-Dec;88(6):677-9.
10. Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Oct;96(7):925-6.
11. Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*. 2005 Sep;11(9):1376-81.
12. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007 Nov 10;370(9599):1644-52.
13. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1958 Sep;7(5):561-73.
14. Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ES, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol*. 1999 Dec;14(3):183-9.
15. P.A.H.O. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the americas: guidelines for prevention and control. Washington, D.C.: Pan American Health Organization; 1994. p. 62-6.
16. Thomas L, Verlaeten O, Cabie 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 Jun;78(6):990-8.

17. Passos MN, Santos LM, Pereira MR, Casali CG, Fortes Bde P, Ortiz Valencia LI, et al. Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidemic of 2001/2002, occurred in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004 Jul-Aug; 37(4):293-5.
18. Passos SR, Bedoya SJ, Hokerberg YH, Maia SC, Georg I, Nogueira RM, et al. Clinical and Laboratory Signs as Dengue Markers During an Outbreak in Rio de Janeiro. *Infection.* 2008 Nov 19.
19. Anantapreecha S, Chanama S, A An, Naemkhunthot S, Sa-Ngasang A, Sawanpanyalert P, et al. Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol Infect.* 2005 Jun;133(3):503-7.
20. 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 Feb;68(2):191-202.
21. Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jul-Aug;63(1-2):5-11.
22. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* 1997 Aug;176(2):313-21.
23. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, Cheng JT. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Nov;101(11):1106-13.
24. Kuberski T, Rosen L, Reed D, Mataika J. Clinical and laboratory observations on patients with primary and secondary dengue type 1 infections with hemorrhagic manifestations in Fiji. *Am J Trop Med Hyg.* 1977 Jul;26(4):775-83.
25. Halstead SB. Dengue: hematologic aspects. *Semin Hematol.* 1982 Apr;19(2):116-31.

Tabela 1: Dados demográficos, e presença de sinais e sintomas de acordo com o tipo de vírus dengue.

Dados	Tipo de vírus dengue			Total	χ^2	p
	Denv-1 N (%)	Denv-2 N (%)	Denv-3 N (%)			
Sexo Feminino	95 (48)	40 (51,9)	33 (49,3)	168 (50,9)	0,35	0,84
Masculino	103 (52)	37 (48,1)	34 (50,7)	174 (49,1)		
Idade (média) (em anos)	32,1	40,3	33,2	-		<0,01*
Febre	198 (100)	76 (98,7)	67 (100)	341	3,45	0,17
Cefaléia	190 (96)	74 (96,1)	65 (97)	329	0,15	0,92
Dor retrorbitária	146 (74,1)	53 (68,8)	47 (72,3)	246	0,77	0,67
Mialgia	172 (87,8)	73 (94,8)	58 (86,6)	303	3,39	0,18
Artralgia	146 (73,7)	54 (70,1)	52 (78,8)	252	1,38	0,50
Prostração	175 (88,4)	66 (85,7)	53 (79,1)	294	3,57	0,16
Exantema	47 (23,7)	29 (37,7)	16 (24,2)	92	5,76	<0,05
Prurido	64 (32,3)	31 (41,3)	18 (46,2)	113	3,81	0,14
Anorexia	162 (81,8)	66 (85,7)	47 (88,7)	275	1,71	0,42
Náuseas	141 (71,2)	57 (76)	49 (84,5)	247	4,26	0,11
Vômitos	77 (38,9)	36 (46,8)	23 (52,3)	136	3,38	0,18
Dor abdominal	6 (3,1)	16 (20,8)	8 (12,9)	30	22,0	<0,01
Hemorragias diversas	39 (19,7)	35 (45,5)	6 (9,1)	80	29,9	<0,01
Trombocitopenia [#]	3 (1,5)	35 (45,5)	37 (55,2)	75	114,4	<0,01

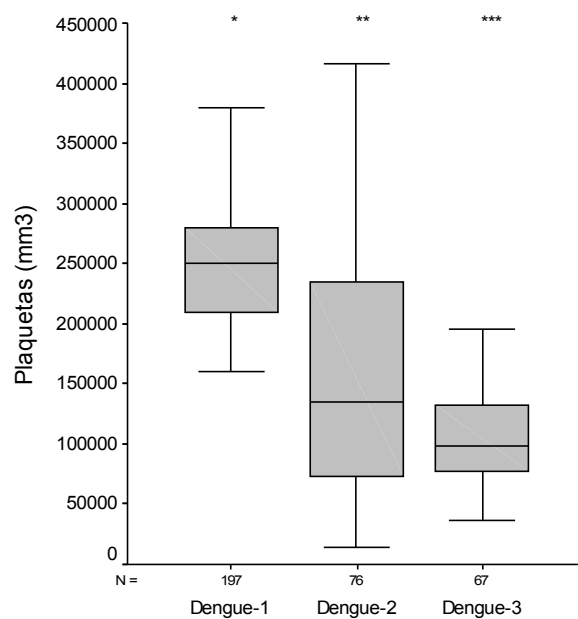
χ^2 Qui-quadrado, * ANOVA, [#]Contagem de plaquetas < 100.000/mm³

