

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DE TESTES DE CAPTURA DE ANTÍGENO NS1 PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DAS INFECÇÕES POR DENGUE

Por

MONIQUE DA ROCHA QUEIROZ LIMA

Rio de Janeiro

Julho de 2009

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós Graduação em Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DE TESTES DE CAPTURA DE ANTÍGENO NS1
PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DAS INFECÇÕES POR
DENGUE**

Por

Monique da Rocha Queiroz Lima

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadores: Dr^a Flávia Barreto dos Santos

Dr^a Rita Maria Ribeiro Nogueira

Rio de Janeiro

Julho de 2009

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós Graduação em Medicina Tropical

Esta Dissertação Intitulada:

**AVALIAÇÃO DE TESTES DE CAPTURA DE ANTÍGENO NS1
PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DAS INFECÇÕES POR
DENGUE**

Apresentada por

MONIQUE DA ROCHA QUEIROZ LIMA

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Marli Tenório Cordeiro (Presidente)

Prof. Dra. Elzinandes Leal de Azeredo

Prof. Dr. Rogério Valls de Souza

Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão (Suplente)

Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo (Suplente)

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2009.

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

L732

Lima, Monique da Rocha Queiroz.

Avaliação de testes de captura de antígeno NS1 no diagnóstico precoce das infecções por dengue / Monique da Rocha Queiroz Lima. – Rio de Janeiro, 2009.

xviii, 79f.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Medicina Tropical, 2009.
Bibliografia: f. 80 - 107.

1. Dengue. 2. Brasil. 3. Diagnóstico sorológico. 4. Antígeno NS1. I. Título.

CDD 616.921

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

Este trabalho é dedicado,

Ao meu marido, Hudson, e aqueles que me ensinaram o que é amor em família: meus pais, Zely e José, e minha irmã, Nataly.

“Se você não quer ser esquecido quando morrer, escreva coisas que vale a pena ler ou faça coisas que vale a pena escrever.”

Benjamin Franklin

“Os analfabetos do próximo século não são aqueles que não sabem ler ou escrever, mas aqueles que se recusam a aprender, reaprender e voltar a aprender.”

Alvin Toffler

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Dr^a Flávia Barreto dos Santos, por saber de verdade o que é ser uma orientadora: por saber respeitar as escolhas de seus alunos nunca ficando a parte de seu crescimento, mantendo-se sempre presente na função de educadora. Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com aquilo que me identifiquei desde o início, muito obrigada por ser realmente uma Professora, alguém sempre disposta a ensinar, a passar seus conhecimentos adiante de forma admirável e acessível, por ser realmente um exemplo de profissional a ser seguido. Muito obrigada por ser para mim muito mais do que tudo isso e acima de tudo uma amiga muito leal.

AGRADECIMENTOS:

Chego ao final do Mestrado somando seis anos de permanência nesta Instituição. Seis anos que iniciei como estudante, passando para Bolsista de Pesquisa até chegar aqui. Portanto, não poderia me limitar a agradecer somente àqueles que me acompanharam mais de perto nestes últimos dois anos. Assim, gostaria de agradecer:

Primeiramente a Deus, por tudo que tive a oportunidade de aprender até hoje, por todas as pessoas maravilhosas com quem pude conviver, por dar-me sempre força para lutar por tudo aquilo em que acredito, pela minha vida e por todas as formas de Vida. Se a Vida não fosse tão bela jamais seria uma Bióloga!!!!!!!

À Dr^a Rita Maria Ribeiro Nogueira, Chefe do Laboratório de Flavivirus, que tem acompanhado minha trajetória nesta Instituição desde os tempos de bolsista FAPERJ. Obrigada pela orientação, apoio, dedicação, amor pela ciência e pelo saber, sendo um exemplo a ser seguido pelas próximas gerações.

À Dr^a Ana Maria Bispo de Filippis pelo estímulo ao meu desenvolvimento científico-profissional.

Ao Dr Hermann Gonçalves Schatzmayr pelo exemplo de dedicação à pesquisa científica.

À Eliane Saraiva Machado de Araújo, pelo carinho e atenção nos momentos mais difíceis deste processo e ensinamentos na sorologia.

À Márcia Gonçalves e Nieli Faria, por sermos consideradas como irmãs filha da mesma orientadora, onde sou a mais antiga, e por sabermos dividir o tão precioso tempo dela.

Aos meus amigos Jaqueline Bastos, Fernanda de Bruycker, Priscila Conrado, Simone Sampaio, Dinair Couto e Josélio Galvão pela cumplicidade de todos estes anos e pelo auxílio na realização do diagnóstico laboratorial.

À Ana Lúcia (Donana), pelos eternos cafés da manhã.

Ao José Farias, Leda Maria e Maria Aparecida, pela disponibilidade em auxiliar nas atividades no Laboratório e pela amizade.

A todos os colegas do Pavilhão Helio e Peggy Pereira e, em especial, Heliana de Jesus Santos e Márcia Regina Ferreira.

Ao Dr. Márcio Neves Bóia pelos valiosos ensinamentos, principalmente nos cálculos epidemiológicos.

Aos coordenadores, Dra. Alda Maria da Cruz e Filipe Aníbal Carvalho Costa, e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IOC pelo auxílio constante durante o mestrado. Agradecimentos especiais a ex-secretária do PGM, Michele.

Aos amigos da pós - graduação; Joana, Ana Cláudia, Viviane, Patrícia, Renata, Maíra, Lauren, Filipe, Adriano, Carlos José, Franklin e Eugênio, por tudo o que aprendi.

À CAPES pela concessão da bolsa durante o mestrado.

À MEDIVAX, PanBio e a BioRad, por terem cedido os Kits de diagnóstico. Agradecimentos especiais a Alessandra Taveira, Adriana, ao Samuel Paixão, aos Drs Carl Stubbing e David Brandt.

A todos os pacientes que participaram deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e a Dr^a Elzinandes de Azeredo pela revisão.

Ao Hudson, meu Marido, pela paciência, amor e carinho. Você me ajuda a ser uma pessoa melhor a cada dia, espero que eu faça o mesmo por você. Agradeço também a sua família por me receber sempre de braços abertos e com muita alegria.

À minha irmã, Nataly, que com sua grande determinação me ajudou a realizar mais este sonho.

Aos meus pais, Euzely e José Cruz, por tudo o que fazem e representam, por mim e para mim. Todo seu apoio, amor, amizade, dedicação, companheirismo, cumplicidade, alegria e vontade de viver feliz. Obrigada Mãe e Pai.

Aos meus familiares e a todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

RESUMO

O diagnóstico laboratorial de dengue é muito importante para apoiar os programas Vigilância Epidemiológica considerando-se a dificuldade da confirmação dos casos em bases clínicas apenas, em especial, durante períodos inter-epidêmicos. Atualmente estão disponíveis kits comerciais para o diagnóstico sorológico do dengue, embora o seu custo ainda represente um alto encargo financeiro para países em desenvolvimento. Um diagnóstico rápido pode direcionar as medidas de controle do vetor. A proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus dengue por ser um marcador utilizado durante a fase aguda da doença e tem sido proposto para o diagnóstico da doença. Desta forma, a sensibilidade e especificidade de três kits comerciais para captura de antígeno NS1 disponíveis no mercado foram avaliadas com um painel de 852 amostras obtidos a partir da coleção do Laboratório de Flavivírus no Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, de epidemias ocorridas durante os anos de 1986 a 2008. O desempenho de cada kit foi avaliado individualmente e, a comparação entre os três kits foi baseada na análise de uma sub-população de 450 amostras. Dentre os três kits analisados, o kit NS1 Ag Strip (BioRad Laboratories) foi o mais sensível em confirmar casos de dengue na amostragem testada (89%, 197/220), seguido pelo Platelia NS1 (BioRad Laboratories) (84%, 184/220). O menos sensível foi o pan -E Early ELISA (PanBio Diagnostics) com 72% (159/220) de sensibilidade. Porém, neste estudo o kit da PanBio foi o mais específico (100%), enquanto que ambos os kits da BioRad apresentaram 99% de especificidade. Os resultados obtidos demonstraram uma maior sensibilidade de confirmação de casos de infecção primária pelos três kits, porém não houve diferença significativa em relação aos casos de infecção secundária. Os três kits foram mais sensíveis em confirmar casos positivos por isolamento viral do que em casos positivos por RT-PCR. A sensibilidade dos três kits foi maior no período compreendido entre o primeiro ao quinto dia após o início dos sintomas. Reações cruzadas foram raramente observadas em vacinados contra o vírus da febre amarela e casos de rubéola. Os resultados obtidos demonstraram que três kits podem ser utilizados para a detecção precoce da infecção viral por dengue.

ABSTRACT

Dengue virus diagnosis is an important tool to support Epidemiological Surveillance Programs considering the difficulties found in confirm dengue cases based only on the clinical symptoms, especially during inter-epidemic periods. Currently, there are many commercial serological kits for dengue diagnosis, however its costs poses a financial burden for many developing countries. The dengue virus non- structural protein a (NS1) can be used as a marker during the acute phase of the illness and its use has been proposed for the disease diagnosis. Therefore, here we evaluated the sensitivity and specificity of three newly available NS1 antigen capture commercial kits with a panel of 852 samples from the collection of the Flavivirus Laboratory at the Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, from epidemics occurred from 1986 to 2008. Each kit was evaluated individually and the comparison among them was based on the analysis of a sub-population of 450 samples. From the three kits analyzed, the NS1Ag Strip (Biorad Laboratories) showed the highest sensitivity (89%, 197/220) in confirming dengue cases, followed by the Platelia™ NS1 (Biorad Laboratories). The less sensitive one was the pan-E Early ELISA (PanBio Diagnostics) with a sensitivity of 72% (159/220). However, in this study the PanBio kit was the most specific (100%) while the two kits from BioRad showed both 99% of specificity. Primary dengue cases were more frequently confirmed than secondary ones. A higher sensitivity was observed in cases positive by virus isolation, when compared to cases positive by RT-PCR. The highest NS1 antigen detection was from the first to the fifth day after the onset of the symptoms. Cross reactivity were rarely observed in yellow fever vaccinees and rubella cases. The results showed that the three kits can be used in the early diagnosis of dengue infections.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE – Facilitação Dependente de Anticorpos (do Inglês “Antibody-dependent-enhancement”)

Ae. - *Aedes*

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

C – Proteína do capsídeo

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos

DC – Dengue clássico

DCC – Dengue com complicações

DENV – Vírus dengue (do Inglês Den Virus)

DSAC – Dengue com sinais associados ao choque

E – Proteína do envelope

ECP – Efeito citopático

ELISA – Teste Imunoenzimático (do Inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”)

EUA – Estados Unidos da América

FAM - 6-carboxifluoresceína

F_C – Receptor de FC

FC_γ – Receptor de FC_γ

FHD – Febre hemorrágica do dengue

IC - Imunocromatografia

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IgG-ELISA - Teste imunoenzimático de detecção de imunoglobulina da classe G

Kb – Kilo-bases

KDa – Kilodaltons

L-15 – Meio de cultura Leibovitz-15

MAC-ELISA – Teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina da classe M

MIAF – Flúido ascítico hiperimune de camundongo (do Inglês “Mouse immune ascitic fluid”)

mL – Mililitro

µg - Micrograma

nm - Nanômetro

mNS1 – NS1 associada à membrana

NS – Proteína não estrutural (do Inglês “Non Structural Protein”).