Tabela 2: Dados laboratoriais na fase de doença aguda de acordo com o tipo de vírus

Dados	Vírus	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	<i>p</i>*
Dias de doença	DENV-1	2,47	1,36	1	9	<0,01
	DENV-2	4,26	1,83	1	8	
	DENV-3	3,37	1,99	1	8	
AST (U/L)	DENV-1	41,6	32,1	3	190	<0,01
	DENV-2	80,6	153,8	15	920	
	DENV-3	97,9	113,0	24	498	
ALT (U/L)	DENV-1	34,6	31,8	2	160	<0,01
	DENV-2	57,4	54,5	16	360	
	DENV-3	70,2	58,1	15	245	
Hematócrito (%)	DENV-1	43,2	4,3	32	56	<0,01
	DENV-2	44,2	4,1	32	55	
	DENV-3	42,2	3,7	35	51	
Leucócitos (mm ³)	DENV-1	4.310	1.891,1	1.100	12.200	<0,01
	DENV-2	4.804	2.003,6	1.300	11.500	
	DENV-3	3.688	1.611,3	1.500	10.100	
Linfócitos (mm ³)	DENV-1	1.325	946,6	209	6.292	<0,01
	DENV-2	1.749	1.383,5	290	6.534	
	DENV-3	1.224	1.153,9	168	7.070	
Plaquetas (mm ³)	DENV-1	246.431	45.194	17.000	380.000	<0,01
	DENV-2	156.730	98.889	14.500	416.000	
	DENV-3	109.567	46.768	36.000	273.000	

* ANOVA; AST: Aspartato aminotransferase, ALT Alanina aminotransferase

Figura 1



Representação da contagem de plaquetas na fase aguda de acordo com o tipo viral (*comparação entre os sorotipos $p < 0,05$ ANOVA, ** e *** $p < 0,05$ na comparação entre os diferentes sorotipos t-Student).

Tabela 3: Dados demográficos e presença de sinais e sintomas clínicos de acordo com o tipo de resposta imunológica.

Dados	Resposta imunológica		Total	χ^2	p
	Primária N (%)	Secundária N (%)			
Ano 1986/87	198 (83,2)	-	198	143,4	<0,01
1990/91	10 (4,2)	26 (54,2)	36		
2001/02	30 (12,6)	22 (45,8)	52		
Total	238	48	286		
Sexo Feminino	112 (47,1)	24 (50,0)	136	0,14	0,41
Masculino	126 (52,9)	24 (50,0)	150		
Dor retroorbitária	176 (74,9)	30 (62,5)	206	3,48	0,17
Mialgia	207 (87,7)	46 (95,8)	253	2,71	0,12
Artralgia	176 (74,3)	36 (75,0)	212	0,01	0,91
Prostração	206 (86,6)	41 (85,4)	247	0,04	0,82
Exantema	60 (25,3)	17 (35,4)	77	2,06	0,15
Prurido	81 (35,7)	17 (37,8)	98	0,07	0,79
Anorexia	190 (82,3)	44 (91,7)	234	2,60	0,11
Náuseas	164 (70,7)	32 (74,4)	194	0,25	0,62
Vômitos	87 (38,0)	26 (56,5)	113	5,43	<0,05
Dor abdominal	11 (4,8)	12 (25,0)	23	21,12	<0,01
Hemorragias diversas	45 (19,0)	14 (29,2)	59	2,52	0,11
Trombocitopenia [#]	23 (9,7)	29 (60,4)	52	69,2	<0,01

χ^2 Qui-quadrado, [#]Contagem de plaquetas < 100.000/mm³

Tabela 4: Dados laboratoriais na fase de doença aguda de acordo com o tipo de infecção.

Dados	Infecção	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	p*
AST (U/L)	Primaria	192	41,2	31,1	3	190	<0,01
	Secundária	27	120,9	232,2	17	920	
ALT (U/L)	Primaria	191	35,0	31,9	2	160	0,053
	Secundária	25	48,1	28,3	20	130	
Hematócrito (%)	Primaria	236	42,9	4,2	32	56	0,27
	Secundária	47	43,7	3,9	37	55	
Leucócitos (mm ³)	Primaria	225	4.212	1.857	1.100	12.200	0,06
	Secundária	44	4.807	2.230	1.300	11.500	
Neutrófilos (mm ³)	Primaria	225	2.599	1.327	455	7.452	0,42
	Secundária	44	2.777	1.372	481	5.742	
Linfócitos (mm ³)	Primaria	225	1.303	910	209	6.292	<0,01
	Secundária	44	1.839	1.284	460	5.865	
Plaquetas (mm ³)	Primaria	237	228.872	66.706	17.000	400.000	<0,01
	Secundária	48	126.937	85.686	14.500	416.000	

Teste t-Student; AST: Aspartato aminotransferase, ALT Alanina aminotransferase

Discussão

1) Primeiro artigo

Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

Após a identificação do DENV-3 em dezembro de 2000, essa foi a primeira publicação com aspectos epidemiológicos e clínicos da epidemia de 2001-2002 no Estado do Rio de Janeiro (RJ). Até então, havia o relato inicial de que o vírus DENV-3 detectado em 2000 pertencia ao genótipo III (155), isto é, era semelhante a cepa em circulação nas Américas, e que havia sido associada a maior gravidade dos casos de dengue no subcontinente indiano e Sri Lanka. Esse artigo confirma a circulação desse genótipo de DENV-3, assim como define que os genótipos de DENV-1 e DENV-2 em circulação no RJ, são os mesmos que haviam circulado desde sua introdução em 1986 e 1990 respectivamente. Alguns aspectos relacionados à circulação de DENV-3, como a alta taxa de isolamento em infecção primária, a resposta monotípica de IgM em elevada proporção dos casos com infecção primária e secundária, que haviam sido recentemente discutidos na literatura relacionada a epidemias no Sudeste da Ásia e América Central (75) (14) são comentados nesse artigo.

Como o material analisado abrange o período 2000-2001, os autores não descrevem os casos fatais observados em 2002 associados à circulação de DENV-3, porém, já são detectados sinais de agravamento das manifestações clínicas da doença nesse período.

2) Segundo artigo

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection.

É importante a contribuição desse artigo para a compreensão da patogenia da dengue, pois até o momento em que ele foi publicado, havia apenas um relato de nível sérico elevado de óxido nítrico (NO) em pacientes com DF (156), sugerindo ser esse um fator de proteção, pois os casos de FHD testados, apresentavam níveis significativamente menores e semelhantes aos controles sadios. O mesmo grupo em 2003 (157) tentou definir se células susceptíveis de infecção por vírus Dengue, no caso monócitos, estariam produzindo NO, porém, não obtiveram sucesso porque foi utilizado

um método indireto e pouco sensível, que é a detecção de nitrato e nitrito no sobrenadante de cultura de células.

Portanto, esta foi a primeira publicação que definiu, através da citometria de fluxo, que monócitos ativados pela infecção por DENV são produtores de NO e que há uma relação inversa entre a replicação viral e o início da produção de NO. Esses dados foram obtidos em células de pacientes com diagnóstico de dengue. Os dados de cinética de NO foram melhor estudados na infecção *in vitro* de monócitos, onde foi detectada sua produção a partir do 3º dia, atingindo o pico entre o 5º e 6º dia de infecção viral. A replicação viral por sua vez, é substancialmente reduzida a partir da produção de óxido nítrico.

Ainda nesse artigo, foi a estudada a relação entre a produção de óxido nítrico e a replicação viral em outras linhagens celulares, no caso células de mosquito *Aedes albopictus*. Foi demonstrado que essas quando expostas a níveis elevados de NO, obtidos através de doadores de NO, no estudo foi utilizado o nitroprussiato de sódio (SNP), apresentam significativa redução da proporção de infecção, quando comparado à cultura de células na ausência de SNP. Na situação inversa, isto é, na presença de N-metil-L-Arginina (NMLA), um inibidor da produção de NO, há um aumento significativo de células infectadas. Esse estudo confirmou os achados clínicos, demonstrando que o óxido nítrico é um potente inibidor da multiplicação viral e portanto, um componente importante da resposta imune a esse vírus (25). Os estudos realizados no artigo foram realizados com vírus Dengue 1.

No mesmo ano dessa publicação, pesquisadores na Tailândia, realizaram estudos com DENV-2, que confirmaram a importância do NO, no controle da replicação viral em cultura de células, sendo sugerida a existência de cepas com susceptibilidade variada à produção de óxido nítrico. O sítio genômico de inibição, foi definido como sendo a RNA polimerase viral em estudo publicado em 2006, (158). Estudos de susceptibilidade ao NO pelas diversas cepas virais (159) associados a uma resposta imune eficaz, isto é, relacionada aos quadros sem gravidade (88) têm sido as linhas mais recentes de pesquisa, com evidentes implicações para o desenvolvimento de vacinas.

3) Terceiro artigo

Correlation of serum neopterin levels with disease severity in dengue patients.