NIH – Instituto Nacional de Saúde (do Inglês “National Institute Health”)

prM – Proteína da pré-membrana

RNA – Ácido ribonucléico

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR – Transcrição reversa seguida reação em cadeia da polimerase

BSA – Soro de albumina bovina (do Inglês “Bovine serum albumin”)

SCD – Síndrome do choque por dengue

SCF – Fixação de complemento solúvel (do Inglês “Soluble complement fixing”)

sNS1 – NS1 secretada

SHN – Soro humano Normal

SUS – Sistema Único de Saúde

PDVI – Iniciativa para uma vacina contra o dengue (do Inglês “Pediatric Dengue Vaccine Initiative”)

PDK – Células primárias de rim de cão (do Inglês “Primary dog kidney”)

PEAa – Programa de Erradicação do *Ae. aegypti*

PGMK – Células primárias de rim de macaco verde (do Inglês “Primary green monkey kidney”)

PNCD – Programa Nacional de Controle do Dengue

VFA – Vírus da febre amarela

TAMRA - 6-carboxitetrametilrodamina

WRAIR – Instituto Militar de Pesquisa Walter Reed (do Inglês “Walter Reed Army Institute of Research”)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclos de transmissão dos DENV (adaptado de Whitehead, 2007).

Figura 2: Casos de DENV em áreas endêmicas do mundo durante 1995 – 2005 (adaptado de Whitehead, 2007).

Figura 3: Número de casos de dengue, reportados à OMS, por década nas Américas (adaptado de Nathan & Dayal-Drager, 2006).

Figura 4: Incidência de dengue de acordo com a região geográfica e ano de ocorrência, Brasil, 1986 - 2008 (adaptado de Teixeira *et al.*, 2009).

Figura 5: Número de hospitalizações por FHD de acordo com o grupo de idade, 1998 – 2007 (adaptado de Teixeira *et al.*, 2009).

Figura 6: Organização estrutural dos DENV (A – C) (adaptado de Zhang *et al.*, 2003).

Figura 7: (a) Diagrama esquemático do genoma e da (b) poliproteína dos DENV (adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

Figura 8: Mudança conformacional da proteína E dos DENV durante a replicação viral. (a – c) Vírus imaturo não infeccioso, (d) Vírus maduro infeccioso (adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

Figure 9: Diagrama esquemático da replicação dos DENV (adaptado de Tomlinson *et al.*, 2009).

Figura 10: Níveis de anticorpos e antígeno NS1 durante as respostas primária e secundária aos DENV (adaptado de PanBio Diagnostics).

Figura 11: Diagrama esquemático da realização do kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories).

Figura 12: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) para captura do antígeno NS1 do DENV de acordo com o número de dias após o início dos sintomas (n=426).

Figura 13: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early Elisa (PanBio Diagnostics) para captura do antígeno NS1 do Dengue de acordo com o sexo (n=426).

Figura 14: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early Elisa (PanBio Diagnostics) para captura do antígeno NS1 do Dengue de acordo com a faixa etária (n=426).

Figura 15: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) para captura do antígeno NS1 de acordo com a resposta imune (n=110).

Figura 16: Resposta a captura de antígeno NS1 nos diferentes grupos estudados. Os valores de absorvância (D.O.405 e 620) estão representados para amostras de casos de dengue e de casos não-dengue e o “cut-off” está representado pela linha pontilhada.

Figura 17: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para captura do antígeno NS1 em relação ao número de dias após o início dos sintomas (n=220).

Figura 18: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para captura do antígeno NS1 de acordo com o sexo do paciente (n=220).

Figura 19: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para captura do antígeno NS1 de acordo com a faixa etária (n=220).

Figura 20: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para captura do antígeno NS1 de acordo com a resposta imune (n=110).

Figura 21: Resposta à captura de antígeno NS1 nos diferentes Grupos estudados. Os valores de absorvância (D.O.405 e 620) estão representados para amostras de casos de dengue e de casos não-dengue e o “cut-off” está representado pela linha pontilhada.

Figura 22: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 do Dengue relacionado ao início dos sintomas (n=422).

Figura 23: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 do dengue de acordo com o sexo do paciente (n=422).

Figura 24: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 do dengue de acordo com a faixa etária (n=422).

Figura 25: Sensibilidade o Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 do dengue de acordo com a resposta imune (n=88).

Figura 26: Sensibilidade entre os três kits para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com a metodologia utilizada (n=220).

Figura 27: Sensibilidade entre os três kits para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com o sorotipo viral infectante (n= 158).

Figura 28: Comparação da sensibilidade entre os três kits para captura do antígeno NS1 relacionado ao número de dias após o início dos sintomas (n=220).

Figura 29: Comparação da sensibilidade entre os três kits analisados de acordo com o sexo do paciente (n=220).

Figura 30: Comparação da sensibilidade entre os três kits em casos primários e secundários de dengue (n=54).

Figura 31: Comparação entre os três kits de NS1 do dengue, em relação à sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Kits comerciais disponíveis para o diagnóstico das infecções por DENV.

Tabela 2: Lista parcial das vacinas candidatas contra os DENV (adaptado de Hombach *et al.*, 2007).

Tabela 3: Distribuição dos Grupos de amostras analisadas de acordo como o kit de captura de antígeno NS1 avaliado.

Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase para a tipagem dos DENV.

Tabela 5: Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Tabela 6: Critérios para interpretação do tipo de resposta imune de acordo com os títulos de IgG e dias de doença após o início dos sintomas (Miagostovich *et al.*, 1999).

Tabela 7: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com o sorotipo viral (n=300).

Tabela 8: Comparação da sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) em relação aos casos onde há presença e ausência de IgM (n= 426).

Tabela 9: Sensibilidade do pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) em casos confirmados por isolamento viral e/ou RT-PCR (n=300).

Tabela 10: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com o sorotipo viral (n=158).

Tabela 11: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) em relação a ausência (Grupo A – C) e presença (Grupo D) de IgM (n= 220).

Tabela 12: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) em casos confirmados por RT-PCR e/ou isolamento viral (n=158).

Tabela 13: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com o sorotipo viral (n=322).

Tabela 14: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) na presença e ausência de IgM (n= 422).

Tabela 15: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) em casos confirmados por RT-PCR e/ou isolamento viral (n=322).

ÍNDICE

1 Introdução.....	1
1.1 Histórico.....	2
1.2 Epidemiologia dos DENV.....	5
1.2.1 Dengue nas Américas.....	5
1.2.2 Dengue no Brasil.....	8
1.3 Agente Etiológico.....	12
1.4 Proteínas Virais.....	14
1.4.1. Proteína NS1.....	15
1.5 Replicação dos DENV.....	17
1.6 Manifestações Clínicas.....	19
1.6.1 Dengue Clássico (DC).....	20
1.6.2 Febre Hemorrágico do Dengue (FHD).....	20
1.6.3 Dengue com Complicações (DCC).....	21
1.7 Resposta Imune.....	22
1.8 Diagnóstico Laboratorial.....	25
1.8.1 Kits Comerciais.....	26
1.9 Prevenção e Controle.....	28
1.9.1 Vacinas em Desenvolvimento Contra os DENV.....	29
2 Relevância e Justificativa do Estudo.....	33
3 Objetivos.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
4 Material e Métodos.....	36
4.1 Definição dos casos de Dengue e não-Dengue.....	36
4.2 Amostras Clínicas.....	36
4.3 Isolamento Viral.....	38
4.4 Extração do RNA viral.....	40
4.4.1 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).....	40

4.5	MAC-ELISA.....	42
4.6	IgG-ELISA.....	43
4.7	Kits comerciais para captura de antígeno NS1 de DENV.....	45
4.7.1	pan-E DENGUE EARLY ELISA (PanBio Diagnostics).....	45
4.7.2	Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories).....	46
4.7.3	Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories).....	47
4.8	Análises Estatísticas.....	48
5	Resultados.....	49
5.1	Kit pan-E DENGUE EARLY ELISA (PanBio Diagnostics).....	49
5.2	Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories).....	54
5.3	Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories).....	59
5.4	Comparação dos três kits comerciais de captura de antígeno NS1 para o diagnóstico das infecções por DENV.....	63
6	Discussão.....	68
6.1	pan-E DENGUE EARLY ELISA (PanBio Diagnostics).....	69
6.2	Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories).....	71
6.3	Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories).....	73
6.4	Comparação dos três kits de captura de antígeno NS1 em uma subpopulação de 450 amostras.....	75
7	Conclusões.....	78
8	Perspectivas.....	79
9	Referências Bibliográficas.....	80

1 INTRODUÇÃO

A família *Flaviviridae* é formada por três gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus* que compartilham semelhanças quanto à morfologia do vírion, organização do genoma, e possivelmente, estratégia de replicação (Westeway, *et al.*, 1985). O gênero *Flavivirus* é composto por cerca de 80 diferentes vírus, dentre eles, o vírus dengue (DENV), vírus estes que representam uma ameaça para a saúde pública (Lindenbach & Rice, 2001; Burke & Monath, 2001; Whitehead, 2007). Pela definição, os arbovírus são classificados como zoonoses que dependem de outra espécie animal além do homem para serem mantidos na natureza, requerendo no mínimo dois hospedeiros (Gubler, 1998). Os DENV, porém, se adaptaram completamente ao homem, embora o ciclo mosquito-macaco-mosquito ainda seja observado em algumas regiões da África e da Ásia (Figura 1) (Gubler, 2002; Whitehead, 2007), sendo transmitido aos seres humanos através da picada de um mosquito *Aedes* (*Ae.*) infectado (Rodhain & Rosen, 1997). *Ae. aegypti*, um mosquito altamente domesticado, é o principal vetor do DENV, mas o *Ae. albopictus* também pode sustentar a transmissão (Effler, 2005).

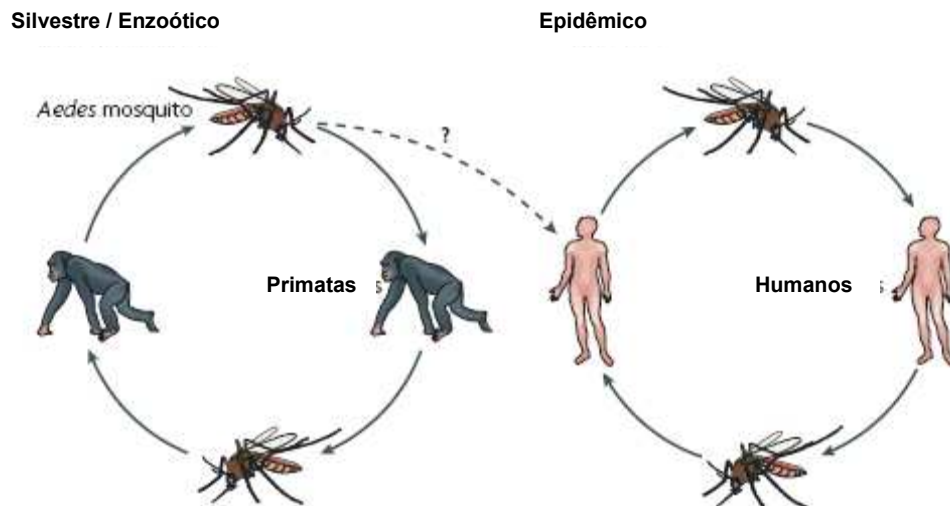


Figura 1: Ciclos de transmissão dos DENV (adaptado de Whitehead, 2007).

DENV é a arbovirose mais importante, com cerca de 50-100 milhões de infecções de dengue clássico (DC) e centenas de milhares de casos de febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque por dengue (SCD) ocorrendo anualmente (Burke & Monath, 2001; Guha-Sapir & Schimmer, 2005). O número de casos de dengue aumentou dramaticamente com o passar das décadas, onde as regiões geográficas mais envolvidas tem sido as dos países tropicais (Haslthead, 2007).