Esse estudo faz parte da colaboração com grupos de pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz para o estudo da imunopatogenia da dengue, aqui representados pelo Dr

Fernando A. Bozza, atualmente no IPEC-FIOCRUZ e que colaborou na redação do artigo e com a cessão das amostras de pacientes graves, do ano 2002, durante epidemia por DENV-3. Foram também obtidas, amostras seriadas de pacientes acompanhados no Hospital Municipal Lourenço Jorge em 2006 durante surto epidêmico por DENV-3 e do IPEC, nos anos 2001, em que havia co-circulação dos três sorotipos endêmicos no Brasil, 2002 e 2006. Foi possível então, realizarmos análises comparativas dos níveis séricos de neopterina em pelo menos três momentos, definidos como: fase aguda, defervescência e convalescença.

A neopterina é um derivado de pteridina, produzida por monócitos e macrófagos estimulados por interferon- γ , como resultado de uma variedade de processos inflamatórios. Como as células do sistema fagocítico-mononuclear são o alvo da infecção dos vírus Dengue, e uma vez que os dados de cinética e de correlação dos níveis de neopterina com a apresentação clínica, eram contraditórios na literatura, pois, resumiam-se a duas comunicações, uma na forma de um “short report” com apenas 9 pacientes e que sugeria associação com a gravidade da doença, enquanto outro artigo, demonstrava a correlação com o diagnóstico da doença, mas não com a sua gravidade. Decidimos então, estudar a cinética da neopterina nos momentos acima mencionados. Fomos bem sucedidos em demonstrar que os níveis de neopterina na fase aguda se associam à infecção por vírus dengue e que na defervescência, da febre, momento em que os pacientes que evoluem de forma insatisfatória, apresentam os sinais e sintomas característicos de agravamento como trombocitopenia, hemorragias e hipotensão arterial, os níveis de neopterina permanecem elevados, enquanto que, nos demais casos de dengue observa-se uma redução para níveis semelhantes aos controles sadios.

Nesse estudo foi utilizada a definição de gravidade estabelecida por Balmaseda e col (90), que é semelhante à classificação utilizada pelo Ministério da Saúde (129) para os casos graves que não se encaixam na classificação da OMS e tem sido utilizada em diversas comunicações recentes (114, 116, 160).

Em estudo anterior realizado por Bozza e col (114) nas mesmas amostras dos pacientes graves aqui analisadas, níveis elevados de interferon- γ haviam sido detectados, o que corrobora os resultados encontrados.

Deve-se destacar que a dosagem de neopterina é exame de rotina em bancos de sangue na Europa e a disponibilidade de métodos rápidos para sua detecção (161), pode tornar esse exame, caso validado em amostras maiores e em estudos operacionais, em um instrumento para a redução de letalidade da doença.

4) Quarto artigo

Aspectos clínicos e laboratoriais relacionados à introdução de Dengue 1, 2 e 3, no Estado do Rio de Janeiro.

O objetivo desse trabalho foi sistematizar as manifestações clínicas e laboratoriais relacionados à introdução dos três sorotipos endêmicos no RJ, assim como discutir mecanismos de resposta imune relacionados à circulação de múltiplos sorotipos, que pudessem estar relacionados a esse perfil clínico. O material disponível foram os prontuários de pacientes atendidos no período de 1986 quando iniciamos o atendimento de pacientes no então Hospital Evandro Chagas, até o período de 2001-2002, quando foi introduzido o DENV-3.

A partir dos dados da vigilância virológica, que demonstrou a circulação isolada de DENV-2 em 1991 e que em 2002, 99,4% dos isolamentos na área metropolitana do Rio de Janeiro, haviam sido de DENV-3, optamos por associar uma definição virológica, isto é por isolamento viral a uma definição epidemiológica de caso. Assim sendo, definimos que pacientes com infecção por DENV-1, seriam aqueles com isolamento viral e início da doença nos anos 1986-1987; infecção por DENV-2, além do isolamento viral, incluiria todos os atendidos em 1991 e, no caso de infecção por DENV-3 os casos com doença iniciada em 2002, além do isolamento viral.

Dispúnhamos ainda de dosagens de IgG realizadas entre 1990-1991 por inibição de hemaglutinação (HI) e nos anos 2000-2001 por IgG ELISA, em um número reduzido de pacientes, porém, considerando que os casos infectados em 1986-1987 eram todos de infecção primária, foi possível determinar a resposta imune primária ou secundária em 286 casos.

Um banco de dados em SPSS foi montado e a análise deste, demonstrou o agravamento das manifestações clínicas observadas no período de circulação de DENV-2 e DENV-3, considerando a maior frequência de hemorragias, trombocitopenia e alteração das provas de função hepática. De forma interessante, esse agravamento só se correlacionou com a resposta imune secundária no período de circulação de DENV-2, enquanto que, no ano de 2002, nos casos com isolamento de DENV-3, observamos as mesmas alterações do hemograma e das provas de função hepática predominando na resposta imune do tipo primário. A análise do hemograma nos três períodos mostra que algumas alterações mencionadas no atendimento aos pacientes como leucopenia, foram

mais freqüentes nos períodos com resposta imune primária, em especial na epidemia de 2001-2002 e que a presença de desvio para esquerda, esteve mais associada com a circulação de DENV-3.