1.1 Histórico

As infecções pelos DENV são responsáveis pelo elevado índice de morbidade na maioria das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oceania, África e Américas. Atualmente, cerca de três bilhões de pessoas estão sob o risco de contrair infecção por um dos quatro sorotipos do vírus (Gubler, 1997; WHO, 2002; Gómez-Dantés & Willoquet, 2009).

Os primeiros relatos de grandes epidemias de uma doença que possivelmente tratava-se de dengue datam de 1779 e 1780 e foram relatadas em três continentes, Ásia, África e América do Norte, porém há registros da ocorrência desta doença no século III. Durante a Dinastia Chin, nos anos de 265 a 420 d.C., foram descritos os sintomas de uma enfermidade que os chineses chamaram de "veneno da água", associando insetos voadores e água. Estes achados foram formalmente editados em uma enciclopédia médica chinesa durante a Dinastia Tang, no ano de 610 d.C., e Dinastia Norte Sung, no ano de 992 d.C. (Gubler, 1998; Gubler, 2006). Outros possíveis surtos de dengue ocorreram em 1635 nas Índias Ocidentais e em 1699 no Panamá (McSherry, 1982). Portanto, é provável que o dengue já apresentasse uma ampla distribuição geográfica mesmo antes do século XVIII, quando grandes epidemias ocorreram por todo o mundo. Porém, o dengue foi considerado, por muito tempo, uma doença benigna, com grandes epidemias acontecendo apenas em intervalos de 10 a 40 anos (Gubler & Clark, 1995).

O termo dengue originou-se na Espanha e foi introduzido na literatura médica inglesa entre 1827 e 1828, durante uma epidemia de exantema com artralgia ocorrida

no Caribe. Em 1869, foi estabelecido pelo *London Royal College of Physicians* para denominar esta enfermidade, até então referida na literatura como "febre articular", "febre quebra ossos", "dinga", "polka", entre outros (Siler *et al.*, 1926; Halstead, 1980). Este termo é um homônimo espanhol para o Swahili "Ki denga Pepo", que significa pancada ou golpe, causada por um espírito do mal, que provoca um ataque doloroso semelhante à cãimbra (Halstead, 1980; CDC, 2006).

A transmissão do DENV pelo *Ae. aegypti* foi demonstrada em 1906 por Bancroft, sendo confirmado por estudos subseqüentes (Siler *et al.*, 1926; Rosen *et al.*, 1954). O sucesso do estabelecimento do ciclo urbano do DENV se deu, em grande parte, devido à expansão do mosquito africano *Ae. aegypti*. Esses mosquitos evoluíram de forma a se tornarem intimamente associados com os humanos, tornando-se eficientes vetores dos DENV e do vírus da febre amarela (FA) (Gubler, 1997).

A partir do século XVII, devido ao transporte de escravos oriundos da África, o *Ae. aegypti* foi levado para os demais continentes e as epidemias de dengue tornaram-se mais freqüentes e disseminadas (Holmes *et al.*, 1998).

O vírus foi inicialmente isolado no Japão por meio da inoculação de material clínico em camundongo (Kimura & Hotta, 1944), na mesma ocasião amostras dos DENV foram isoladas em março de 1944 durante a Segunda Guerra Mundial, a partir de soros de soldados que contraíram a infecção em Calcutá (Índia), Nova Guiné e Havaí (Sabin, 1952). Os vírus provenientes da Índia, do Havaí e de uma das cepas de Nova Guiné foram antigenicamente semelhantes e denominados DENV-1. Atualmente, a cepa Havaí é considerada amostra protótipo. Outras cepas de Nova Guiné apresentaram características antigênicas diferentes, permitindo a identificação de outro sorotipo, que foi classificado como DENV-2, hoje considerado protótipo. Posteriormente, dois novos vírus foram isolados durante uma epidemia ocorrida em Manila (1953). Estes vírus foram classificados como DENV-3 e DENV-4 (Hammon *et al.*, 1960) e as cepas H87 (DENV-3) e H241 (DENV-4) consideradas protótipos.

Foi, contudo, após a Segunda Guerra Mundial que ficou evidente a mudança no comportamento da doença. O crescimento populacional, a urbanização descontrolada, a falta de programas efetivos para o controle do vetor e o aumento das viagens comerciais

contribuíram para a expansão geográfica do mosquito transmissor e do vírus, permitindo o estabelecimento de uma pandemia que persiste até hoje (Gubler, 1997).

Apesar da elevada transmissão epidêmica e hiperendemicidade, a epidemia de dengue manteve-se localizada no Sudeste Asiático devido principalmente, ao programa de erradicação do *Ae. aegypti* nas Américas, para controle da febre amarela urbana, nas décadas de 50 e 70 (Rigau-Pérez *et al.*, 1998; Gubler, 2002). Após a interrupção desse programa no final dos anos 70, o *Ae. aegypti* voltou a infestar a maioria dos países americanos (Gubler, 2002).

Durante os anos 80, verificou-se a expansão geográfica das epidemias de dengue envolvendo a região das Américas, bem como a África, China e a Austrália, tendo como distribuição mundial, as mudanças ocorridas no ambiente e no comportamento da população humana (Monath, 1994).

Durante o período de 2000 a 2006, foram reportados cerca de 545 mil casos em 44 países (Gómez-Dantés & Willoquet, 2009). Estima-se que ocorram anualmente, de 50 a 100 milhões de casos de DC, com cerca de 500 mil casos de FHD e/ou SCD, e aproximadamente dois mil óbitos, principalmente em crianças (WHO, 2002). Na década de 50, somente nove países apresentavam o DENV. Atualmente cerca de mais de 100 países no mundo já registraram a doença (Whitehead, 2007; Gómez-Dantés & Willoquet, 2009) (Figura 2).

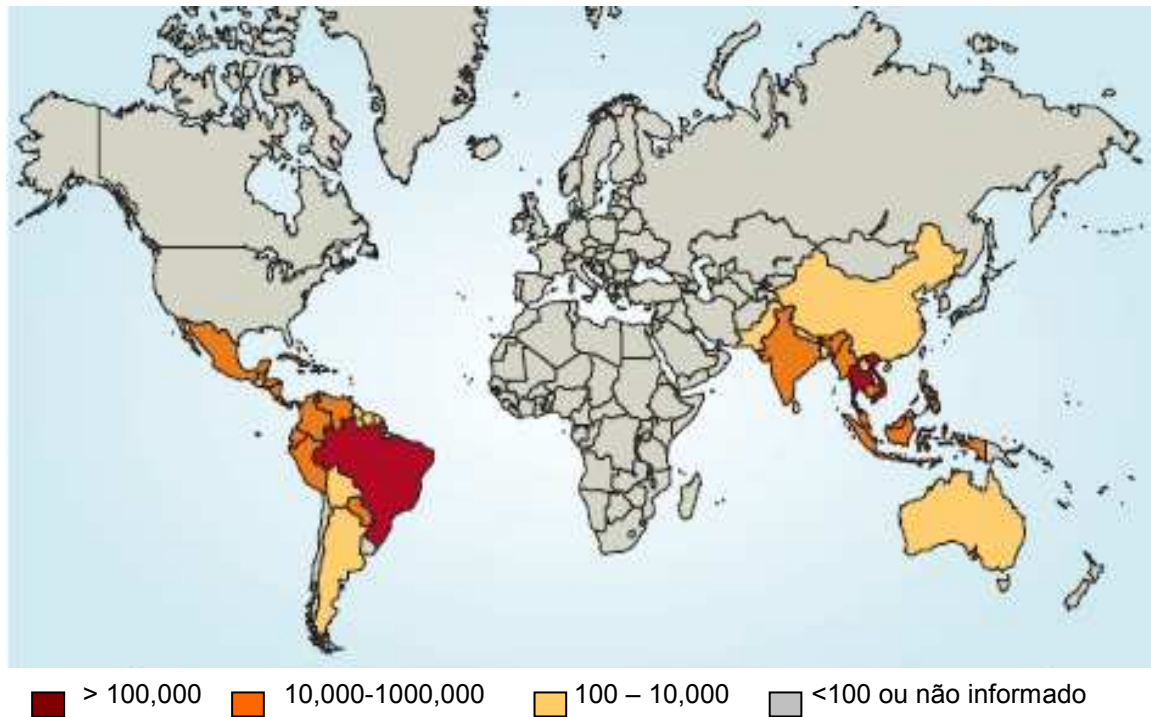


Figura 2: Casos de DENV em áreas endêmicas do mundo durante 1995 - 2005 (adaptado de Whitehead, 2007)

1.2 Epidemiologia dos DENV

1.2.1 Dengue nas Américas

No Continente Americano, foram registradas a partir de 1896, inúmeras epidemias em intervalos irregulares, nos Estados Unidos (EUA) e em países do Caribe. Os sorotipos envolvidos nestas epidemias não eram conhecidos até 1953, quando foram isoladas as primeiras amostras de DENV-2. Dez anos depois, foram isoladas as primeiras amostras de DENV-3 em Porto Rico, sendo estes dois sorotipos responsáveis pelas epidemias ocorridas no continente na década de 60 (Gubler, 1992). Ainda nesta década, houve uma tentativa de erradicação do mosquito *Ae. aegypti* das Américas, porém a descontinuidade do programa de erradicação no início dos anos 70, resultou na reinfestação deste vetor pelo Continente Americano (Schliesman & Calheiros, 1974; Pinheiro, 1989; Gubler, 1997).

Em 1977, o DENV-1 foi introduzido nas Américas e, nos anos seguintes, este mesmo sorotipo foi isolado nos EUA, que até então, não apresentava casos autóctones de dengue (Gubler, 1992). No período de 1977 até 1980, foram notificados mais de 700.000 casos da doença, praticamente todos estes causados pelo DENV-1 (PAHO, 1989). No mesmo período, o DENV-3 apresentou pouca atividade na região com o último isolamento ocorrido em 1978 em Porto Rico (Anonymus, 1995).

No ano de 1981, o DENV-4 foi introduzido no Continente e, durante esta década, além da expansão da área de transmissão e do aumento do número de casos notificados, ocorreu em Cuba, a primeira epidemia de FHD/SCD das Américas. Nesta epidemia, causada pelo DENV-2, foram notificados cerca de 344.000 casos com aproximadamente 116.000 internações e 158 óbitos (Kouri *et al.*, 1986; Gubler, 2006). Entre 1981 e 1996 foram notificados aproximadamente 42.000 casos de FHD/SCD, distribuídos em 25 países. Deste total, cerca de 22.000 casos ocorreram na Venezuela, onde foram isolados DENV-1, DENV-2 e DENV-4, o que a consagrou como a segunda maior epidemia de FHD/SCD das Américas (PAHO, 1997).

Em 1994, se deu a re-introdução do DENV-3 na Nicarágua, tendo este sorotipo sido isolado nos anos seguintes, em todos os países da América Central (Guzmán *et al.*, 1996). Em 1998, o DENV-3 foi detectado em Porto Rico seguido pelo isolamento do DENV-4 (Rigau-Pérez *et al.*, 2002).

Atualmente, ocorre a circulação dos quatro sorotipos do DENV em vários países da América do Sul e Caribe (Guzmán & Kouri, 2002; Figueroa & Ramos, 2000).

Durante as últimas três décadas, o continente Americano evoluiu de uma situação não-endêmica para hiperendêmica, onde se observou um aumento na densidade vetorial, na co-circulação de múltiplos sorotipos de DENV, na endemicidade de FHD e em um aumento na frequência da atividade dos DENV (Gubler, 1997). Nos primeiros cinco anos da década atual, o número de notificação de casos foi praticamente o dobro daquele reportado na década anterior (Figura 3) (Nathan & Dayal- Drager, 2006).

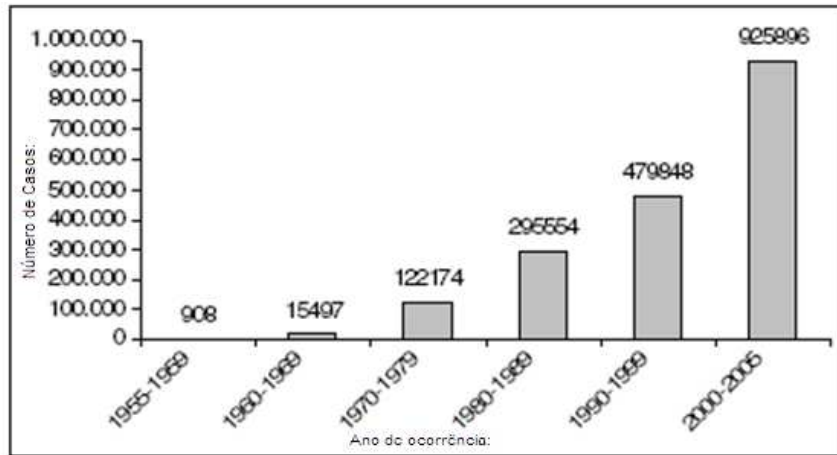


Figura 3: Número de casos de dengue, reportados à OMS, por década nas Américas (adaptado de Nathan & Dayal- Drager, 2006).

No ano de 2002, mais de 30 países latino-americanos registraram mais de 1 milhão de casos de DC, sendo que cerca de 750 mil casos foram reportados apenas pelo Brasil. Casos de FHD foram registrados em mais de 20 países com mais de 17 mil casos de FHD e 225 óbitos (PAHO, 2002).

Esse número apresentou uma queda significativa entre 2003 e 2005, voltando a crescer a partir de 2006, com 552.141 casos registrados, sendo 14.459 de FHD. No ano de 2008, nas Américas, foram registrados 908.926 casos de dengue, sendo 25.696 de FHD com 306 óbitos (PAHO, 2003, 2004, 2005, 2006, 2008).

Em 2009, até a 13ª semana epidemiológica, foi reportado um total de 215.824 casos de dengue, incluindo 3.022 casos graves de dengue e 69 óbitos. Até esta data, 36% do total de óbitos estavam concentrados na Bolívia, seguido pelo Brasil, com 33% dos óbitos ocorridos. A co-circulação de dois sorotipos foi observada em 4 países e a múltipla circulação de 3 ou 4 sorotipos em 7 países. Na Venezuela e Nicarágua foi observada a co-circulação dos 4 sorotipos virais (PAHO, 2009).

1.2.2 Dengue no Brasil

Surtos de dengue datam de 1864 no Rio de Janeiro (RJ) e que, provavelmente, ocorreram nas regiões sul, sudeste e nordeste durante o século XIX (Figueiredo, 2000). Em 1917, ocorreu um surto de dengue na cidade de Curitiba e no estado do Rio Grande do Sul (Figueiredo, 1998), assim como em 1922 e 1923 na cidade do RJ (Figueiredo, 2000).

Em 1955, houve a confirmação da erradicação no mosquito *Ae. aegypti* no Brasil, graças a uma campanha iniciada em 1904 por Oswaldo Cruz. Esta provavelmente foi a razão para a ausência de surtos de dengue entre 1923 a 1981 (Figueiredo, 2000). Porém, a reintrodução do *Ae. aegypti* no país na década de 70 foi inevitável, já que a campanha de erradicação do mosquito foi descontinuada (Schatzmayr, 2000).

A primeira epidemia com confirmação laboratorial ocorreu em 1981, em Boa Vista, onde cerca de 11.000 pessoas foram infectadas, sendo identificados DENV-1 e 4 (Osana *et al.*, 1983; Nogueira *et al.*, 1988, 2000). Após esta epidemia, o vírus e o vetor se dispersaram por todo o país e surtos de dengue passaram a ocorrer em todas as regiões brasileiras, incluindo as áreas mais populosas.

Entretanto, foi apenas a partir de 1986 que o dengue tornou-se um problema de saúde pública, com a introdução do DENV-1 no estado do RJ e sua disseminação para as regiões nordeste e centro-oeste (Nogueira *et al.*, 2000).

No ano seguinte, alguns estados do nordeste foram afetados e a incidência de dengue alcançou 64.6 por 100 mil habitantes (Figura 4). A transmissão do DENV foi tão intensa que de acordo com as estimativas baseadas nos exames sorológicos de 1986 e 1987 no Rio de Janeiro, estimou-se que mais de um milhão de pessoas foram contaminadas pelo DENV-1 (Schatzmayr *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1988; Figueiredo *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 2009).

As circunstâncias ambientais permaneceram receptivas à circulação do DENV e alguns anos depois a situação foi agravada pela introdução do DENV-2 em 1990, também no estado do RJ, com a ocorrência de casos de DC e os primeiros casos de FHD (Nogueira *et al.*, 1993, 2002). Posteriormente, o DENV-2 foi identificado também no nordeste brasileiro e na região amazônica (Figueiredo, 2000).

No início de 1994, o aumento progressivo na incidência da doença no país foi devido à circulação do vírus em mais de 600 municípios distribuídos em 18 estados brasileiros (Nogueira *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 2009). Em 1998, o Brasil foi responsável por 85% do número de casos de dengue notificados nas Américas (Nogueira *et al.*, 2000) e a incidência alcançou 345.7 casos por 100 mil habitantes. Em 1999, 50% dos 5.507 municípios brasileiros já tinham relatado casos de DC e o *Ae. aegypti* já tinha sido detectado em 64% deles (Teixeira *et al.*, 2009). A ocorrência de casos de FHD nos anos 90 foi relativamente baixa (0.06%), considerando a intensa circulação simultânea dos sorotipos DENV-1 e DENV-2.

A incidência do dengue nos primeiros dois anos do século XXI no Brasil permaneceu elevada, com 141.0 e 239.4 casos por 100 mil habitantes em 2000 e em 2001, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2009). Com a introdução de DENV-3 em 2002, também no RJ, houve um aumento acentuado dos casos de DC (446.2 casos por 100 mil habitantes) e de FHD (Nogueira *et al.*, 2005).

O sorotipo DENV-3 se dispersou rapidamente pelo território brasileiro, praticamente substituindo os sorotipos DENV-1 e DENV-2 das várias cidades nos anos subsequentes (Teixeira *et al.*, 2005) e modificou a epidemiologia do dengue no Brasil, com características de hiperendemicidade (Nogueira *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2009a).

Entre os anos de 2003 a 2005, houve um decréscimo no número de casos notificados de dengue, no estado do RJ (9.242, 2.694 e 2.580, respectivamente), sendo considerados como interepidêmicos. Porém, a partir do ano de 2006, o número de casos de dengue aumentou, sendo notificados 31.054 casos. Desde 2003 até o mês de maio de 2007, o DENV-3 foi o único sorotipo isolado. Contudo, a partir do mês abril de 2007, observou-se a re-emergência do DENV-2. Este sorotipo causou uma grave epidemia no ano de 2008 com um total de 259.392 casos dos 734.384 casos notificados no Brasil (PAHO, 2008; SVS, 2009).

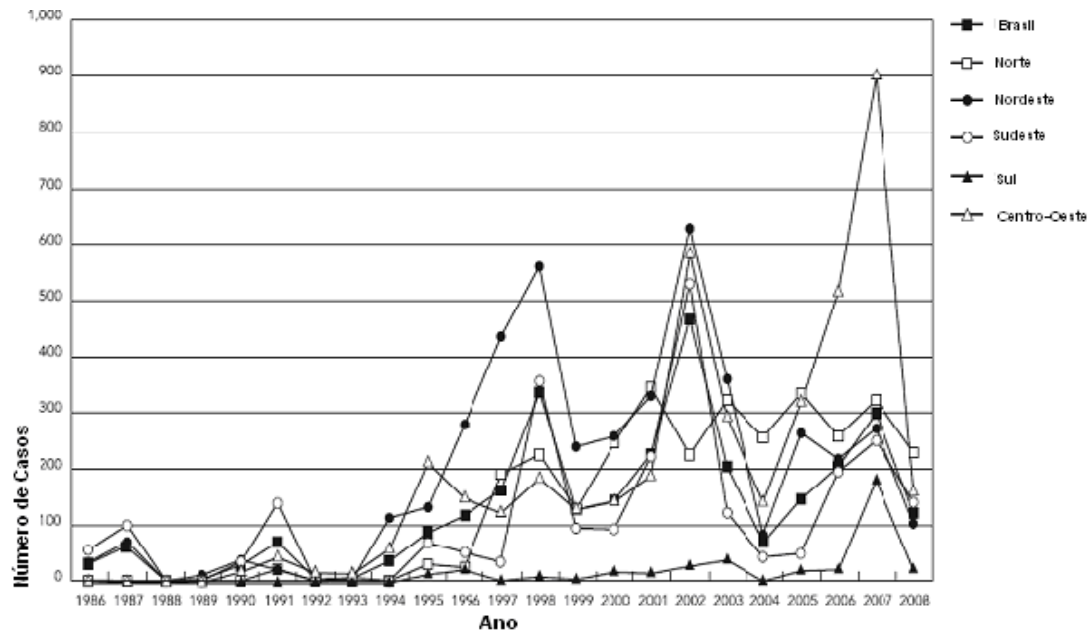


Figura 4: Incidência de dengue de acordo com a região geográfica e ano de ocorrência, Brasil, 1986 - 2008 (adaptado de Teixeira *et al.*, 2009).

Taxas de mortalidade abaixo de 1% por FHD são consideradas aceitáveis, mas no Brasil estas taxas são ainda elevadas, variando de 1.45% , em 1995 a 11.25% em 2007. As epidemias de DC e FHD no Brasil tinham sido caracterizadas por maior incidência na população adulta (Siqueira *et al.*, 2005; Cordeiro *et al.*, 2007b), um padrão diferente do observado na maioria do Sudeste Asiático, onde ambas as manifestações da doença são mais frequentes em crianças (Ooi *et al.*, 2006). Entretanto, no primeiro semestre de 2007 houve uma mudança repentina no padrão observado no Brasil, com um aumento significativo na proporção de casos de FHD em menores de 15 anos (Figura 5), observado inicialmente no nordeste (Teixeira *et al.*, 2009). Este fato ocorreu igualmente no RJ no início de 2008, onde 50% dos casos de DC, 48% das internações e 36% dos óbitos ocorreram em menores de 15 anos (SES/RJ, 2008).

As autoridades brasileiras de saúde adotaram medidas como, o treinamento de profissionais de saúde, a organização de serviços sanitários durante períodos epidêmicos, o desenvolvimento de campanhas de consciência pública, o diagnóstico precoce e o tratamento da FHD a fim reduzir o número de casos fatais (Teixeira *et al.*, 2009).