Esse estudo, portanto, confirma observações anteriores, sobre a patogenicidade do DENV-3 na infecção primária, assim como descreve de forma sistemática, aspectos clínicos e laboratoriais dos casos com resposta imune primária e secundária, assim como as relacionadas à introdução dos três sorotipos endêmicos no Brasil.

Conclusões

- A vigilância epidemiológica exercida por grupos de pesquisadores preparados para o reconhecimento dos principais patógenos com potencial epidêmico é essencial para o país.
- O característico agravamento no final do período febril e em uma fase onde a replicação viral encontra-se reduzida ressalta a importância dos mecanismos imunes na patogenia da doença e a necessidade da identificação de marcadores biológicos e clínicos para o reconhecimento dos pacientes que desenvolverão formas mais grave da doença.
- A existência de um grupo de pesquisadores com atuação constante através de mais de duas décadas de circulação do vírus dengue no Estado do Rio de Janeiro tornou possível a avaliação do impacto da introdução dos diversos sorotipos na população.

Sugestões

- A experiência bem sucedida do Laboratório de Flavivírus-IOC identificando a introdução dos múltiplos sorotipos de vírus Dengue no Rio de Janeiro, através de um trabalho de vigilância epidemiológica com várias unidades de saúde, teve o seu ápice na identificação do vírus DENV-3, meses antes do início da epidemia no ano de 2001. Essa experiência reforça a necessidade do estabelecimento de uma rede de unidades sentinelas capacitada para a identificação de manifestações clínicas e coleta adequada de material para uma rede de laboratórios, capacitados para a identificação dos agentes infecciosos com potencial epidêmico. Essa estratégia teria uma relação de custo/benefício vantajosa, em especial, se acompanhada de campanhas de saúde coletiva capazes de evitar ou pelo menos reduzir o impacto da circulação desses agentes. Cabe ressaltar a alta probabilidade de introdução no território nacional de novos patógenos, tais como: o vírus do Oeste do Nilo, vírus influenza H5N1 e mesmo agentes de febres hemorrágicas das Américas, Ásia e África, tendo em vista o aumento de intercâmbio com países do continente africano.
- O estudo sistemático das: a) manifestações clínicas dos pacientes com dengue, b) características moleculares dos vírus circulantes, c) alterações imunológicas ocorridas nas diferentes fases da doença, assim como, d) dos aspectos imunogenéticos da nossa população, deve ser considerado como objetivo estratégico em um plano de controle da dengue no Brasil.

Referências bibliográficas:

1. Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philipp J Sci.* 1926;29(1):1-304.
2. Rush B. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. 2a ed. Philadelphia: J. Conrad & Co; 1805.
3. Simmons JS, St. John JH, Reynolds FHK. Experimental studies of dengue. *Philipp J Sci.* 1931;44:1-247.
4. Rudnick A. Studies of the ecology of dengue in Malaysia: a preliminary report. *J Med Entomol.* 1965 Jun;2(2):203-8.
5. Yuwono J, Suharyono W, Koiman I, Tsuchiya Y, Tagaya I. Seroepidemiological survey on dengue and Japanese encephalitis virus infections in Asian monkeys. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1984 Jun;15(2):194-200.
6. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952 Jan;1(1):30-50.
7. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990 Oct;3(4):376-96.
8. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science.* 1960 Apr 15;131:1102-3.
9. Halstead SB. Dengue and hemorrhagic fevers of Southeast Asia. *Yale J Biol Med.* 1965 Jun;37(6):434-54.
10. Pinheiro FP. Dengue in the Americas. 1980-1987. *Epidemiol Bull.* 1989;10(1):1-8.
11. Kouri G, Guzman MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bull Pan Am Health Organ.* 1986;20(1):24-30.
12. Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull.* 1990;11(2):7-9.
13. Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G, et al. [Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas]. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1996 Aug;121(2):102-10.
14. Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jul-Aug;63(1-2):5-11.

15. 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 Jan-Feb;25(1):53-4.
16. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986 Apr-Jun;81(2):245-6.
17. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Apr-Jun;85(2):253.
18. 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 Aug;111(1):163-70.
19. Siqueira JB, Jr., Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jan;11(1):48-53.
20. Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007 Nov;22(5):358-63.
21. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, et al. *Flaviviridae*. *Intervirology*. 1985;24(4):183-92.
22. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, Tangnaratchakit 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 Jan;27(1):43-8.
23. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis*. 2006 Apr 15;193(8):1078-88.
24. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*. 2005 Jul;79(13):8004-13.
25. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 2006 Dec;80(23):11418-31.
26. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23-61.