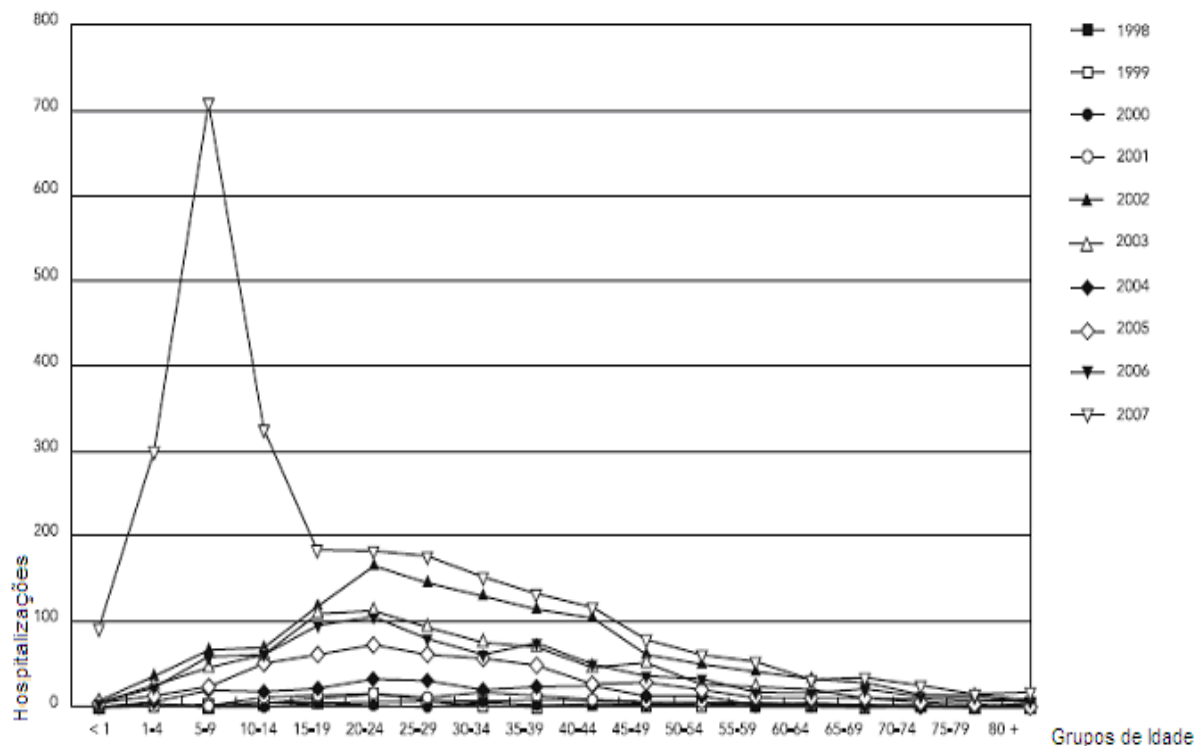


Figura 5: Número de hospitalizações por FHD de acordo com o grupo de idade, 1998 – 2007 (adaptado de Teixeira *et al.*, 2009).

Entre 1981 e 2009, 5.423.999 casos de dengue foram notificados no Brasil, onde mais de três milhões ocorreram nos anos de 2000 a 2008, quando 72% dos municípios do país (3.977 / 5.507) foram infestados com o *Ae. aegypti* (SVS, 2008; PAHO, 2009). De 2000 a 2007 houve um aumento principalmente no número de casos da FHD (6.455), representando 0.21% de todos os casos relatados de dengue (SVS, 2007). Esta proporção, embora 3.5 vezes mais alta do que nos anos 90, é considerada ainda relativamente baixa em comparação ao Sudeste Asiático (Halstead, 2006).

As notificações de casos suspeitos de dengue nas quinze primeiras semanas de 2009 apresentaram uma redução de 49% quando comparadas com o mesmo período de 2008. Até a 15ª semana epidemiológica de 2009, um total de 226.513 casos suspeitos de dengue foram registrados, incluindo 1.416 casos graves e 87 óbitos foram confirmados (SVS, 2009).

As maiores incidências da doença foram observadas nos estados do Acre, Roraima, Espírito Santo e Bahia. Cerca de 72% dos FHD ocorreram em 5 estados:

Bahia (30%), Espírito Santo (15.8%), Mato Grosso (11.5%), Roraima (9%) e Minas Gerais (6%) (SVS, 2009). Em 2008, no mesmo período, ocorreram 2.531 casos de FHD e 11.799 de dengue com complicações (DCC).

No Brasil o monitoramento da circulação viral tem demonstrado o isolamento dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, com o predomínio para o sorotipo DENV-2 (47,2%). As atividades de monitoramento da circulação viral foram reforçadas com a implantação de 59 unidades sentinelas utilizando a técnica de captura do antígeno NS1 em 16 estados e 25 municípios estratégicos. Até o presente momento não há evidência epidemiológica da circulação do DENV-4 no Brasil (SVS, 2009). Atualmente, 26 das 27 Unidades Federativas já registraram epidemias de dengue. Apenas o estado de Santa Catarina não possui registro de casos autóctones sendo considerado até o momento como casos importados (SVS, 2009).

1.3 Agente etiológico

O DENV exhibe considerável diversidade antigênica, sendo que critérios sorológicos foram utilizados para detectar os quatro sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), os quais divergem, em aproximadamente, 30% em suas seqüências protéicas (Mackenzie *et al.*, 2004; Holmes, 2006).

Analisando-se o sequenciamento do genoma viral, os quatro sorotipos foram agrupados em diversos genótipos. Com isso, o estudo da filogenia tem demonstrado 5 genótipos para o DENV-1 (genótipos I – V) (Ong *et al.*, 2008), 6 genótipos para o DENV-2 (genótipo Asiático I, Asiático II, Asiático/Americano, Americano, Cosmopolita e Selvagem) (Ong *et al.*, 2008; Zaki *et al.*, 2008), 5 genótipos para o DENV-3 (genótipos I – V) (Araújo *et al.*, 2009b) e 3 genótipos para o DENV-4 (genótipo Indonésia, Malásia, Sudeste Asiático) (Rico-Hesse, 2003).

O vírion tem formato esférico, diâmetro entre 40 e 60 nanômetro (nm) e genoma RNA (ácido ribonucléico) de fita simples e polaridade positiva. O genoma é infeccioso, comportando-se como um RNA mensageiro (RNAm) (Chambers, 1990). O nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, composto por uma única proteína, a proteína C (capsídeo) está envolvido por uma bi-camada lipídica a qual constitui o envelope.

Embebidas na bi-camada do envelope, encontram-se a proteína E (envelope) e a proteína M (membrana), que também pode ser encontrada em sua forma não processada prM (pré-membrana) (Figura 6) (Chen *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 2003).

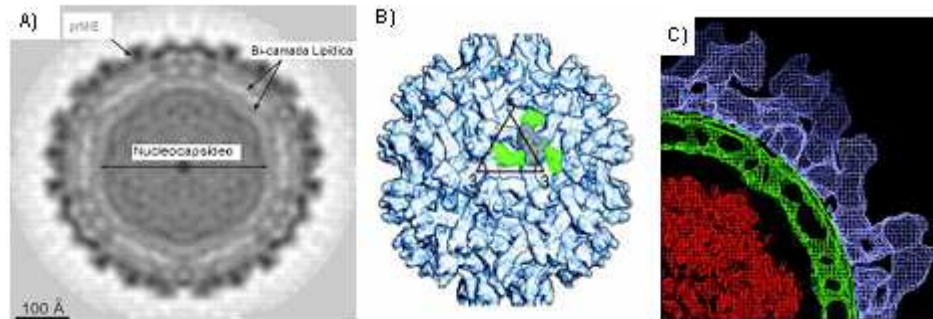


Figura 6: Organização estrutural dos DENV (A – C) (adaptado de Zhang *et al.*, 2003).

O genoma do vírus tem um comprimento aproximado de 11 kb (Kilo-bases) com uma única fase aberta de leitura flanqueada por regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3' (Burke & Monath, 2001). Essas regiões não traduzidas são altamente conservadas e fundamentais para iniciar a replicação do RNA viral e para a regulação da tradução da poliproteína precursora viral (Alvarez *et al.*, 2006).

O RNA possui um *cap* tipo I na sua extremidade 5', mas não há seqüência de poli-A na extremidade 3'. O RNA é traduzido como uma seqüência única a partir do primeiro ou segundo códon AUG presente na porção codificadora da molécula, resultando em uma poliproteína de cerca de 3.400 aminoácidos, que é clivada *co* e *pós* traducionalmente por proteases do vírus e do hospedeiro em três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Rice *et al.*, 1985; Lindenbach & Rice, 2001).

A topologia da poliproteína na membrana do retículo endoplasmático rugoso de células infectadas pode ser observada na Figura 7.

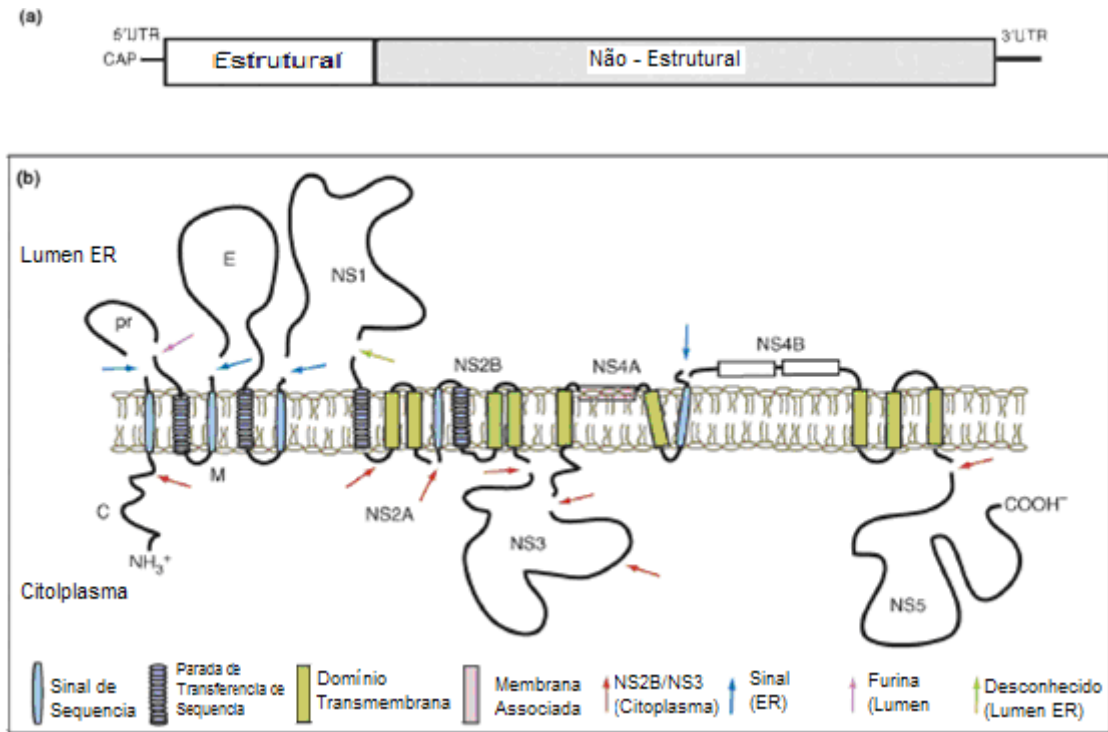


Figura 7: (a) Diagrama esquemático do genoma e da (b) poliproteína dos DENV (adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

1.4 Proteínas Virais

A proteína C, que possui peso molecular de 13 Kilodaltons (KDa) (Khromykh, 1997), é a primeira a ser sintetizada, sendo capaz de interagir com o RNA formando o capsídeo viral (Chang, 1997).

Uma clivagem proteolítica na precursora prM durante a maturação viral dá origem a proteína M. Este processo de clivagem da prM em M ocorre antes da extrusão viral da célula hospedeira, sendo essencial para a organização da estrutura superficial e infectividade do vírus. A presença de prM pode ser necessária para o correto dobramento da proteína E (Lorenz *et al.*, 2002).

A glicoproteína E, que compõe o envelope viral formando projeções na superfície do vírus, contém determinantes antigênicos para hemaglutinação, neutralização (Henchal *et al.*, 1985) e, também, inclui o receptor que se liga às células permissivas e leva a fusão da membrana do envelope com a do endossoma, após a penetração viral.

A proteína E é um importante fator de virulência viral (Wengler, 1987) e é o alvo dominante das respostas humorais contra o DENV (Glyde *et al.*, 2006).

As proteínas não estruturais NS1, NS3 e NS5 possuem maior peso molecular e são as mais conservadas entre os *Flavivirus*. Dentre as proteínas não estruturais, a NS2a é a primeira das quatro proteínas pequenas a ser sintetizada, possuindo 22 KDa, e está implicada no processamento da NS1, além de ser hidrofóbica e de função desconhecida (Henchal & Putnak, 1990; Nestorowicz, 1994).

A proteína NS2b forma um complexo com NS3, necessário para a função serino-protease de NS3 (Jan, 1995). A NS3 é uma proteína citoplasmática relativamente grande, de 70 KDa, funcionando como serino-protease envolvida na clivagem pós-translacional da poliproteína viral e também tem função de RNA helicase e RNA trifosfatase (Gorbalenya, 1989 a b; Perera & Kuhn, 2008).

As proteínas NS4a e NS4b são proteínas relativamente pequenas, de 16 KDa e 27 KDa respectivamente. A NS4a está envolvida com alterações de membranas intracelulares cruciais para replicação (Miller *et al.*, 2007), e enquanto a NS4b auxilia a NS3 durante a replicação do RNA viral (Umareddy *et al.*, 2006).

A NS5 é uma provável RNA polimerase dependente de RNA de origem viral, sendo a maior proteína, com aproximadamente 103 KDa e é a mais conservada (Rice, 1985; Perera & Kuhn, 2008).

1.4.1 Proteína NS1

A NS1 foi reconhecida primeiramente como antígeno FCS (fixação de complemento solúvel) em cultura de célula infectada pelo DENV (Brandt *et al.*, 1970). O antígeno FCS foi reconhecido como uma glicoproteína viral de 46 kDa (gp46) (Smith & Wright 1985) e posteriormente denominado como NS1 pela analogia ao NS1 do FAV (Rice *et al.*, 1985). Contém cerca de 350 a 354 aminoácidos e 12 resíduos de cisteína, e é altamente conservada. O gene que a codifica não apresenta códon de início e de finalização e a estrutura molecular da proteína geralmente é dimérica (Varas, 2003). Está ausente na partícula viral e é produzida em duas formas: associada às membranas (mNS1) e secretada (sNS1) (Winkler *et al.*, 1989, Falconar *et al.*, 1990, Lindenbach &

Rice, 2001). Dentre as proteínas não estruturais, é a mais conservada apresentando elevado grau de reação cruzada entre os 4 sorotipos (Zainah *et al.*, 2008).

Após a tradução, a NS1 é primeiramente translocada para o retículo endoplasmático via seqüência sinal da porção C-terminal da proteína E como proteína de fusão. A NS1 é então, processada e dimerizada no retículo endoplasmático (Winkler *et al.*, 1989) e funciona como co-fator da polimerase de RNA viral (Mackenzie *et al.*, 1996, Lindenbach *et al.*, 1999). Em solução, a NS1 forma uma estrutura hexamérica, liga-se na superfície da célula infectada via ligação com as glicosaminoglicanas e acumula-se no soro ou plasma em grande quantidade (até 50ug/mL) (Alcon *et al.*, 2002, Libraty *et al.*, 2002, Avirutnan *et al.*, 2006). Porém, esta forma hexamérica não é encontrada em células derivadas de mosquito vetor (Crooks *et al.*, 1990, 1994; Pryor & Wright, 1993; Flamand *et al.*, 1999), mas acredita-se possuir também papel importante na replicação viral em células de mosquito (Crabtree *et al.*, 2005). Em cultura, *in vitro*, o antígeno NS1 liga-se a células epiteliais e fibroblastos e muito pouco a leucócitos mononucleares, enquanto *in situ* liga-se a tecidos humanos e de camundongos. Esta ligação da NS1 às células endoteliais *in vivo* poderia levar ao aumento da permeabilidade vascular que ocorre nas infecções secundárias tanto pelo reconhecimento por anticorpos anti-NS1 como pela formação de complexos imunes (Avirutnan *et al.*, 2007).

A função da NS1 na infecção pelo DENV ainda não foi totalmente conhecida. Porém alguns estudos, além de avaliarem a detecção de NS1 como ferramenta para o diagnóstico, identificou uma correlação entre a gravidade da doença e a quantidade desse antígeno no soro (Young *et al.*, 2000; Libraty *et al.*, 2002). A detecção precoce de altas concentrações de NS1 como ferramenta para prever a evolução clínica da doença tem sido postulada, mas não avaliada (Libraty *et al.*, 2002). De acordo com Avirutnan e colaboradores (2006) níveis séricos aumentados da proteína NS1 solúvel podem ativar o sistema complemento, com a expressão de NS1 nas células infectadas resultando na ligação de anticorpos não-neutralizantes além, de criar focos de complexos imunes, dano endotelial e extravasamento capilar. Falconar e colaboradores (1997) associaram a formação de imunocomplexos com a NS1 e sua ligação nas células endoteliais como um fator de gravidade contribuindo para o extravassamento de plasma.

A proteína NS1, juntamente com as proteínas NS3 e E, estimulam a ação citotóxica dos linfócitos, restando, após a primoinfecção, uma quantidade decrescente de anticorpos subneutralizantes e a presença das células de memória sensibilizadas especificamente para os DENV (Guimarães, 1999).

Estudos recentes sugerem que a proteína NS1 possa contribuir para a imunopatologia do dengue. Níveis plasmáticos elevados de NS1 em crianças foram associados com o dengue grave, refletindo possivelmente aumento da carga viral nesses pacientes (Libraty *et al.* 2002; Avirutnan *et al.*, 2006).

1.5 Replicação dos DENV

Os DENV são inoculados pelo mosquito no espaço intradérmico, ocorrendo a replicação viral. As células de Langerhans presentes na pele, são susceptíveis à infecção pelos vírus sendo os primeiros alvos *in vivo* (Wu *et al.*, 2000).

As principais células alvo de infecções pelos DENV incluem monócitos, macrófagos e células dendríticas (Jessie *et al.*, 2004). Porém, já foi evidenciada a replicação em células dendríticas intersticiais (Wu *et al.*, 2000) células de Kupffer, macrófagos alveolares e células endoteliais (Jessie *et al.*, 2004; Clyde *et al.*, 2006; Yauch & Shresta, 2008).

Os DENV replicam no citoplasma celular, após período de latência de 12 a 16 horas, nas células dos vertebrados, e este processo relaciona-se à proliferação de organelas no retículo endoplasmático. Os DENV entram na célula por ligação específica da proteína E com receptores celulares, incluindo DC-SIGN-específico ICAM-CD3 (Lozach *et al.*, 2005) e receptores de manose (Miller *et al.*, 2008), seguido do processo de endocitose (Chambers, 1990).

Muitas células podem ser infectadas na presença de anticorpos específicos para o DENV, num processo conhecido pelo termo facilitação dependente de anticorpo do Inglês “*antibody-dependent-enhancement*” (ADE) da infecção, onde anticorpos são opsonizados e internalizados via receptor de imunoglobulina Fc γ (Fc γ R) expresso nas células alvo (Yauch & Shresta, 2008). Uma vez na vesícula endocítica e após acidificação do lisossomo, ocorre uma mudança conformacional irreversível da proteína

E viral, de dímero para trímero, que passa a expor seu domínio fusogênico, ocorrendo à fusão do envelope viral com o lisossomo (Figura 8) (Gollins, 1986; Perera & Kuhn, 2008).

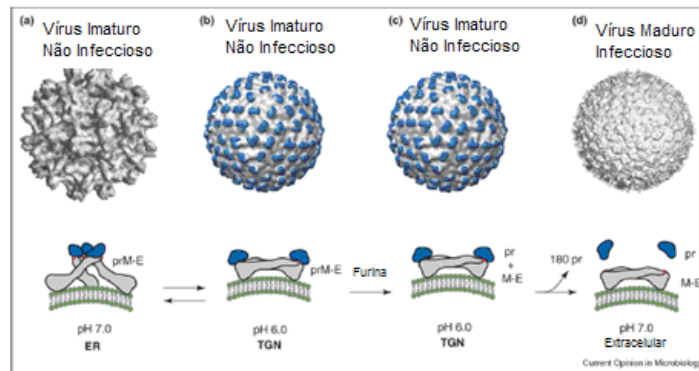


Figura 8: Mudança conformacional da proteína E dos DENV durante a replicação viral. (a – c) Vírus imaturo não infeccioso, (d) Vírus maduro infeccioso (adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

O nucleocapsídeo é liberado no citoplasma onde o RNA genômico funciona como RNAm, ocorrendo tradução do mesmo por ribossomos celulares em três proteínas estruturais e, por serino proteases virais, em sete proteínas não estruturais. A NS5, juntamente com outras proteínas virais e celulares associadas às membranas perinucleares, catalisa a replicação do RNA. Um RNA de polaridade negativa, assimétrico é produzido para servir como molde na síntese de RNAs de polaridade positiva da progênie.

O acúmulo de RNAs de polaridade negativa é observado 3 horas após a infecção, apesar de sua concentração ser 10 vezes inferior à do RNA com polaridade positiva. Os RNAs genômicos são envolvidos pelas proteínas estruturais como parte do processo de montagem das partículas da progênie, o que ocorre no retículo endoplasmático. A maturação dos vírions ocorre em membranas intracelulares no aparelho de Golgi e as partículas virais sofrem exocitose (Figura 9) (Chambers, 1990; Nawa, 1998; Tomlinson *et al.*, 2009).

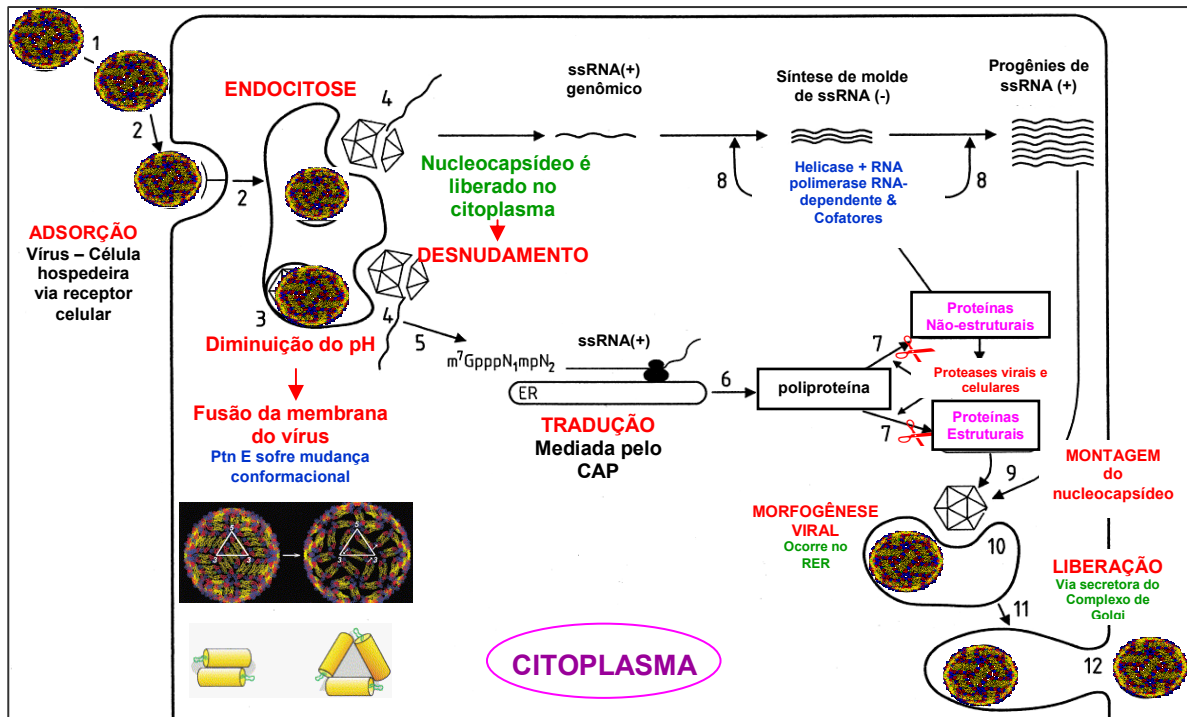


Figure 9: Diagrama esquemático da replicação dos DENV (adaptado de Tomlinson *et al.*, 2009).