27. Sabin AB. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev.* 1950 Sep;14(3):225-32.
28. Russell PK, Chiewsilp D, Brandt WE. Immunoprecipitation analysis of soluble complement-fixing antigens of dengue viruses. *J Immunol.* 1970 Oct;105(4):838-45.
29. Henchal EA, McCown JM, Burke DS, Seguin MC, Brandt WE. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 1985 Jan;34(1):162-9.
30. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 1999 Oct 23;354(9188):1431-4.
31. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003 May;27(1):1-13.
32. Trent DW, Grant JA, Rosen L, Monath TP. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology.* 1983 Jul 30;128(2):271-84.
33. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:315-41.
34. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis.* 2004 Mar;8(2):69-80.
35. Dengue type 3 infection-Nicaragua and Panama, October-November 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1995 Jan 20;44(2):21-4.
36. Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis.* 2007 Jun 1;44(11):1462-6.
37. 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 Apr 14;230(2):244-51.
38. King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, et al. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1999 Dec;30(4):718-28.
39. 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 Apr 15;189(8):1411-8.
40. Nogueira RM, Filippis AM, Coelho JM, Sequeira PC, Schatzmayr HG, Paiva FG, et al. Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002 Mar;33(1):68-71.

41. Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Nov;61(5):720-4.
42. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003 Apr 7;197(7):823-9.
43. Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P, et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 2008 Apr;82(8):3939-51.
44. Bhamarapravati N, Boonyapaknavik V. Pathogenetic studies. 1966.
45. Halstead SB. Dengue. *Lancet.* 2007 Nov 10;370(9599):1644-52.
46. Koraka P, Murgue B, Deparis X, Van Gorp EC, Setiati TE, Osterhaus AD, et al. Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity. *J Med Virol.* 2004 Mar;72(3):445-50.
47. Murgue B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. *J Med Virol.* 2001 Sep;65(1):97-104.
48. Cardier JE, Rivas B, Romano E, Rothman AL, Perez-Perez C, Ochoa M, et al. Evidence of vascular damage in dengue disease: demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells. *Endothelium.* 2006 Sep-Oct;13(5):335-40.
49. Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, et al. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):5865-74.
50. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005 Sep-Oct;36(5):425-35.
51. Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, Libraty DH. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):7114-21.
52. Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis.* 2005;5:64.
53. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2006 Oct;19(5):429-36.

54. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis.* 1999 Apr;179(4):755-62.
55. Gagnon SJ, Mori M, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. *J Med Virol.* 2002 May;67(1):41-6.
56. Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis.* 2006 Sep 1;194(5):600-7.
57. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225(1):300-13.
58. Wang WK, Chen HL, Yang CF, Hsieh SC, Juan CC, Chang SM, et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis.* 2006 Oct 15;43(8):1023-30.
59. Sierra B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol.* 2007 Jun;68(6):531-40.
60. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, et al. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2002 Nov;63(11):1039-44.
61. Soundravally R, Hoti SL. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. *Hum Immunol.* 2007 Dec;68(12):973-9.
62. Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jul;67(1):102-6.
63. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jul;11(3):480-96.
64. Halstead SB, Scanlon JE, Umpaivit P, Udomsakdi S. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *Am J Trop Med Hyg.* 1969 Nov;18(6):997-1021.

65. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med.* 1970 Apr;42(5):311-28.
66. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med.* 1970 Apr;42(5):350-62.
67. Halstead SB. The Alexander D. Langmuir Lecture. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. *Am J Epidemiol.* 1981 Nov;114(5):632-48.
68. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Mar;38(2):411-9.
69. Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg.* 1974 May;23(3):495-506.
70. 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.
71. Hammon WM. Dengue hemorrhagic fever--do we know its cause? *Am J Trop Med Hyg.* 1973 Jan;22(1):82-91.
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 Nov;120(5):653-69.
73. 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 May;56(5):566-72.
74. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;60:421-67.
75. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisyakorn 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 Feb;68(2):191-202.
76. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Mar;48(3):324-31.

77. Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun*. 2000 Feb;68(2):702-7.
78. Bukowski JF, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Ennis FA. Dengue virus-specific cross-reactive CD8⁺ human cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*. 1989 Dec;63(12):5086-91.
79. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest*. 1991 Nov;88(5):1473-80.
80. Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1429-35.
81. 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 Jul;9(7):921-7.
82. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3821-9.
83. Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 1983 Jan;32(1):154-6.
84. 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 Jan;181(1):2-9.
85. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology*. 2003 Jan 20;305(2):330-8.
86. 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 Oct 15;186(8):1165-8.
87. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced

by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol.* 2005 Jan 1;174(1):395-403.

88. Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanarooj S, Charoensirisuthikul T, Kasisith J. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2008 May 15;197(10):1459-67.

89. Rigau-Perez JG. Case definition for dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J.* 1999 Jan;18(1):80.

90. Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, et al. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Dec;73(6):1059-62.

91. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet.* 2006 Jul 8;368(9530):170-3.

92. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* 1997 Aug;176(2):313-21.

93. Phuong HL, de Vries PJ, Nga TT, Giao PT, Hung le Q, Binh TQ, et al. Dengue as a cause of acute undifferentiated fever in Vietnam. *BMC Infect Dis.* 2006;6:123.

94. Diaz FA, Martinez RA, Villar LA. [Clinical criteria to diagnose dengue in its early stages]. *Biomedica.* 2006 Mar;26(1):22-30.

95. Chadwick D, Arch B, Wilder-Smith A, Paton N. Distinguishing dengue fever from other infections on the basis of simple clinical and laboratory features: application of logistic regression analysis. *J Clin Virol.* 2006 Feb;35(2):147-53.

96. Potts JA, Rothman AL. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations. *Trop Med Int Health.* 2008 Sep 16.

97. Cao XT, Ngo TN, Wills B, Kneen R, Nguyen TT, Ta TT, et al. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Viet Nam. *Trop Med Int Health.* 2002 Feb;7(2):125-32.

98. W.H.O. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997.

99. Wu KL, Changchien CS, Kuo CM, Chuah SK, Lu SN, Eng HL, et al. Dengue fever with acute acalculous cholecystitis. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Jun;68(6):657-60.

100. Khor BS, Liu JW, Lee IK, Yang KD. Dengue hemorrhagic fever patients with acute abdomen: clinical experience of 14 cases. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 May;74(5):901-4.
101. Venkata Sai PM, Dev B, Krishnan R. Role of ultrasound in dengue fever. *Br J Radiol.* 2005 May;78(929):416-8.
102. Colbert JA, Gordon A, Roxelin R, Silva S, Silva J, Rocha C, et al. Ultrasound measurement of gallbladder wall thickening as a diagnostic test and prognostic indicator for severe dengue in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J.* 2007 Sep;26(9):850-2.
103. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ.* 1987;21(3):270-9.
104. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000 Jun;13(2):261-76.
105. Mairuhu AT, Mac Gillavry MR, Setiati TE, Soemantri A, ten Cate H, Brandjes DP, et al. Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence. *Lancet Infect Dis.* 2003 Jan;3(1):33-41.
106. Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, Daramola OA, Dung NM, Loan HT, et al. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome. *Clin Infect Dis.* 2002 Aug 1;35(3):277-85.
107. Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S, Thisyakorn U, Lusher J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thromb Haemost.* 2007 Apr;97(4):627-34.
108. La Russa VF, Innis BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillieres Clin Haematol.* 1995 Mar;8(1):249-70.
109. Funahara Y, Ogawa K, Fujita N, Okuno Y. Three possible triggers to induce thrombocytopenia in dengue virus infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1987 Sep;18(3):351-5.
110. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, et al. Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Dec;65(6):840-7.
111. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, Cheng JT. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Nov;101(11):1106-13.

112. Villar-Centeno LA, Diaz-Quijano FA, Martinez-Vega RA. Biochemical alterations as markers of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Mar;78(3):370-4.
113. Libraty DH, Endy TP, Hough 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 May 1;185(9):1213-21.
114. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008 Jun 25;8(1):86.
115. Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shieh SC, Chen SH, Liu HS, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jan;74(1):142-7.
116. Thomas L, Verlaeten O, Cabie 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 Jun;78(6):990-8.
117. 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.
118. Klevens RM, Fleming PL, Li J, Gaines CG, Gallagher K, Schwarcz S, et al. The completeness, validity, and timeliness of AIDS surveillance data. *Ann Epidemiol.* 2001 Oct;11(7):443-9.
119. Rigau-Perez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis.* 2006 May;6(5):297-302.
120. Azevedo MB, Kneipp MB, Baran M, Nicolai C, Santos BS. O previsível e o prevenível: mortes por dengue na epidemia carioca. *Saúde em Foco.* 2002;24:65-79.
121. Souza LJ, Alves JG, Nogueira RM, Gicovate Neto C, Bastos DA, Siqueira EW, et al. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. *Braz J Infect Dis.* 2004 Apr;8(2):156-63.
122. Vinodh BN, Bammigatti C, Kumar A, Mittal V. Dengue fever with acute liver failure. *J Postgrad Med.* 2005 Oct-Dec;51(4):322-3.
123. Wiwanitkit V. Dengue myocarditis, rare but not fatal manifestation. *Int J Cardiol.* 2006 Sep 10;112(1):122.

124. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol*. 1997 Jul-Aug;16(4):204-8.
125. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 2004 Oct;80(948):588-601.
126. Mondet B, da Rosa AP, Vasconcelos PF. [The risk of urban yellow fever outbreaks in Brazil by dengue vectors. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*]. *Bull Soc Pathol Exot*. 1996;89(2):107-13; discussion 14.
127. Teixeira MG, Costa MC, Coelho G, Barreto ML. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Oct;14(10):1663.
128. SES-RJ. RELATÓRIO DE CASOS DE DENGUE – Outubro 2008. 2008.
129. Brasil. Dengue: Diagnóstico e manejo clínico. In: Saude SdVe, editor. 2a ed: Ministerio da Saude; 2005. p. 24.
130. Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Kuno G, Gubler DJ, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB international; 1997. p. 313-33.
131. 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 Apr-Jun;83(2):219-25.
132. 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 Mar;30(3):545-51.
133. Miagostovich MP, dos Santos FB, de Araujo ES, Dias J, Schatzmayr HG, Nogueira RM. Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997 Sep-Oct;92(5):595-9.
134. Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*. 2005 Sep;11(9):1376-81.
135. Miagostovich MP, dos Santos FB, Gutierrez CM, Riley LW, Harris E. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1286-9.
136. 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 Feb;38(1):5-16.

137. Blacksell SD, Bell D, Kelley J, Mammen MP, Jr., Gibbons RV, Jarman RG, et al. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Nov;14(11):1458-64.
138. Blacksell SD, Doust JA, Newton PN, Peacock SJ, Day NP, Dondorp AM. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Aug;100(8):775-84.
139. Harris E, Perez L, Phares CR, Perez Mde L, Idiaquez W, Rocha J, et al. Fluid intake and decreased risk for hospitalization for dengue fever, Nicaragua. *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug;9(8):1003-6.
140. W.H.O. Technical guides for diagnosis, treatment, surveillance, prevention and control of dengue haemorrhagic fever. Geneva: World Health Organization; 1975.
141. Kalayanarooj S. Standardized clinical management: evidence of reduction of dengue haemorrhagic fever case-fatality in Thailand. *Dengue Bulletin.* 1999;23(1).
142. Torres EM. Diagnostico. Dengue hemorragico en niños. Bogota: Instituto Nacional de Salud; 1990. p. 93-8.
143. P.A.H.O. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the americas: guidelines for prevention and control. Washington, D.C.: Pan American Health Organization; 1994. p. 62-6.
144. Rigau-Perez JG, Laufer MK. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals. *Clin Infect Dis.* 2006 May 1;42(9):1241-6.
145. Finfer S, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, Norton R. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med.* 2004 May 27;350(22):2247-56.
146. Ngo NT, Cao XT, Kneen R, Wills B, Nguyen VM, Nguyen TQ, et al. Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour. *Clin Infect Dis.* 2001 Jan 15;32(2):204-13.
147. Wills BA, Nguyen MD, Ha TL, Dong TH, Tran TN, Le TT, et al. Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome. *N Engl J Med.* 2005 Sep 1;353(9):877-89.
148. Levi M, Jonge E. Clinical relevance of the effects of plasma expanders on coagulation. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Nov;33(8):810-5.

149. Kabra SK, Juneja R, Madhulika, Jain Y, Singhal T, Dar L, et al. Myocardial dysfunction in children with dengue haemorrhagic fever. *Natl Med J India*. 1998 Mar-Apr;11(2):59-61.
150. Wali JP, Biswas A, Chandra S, Malhotra A, Aggarwal P, Handa R, et al. Cardiac involvement in Dengue Haemorrhagic Fever. *Int J Cardiol*. 1998 Mar 13;64(1):31-6.
151. Khongphatthanayothin A, Lertsapcharoen P, Supachokchaiwattana P, La-Orkhun V, Khumtonvong A, Boonlarptaveechoke C, et al. Myocardial depression in dengue hemorrhagic fever: prevalence and clinical description. *Pediatr Crit Care Med*. 2007 Nov;8(6):524-9.
152. Brasil. Programa nacional de Controle da Dengue. Funasa; 2002.
153. Brasil. Boletim Epidemiológico da Dengue maio 2008. Secretaria de Vigilância em Saúde; 2008.
154. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jul;5(7):518-28.
155. Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Oct;96(7):925-6.
156. Valero N, Espina LM, Anez G, Torres E, Mosquera JA. Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Jun;66(6):762-4.
157. Espina LM, Valero NJ, Hernandez JM, Mosquera JA. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Jan;68(1):48-53.
158. Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol*. 2006 Oct;87(Pt 10):3003-11.
159. Ubol S, Chareonsirisuthigul T, Kasisith J, Klungthong C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. *Virology*. 2008 Jul 5;376(2):290-6.
160. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB, Jr., Feres VC, Rocha B, Levi JE, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis*. 2008 Mar 15;197(6):817-24.
161. Bayer M, Schmitz S, Westermann J, Thiemann F, Edelmann R, Szakacs C, et al. Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of neopterin. *Clin Lab*. 2005;51(9-10):495-504.