1.6 Manifestações Clínicas

O dengue é uma doença febril aguda causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais (Edelman & Hombach, 2008), que pode causar manifestações clínicas semelhantes, porém podem variar em intensidade de acordo com as características do hospedeiro e do vírus (Rothman e Ennis, 1999).

O período de incubação pode variar de 3 a 15 dias, mas é, em média, de 4 a 7 dias, após o qual a doença poderá evoluir para as seguintes formas clínicas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS): assintomática, indiferenciada ou oligossintomática, DC e FHD/SCD.

Alguns indivíduos podem ser infectados pelos DENV e não apresentar sintomas, em razão das características da baixa virulência do vírus, ou do estado imunológico do indivíduo. É a forma clínica mais comum, e estima-se que, durante as epidemias, ocorra um caso sintomático para cada cinco casos assintomáticos. Na forma oligossintomática

não se pode diferenciar clinicamente o dengue de outras viroses. Apresenta-se como febre indiferenciada, assemelhando-se à síndrome gripal (Souza *et al.*, 2008).

1.6.1 Dengue Clássico (DC)

No DC a febre é geralmente de início súbito podendo alcançar até 40°C, decrescendo dia a dia. Dura, em média, 2 a 7 dias e pode ser bifásica com melhora em torno do terceiro ou quarto dia por 12 a 24 horas, para ressurgir em seguida por mais 1 a 2 dias. Os sintomas do DC incluem febre, cefaléia, dor retro-orbital, sintomas gastrointestinais, mialgia, artralgia e rash (Souza *et al.*, 2008).

Anorexia, náuseas, vômito e diarreia podem ser observadas por 2 a 6 dias (SVS, 2007). Alguns pacientes podem evoluir para formas graves da doença e passam a apresentar sinais de alarme, principalmente quando a febre cede que precedem as manifestações hemorrágicas graves. As manifestações hemorrágicas podem ocorrer na DC em alguns indivíduos, sendo mais comuns petéquias, equimoses, epistaxe, hemorragia gengival e metrorragias, surgindo no final do período febril (Cunha & Nogueira, 2005).

Em geral, os dados laboratoriais associados ao DC incluem leucopenia com linfocitose subsequente, marcada pela presença de linfócitos atípicos. A trombocitopenia é comum e cerca de 34% dos pacientes com DC possuem contagem de plaquetas menor do que 100.000/mm³ (Malavige *et al.*, 2004). A forma clássica é auto limitada e geralmente resulta na completa recuperação (Nishiura & Halstead, 2007).

1.6.2 Febre Hemorrágica do dengue (FHD)

A forma mais grave do dengue, segundo a classificação utilizada pela OMS, é a FHD/SCD (que possui 4 graus de gravidade) e ocorrem com maior frequência nas infecções secundárias. Embora seja representada por uma proporção menor nos indivíduos de todas as formas do dengue, a FHD é a única forma grave que é bem definida pelos seguintes critérios que são: febre, tendências hemorrágicas, trombocitopenia e extravasamento de plasma (WHO, 1997, 2002). A tendência

hemorrágica é indicada através do teste positivo do torniquete, petéquias, sangramento da mucosa e do trato gastrointestinal, hematêmese e melena (Yauch & Shresta, 2008).

Os dados laboratoriais caracterizam-se por apresentar contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$ e hemoconcentração, refletida por um aumento de 20% do hematócrito (Malavige *et al.*, 2004).

Os Graus I e II são considerados formas mais branda da FHD, enquanto os Graus III e IV representam a evolução da doença para o estágio de choque (WHO, 1997). Esta é uma classificação dinâmica e pode mudar rapidamente de acordo com a evolução e o estágio em que o paciente se encontra (Sá & Zagne, 2008).

A convalescença de pacientes com FHD/SCD é rápida (WHO, 1997). A elevação de enzimas hepáticas (alanina aminotransferase [ALT] e aspartato aminotransferase [AST]) é comum tanto na DC como na FHD/SCD (Yauch & Shresta, 2008).

Já o aumento da permeabilidade vascular pode levar a um colapso vascular com perda de fluidos com sinais de insuficiência circulatória tais como: pele fria e congestionada, inquietação e baixa pressão do pulso ($< 20\text{mm Hg}$), resultando na SCD que pode levar a morte (Nishiura & Halstead, 2007).

1.6.3 Dengue com Complicações (DCC)

O Ministério da Saúde, no Brasil, tem considerado o termo dengue com complicações (DCC), para os casos em que há dificuldade em classificar os pacientes segundo os critérios da OMS (SVS, 2008).

Dengue com complicações são casos que não se enquadram nos critérios de FHD, e quando a classificação de DC é insatisfatória. Neste contexto, a presença de um dos sinais e sintomas a seguir caracteriza o quadro: alterações graves do sistema nervoso, disfunção cardiorrespiratória, insuficiência hepática, contagem de plaquetas igual ou inferior a $50.000/\text{mm}^3$, hemorragia digestiva, derrame cavitários, leucometria global ou inferior a $1.000/\text{mm}^3$ e óbito (SVS, 2008). A grande maioria dos pacientes classificados como DCC apresenta quadros clínicos graves, que exigem uma abordagem específica e requerem internação em uma boa parte de vezes (Sá & Zagne,

2008). A classificação clínica da OMS não atende aos critérios necessários para um prognóstico precoce e a intervenção preventiva de casos graves no Brasil.

A Organização Mundial da Saúde está re-avaliando a classificação dos casos de dengue. O propósito é desenvolver uma classificação clínica mais útil do dengue para o diagnóstico precoce, triagem e o manejo do paciente. Uma iniciativa apoiada pela OMS intitulada *Dengue Control* (DENCO), está realizando um estudo de avaliação dos sinais e sintomas associados com a gravidade e em breve deverá apresentar uma nova classificação clínica com o objetivo principal de orientar médicos na identificação precoce de casos graves (Torres, 2008; WHO, 2008).

Por fim, vale salientar que uma nova classificação, qualquer que seja, deverá vir através de um consenso internacional e ser apropriada para o uso global como esquema único. Devem-se evitar dessa maneira classificações isoladas que, eventualmente, poderiam atender a particularidades regionais e populacionais específicas, mas que seriam inadequadas em outras regiões (Sá & Zagne, 2008).

Sinais de alerta tais como dor abdominal intensa e contínua, agitação ou letargia, vômitos persistentes, pulso filiforme, extremidades frias, taquicardia, sudorese, cianose, diminuição da diurese, aumento repentino do hematócrito, queda abrupta de plaquetas, desconforto respiratório, hepatomegalia dolorosa, derrames cavitários indicam a possibilidade de um agravamento do quadro clínico e evolução para FHD/SCD (SVS, 2008)

1.7 Resposta imune

A infecção em humanos por um sorotipo confere imunidade permanente contra re-infecções subseqüentes pelo mesmo sorotipo, mas apenas proteção parcial e temporária contra os outros sorotipos (Halstead, 2002; Martinez, 2008).

Tem sido observada em infecções subseqüentes por diferentes sorotipos do vírus a chance do desenvolvimento de uma forma mais grave da doença. Esse fato pode ser explicado pela teoria da ADE, segundo a qual anticorpos não-neutralizantes, adquiridos em uma infecção prévia por um vírus heterólogo, ligam-se ao novo sorotipo infectante e

facilitam sua entrada nos macrófagos, por intermédio dos receptores de Fc (receptores de imunoglobulina) (Halstead SB, 1988; Simmons *et al.*, 2006).

A resposta imunológica do hospedeiro pode ser tanto protetora quanto patogênica expressa por uma produção excessiva de citocinas, assim como pela mudança na resposta tipo TH1 para TH2, além da inversão da taxa de CD4/CD8 (Mabalirajan *et al.*, 2005). A produção excessiva de citocinas produz um aumento da permeabilidade vascular que resulta no extravasamento de plasma, alteração fisiológica fundamental do dengue, mediante a qual se perde água e proteínas para o espaço extravascular, procedendo a hemoconcentração e por vezes o choque hipovolêmico (Basu, 2008).

A viremia atinge seu pico logo após o aparecimento dos primeiros sintomas, muitas vezes antes mesmo do paciente apresentar-se doente o suficiente para recorrer a tratamento médico. Vírus circulantes permanecem, no entanto, detectáveis geralmente até o quinto dia de doença, coincidindo com o período em que os níveis de anticorpos começam a elevar-se (Vorndam & Kuno, 1997).

O isotipo dominante de imunoglobulina em uma infecção primária é a IgM. Uma pequena porcentagem dos pacientes apresenta níveis detectáveis de IgM já no primeiro dia da doença e a maioria (cerca de 93%) encontra-se positivo no sexto dia após o aparecimento dos primeiros sintomas (PAHO, 2004). Os níveis de IgM aumentam rapidamente e atingem seu pico por volta de duas semanas, permanecendo detectáveis por 2 a 3 meses, o que faz desses anticorpos indicadores de infecções recentes (Gubler & Sather, 1988).

Anticorpos IgG começam a aparecer, em uma resposta primária, alguns dias depois dos IgM, sendo detectáveis a partir do quinto dia de doença. Os títulos de IgG aumentam lentamente a partir da primeira semana de infecção e permanecem detectáveis por toda a vida. Indivíduos com imunidade prévia ao DENV ou mesmo a outro *Flavivirus* desenvolvem uma resposta secundária caracterizada pelo rápido aumento no título de IgG quase que imediatamente após o início dos sintomas e pelo alto grau de reação cruzada, mesmo contra outros *Flavivirus*, apresentado por esses anticorpos (Innis *et al.*, 1989).

Os níveis de IgM na resposta secundária são consideravelmente mais baixos do que na resposta primária (Figura 10) (WHO, 1997). A relação entre os títulos de IgM e

IgG e a especificidade dos anticorpos pode ser, portanto, usados na caracterização de respostas primárias e secundárias.

Anticorpos IgM e IgG podem ser específicos para um determinado sorotipo em algumas infecções primárias, o que geralmente em infecções secundárias não ocorre (Halstead, 2007). O grau de reação cruzada apresentada por esses anticorpos é variável e depende do antígeno e do teste diagnóstico utilizado (Vorndam & Kuno, 1997).

Anticorpos contra sete das dez proteínas codificadas pelo DENV já foram descritos (Brinton *et al.*, 1998), sendo que aqueles direcionados contra a proteína E são os únicos neutralizantes e os mais frequentemente detectados tanto em respostas primárias quanto em secundárias (Valdes *et al.*, 2000).

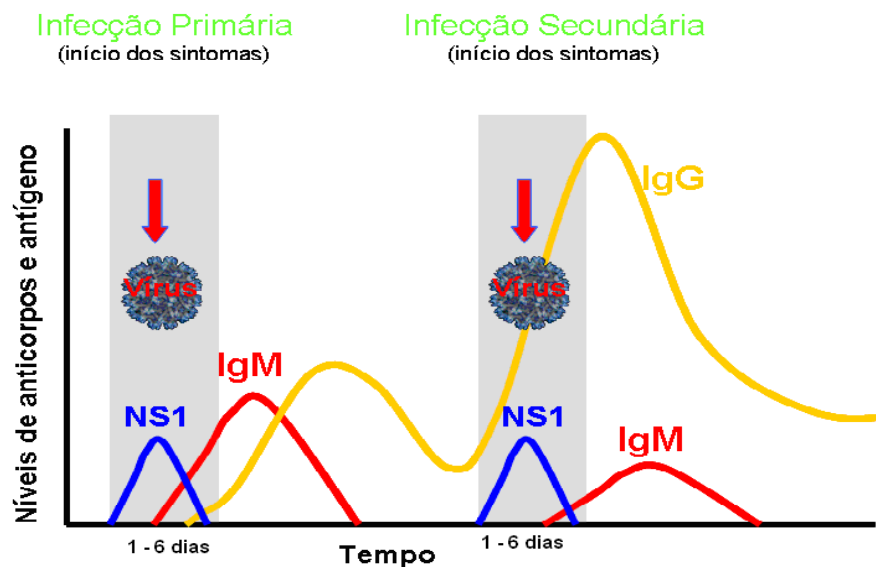


Figura 10: Níveis de anticorpos e antígeno NS1 durante as respostas primária e secundária aos DENV (adaptado de PanBio Diagnostics).

1.8 Diagnóstico laboratorial

Os métodos de diagnóstico mais utilizados nas infecções por DENV incluem o isolamento viral em cultura de células, detecção de ácido nucléico viral pelo RT-PCR, técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos, detecção de antígenos virais em tecidos através de imunohistoquímica e, mais recentemente, a pesquisa de antígeno NS1.

O estabelecimento da cultura de células de mosquito no sistema de isolamento viral representou um grande avanço aos métodos virológicos utilizados no diagnóstico do dengue (Gubler & Sather, 1988). O clone C6/36, de célula de mosquito *Aedes albopictus*, (Igarashi, 1978) tem sido o mais utilizado nas últimas décadas, pois demonstrou ser altamente sensível à infecção pelos DENV, além de sua fácil manutenção, já que pode ser mantida à temperatura ambiente (Nogueira *et al.*, 1988; Miagostovich *et al.*, 1993).

A presença viral pode ser detectada pelo efeito citopático (ECP) na monocamada celular ou pela técnica de imunofluorescência indireta, com a utilização de soros hiperimunes aos quatro sorotipos dos DENV. Para a identificação dos DENV, utilizam-se anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos (DENV 1 → 4) (Gubler *et al.*, 1984).

O ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA) tem sido, nas últimas décadas, o método de eleição para o diagnóstico das infecções pelos DENV (Kuno *et al.*, 1987; Nogueira *et al.*, 1993). É um método rápido, fácil de ser executado e tem se mostrado extremamente útil, tanto para o diagnóstico individual de dengue como para estudos epidemiológicos. Entretanto, as provas pareadas são de grande valor diagnóstico, pois possibilitam a detecção de soroconversões (Vorndam & Kuno, 1997).

Ensaio imunoenzimático de detecção de anticorpos da classe IgG (G-ELISA) (Chungue *et al.*, 1989; Miagostovich *et al.*, 1999) vêm sendo cada vez mais utilizado para a caracterização da resposta imune humoral de dengue, servindo como uma alternativa ao teste de inibição da hemaglutinação (IH) descrita por Clarke & Casals (1958), por ser uma metodologia rápida e de fácil execução.

A técnica de imunohistoquímica pode ser de grande utilidade para a detecção dos DENV em tecidos infectados. Baseia-se na conjugação de distintos marcadores, com moléculas de imunoglobulina, que com auxílio de um substrato específico localiza o antígeno tecidual. Atualmente há disponibilidade de grande número de anticorpos para uso em tecidos fixados em formol e incluídos em blocos parafina, permitindo o estudo de blocos arquivados por longos períodos, principalmente em casos fatais (Miagostovich et al., 1997).

Diversos protocolos de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), têm sido utilizados no diagnóstico rápido das infecções por dengue (Morita et al., 1991; Lanciotti et al., 1992; Brown et al., 1996; Figueiredo et al., 1997; Harris et al., 1998; DePaula et al., 2002). Esses protocolos têm sido úteis tanto para a clínica quanto para a vigilância virológica e são importantes por identificar o sorotipo infectante. Além disso, eles podem confirmar o diagnóstico em situações em que o material disponível não é adequado para o isolamento viral (Morita et al., 1991; Lanciotti et al., 1992).

O PCR em tempo real ou PCR quantitativo é uma tecnologia que apresenta o mesmo princípio de um PCR convencional, porém o produto é detectado à medida que é amplificado. Pode-se utilizar o sistema SYBR *Green*, que possui comportamento semelhante ao do brometo de etídio, intercalando-se a qualquer DNA fita dupla, ou ainda, o sistema *TaqMan*™, que consiste na utilização de uma sonda marcada nas duas extremidades por corantes fluorescentes distintos (ex., FAM e TAMRA). Diversos protocolos para a detecção dos DENV têm sido propostos desde o desenvolvimento desta nova metodologia (Drosten et al., 2002; Jhonson et al., 2005).

1.8.1 Kits Comerciais

Um dos fatores mais importantes e necessários para o diagnóstico clínico e para a vigilância epidemiológica do dengue é a disponibilidade de métodos rápidos, sensíveis e específicos para detectar a infecção viral. Neste contexto, vários testes comerciais têm sido desenvolvidos para o diagnóstico das infecções por DENV para pesquisa de anticorpos específicos (Wu et al., 1997; Kuno et al., 1998; Lam & Devine, 1998; Sang et al., 1998; Vaughn et al., 1999; Lam et al., 2000; Cuzzubbo et al., 2001). Atualmente,

vários testes de captura de IgM e IgG encontram-se disponíveis comercialmente, possibilitando a análise rápida e reprodutível de um grande número de amostras, sem a necessidade de equipamentos sofisticados (Palmer *et al.*, 1999; Vaughn *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2000). Porém, apesar das qualidades desses testes e dos avanços que eles proporcionaram na área de diagnóstico, uma importante limitação é a não detecção da doença em sua fase inicial. Com o objetivo de atender as estas necessidades, alguns ensaios imuno-enzimáticos para captura da proteína viral solúvel NS1 vêm sendo desenvolvidos com sucesso (Young *et al.*, 2000; Alcon *et al.*, 2002; Dussart *et al.*, 2006; Sekaran *et al.*, 2007; Kumarasamy *et al.*, 2007; Blacksell *et al.*, 2007; Ludert *et al.*, 2008; Lapphra *et al.*, 2008; McBride, 2009; Zainah *et al.*, 2009).

O antígeno NS1 está presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia do aparecimento dos sintomas e permanece detectável até o quinto ou sexto dia. Como essa proteína aparece no início da infecção, antes do surgimento dos primeiros anticorpos, seu uso como uma ferramenta de detecção precoce da dengue vem sendo investigada (Xu *et al.*, 2006).

Uma vez que NS1 induz, também, uma forte resposta humoral, o uso dessa proteína como antígeno em testes de detecção de anticorpos é bastante promissora (Valdes *et al.*, 2000). Os kits comerciais mais comumente utilizados atualmente para o diagnóstico do dengue estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Kits comerciais disponíveis para o diagnóstico das infecções por DENV:

Fabricante	Kit	Formato	Deteção/Captura	Diagnóstico
PanBio Diagnostics	Dengue Duo Cassete	*IC	Deteção IgM e IgG	Diferenciação entre infecções primárias e secundárias
	Dengue Duo IgM & IgG Rapid Strip Test	*IC	Deteção IgM e IgG	Diferenciação entre infecções primárias e secundárias
	Dengue IgM Capture ELISA	ELISA	Captura IgM	Deteção de infecção ativa
	Dengue IgG Capture ELISA	ELISA	Captura IgG	Diagnóstico de infecção secundária
	Dengue IgG Indirect ELISA	ELISA	Deteção IgG	Deteção de infecção passada/ ativa
	<i>pan</i> -E Dengue Early ELISA	ELISA	Captura antígeno NS1	Deteção precoce de infecção ativa
Bio Rad Laboratories	Platelia™ Dengue NS1 Ag	ELISA	Captura antígeno NS1	Infecções primárias e secundárias agudas
	Dengue NS1 Ag STRIP	*IC	Captura antígeno NS1	Deteção precoce de infecção ativa

* IC: Imunocromatografia

1.9 Prevenção e controle

No Brasil, o Ministério da Saúde propôs em 1996, o Programa de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa) com o objetivo de reduzir sua infestação, a incidência da doença e a letalidade por FHD. Entretanto, a introdução do DENV-3 no país e a re-emergência do DENV-2, com sua rápida disseminação, evidenciou a facilidade para a circulação de

novos sorotipos ou cepas virais, ressaltando a possibilidade de ocorrência de novas epidemias de DC e FHD.

Neste cenário epidemiológico, o Ministério da Saúde apresentou em 2002 o Programa Nacional de Controle de Dengue (PNCD), para a intensificação e implantação de medidas de controle, visando à redução do impacto do dengue no país (FUNASA, 2002). Porém, apesar deste programa que tem por objetivo a redução dos casos de dengue no país, a taxa de incidência apresentou um aumento de mais 50% no ano de 2008, quando comparado aos de 2006 e 2007, atingindo cerca de 390 casos por 100 mil habitantes com grande disseminação do vírus por quase todo o território nacional (SVS, 2008).

No ano de 2008, o Brasil representou 80% dos casos de dengue notificados nas Américas. O estado do RJ representou uma área de grande importância epidemiológica contribuindo com a maior parte do número de casos notificando 259.392 casos suspeitos de dengue até a 52ª semana epidemiológica de 2008, onde foram confirmados 240 óbitos. O sorotipo DENV-2 ainda predomina no estado, no entanto há uma co-circulação dos sorotipos DENV-1, 2 e 3 (SVS, 2009).

É essencial a obtenção de uma vacina tetravalente, capaz de gerar uma resposta de anticorpos elevada e duradoura, tendo em vista a possibilidade de uma reinfecção nas áreas endêmicas. Enquanto uma vacina eficaz não for desenvolvida, as medidas de controle ao vetor consistem no principal instrumento para a prevenção da infecção pelos DENV, além da melhoria dos serviços de saneamento básico e a rápida identificação dos pacientes que apresentem formas clínicas graves da doença.

1.9.1 Vacinas em desenvolvimento contra os DENV

Apesar da indisponibilidade de que possa prevenir contra as infecções por dengue, várias vacinas candidatas, em diferentes estágios de desenvolvimento estão em estudo (Konish *et al.*, 2006). Uma vacina ideal contra os DENV deve ser segura, tetravalente e eficiente, induzindo um nível de proteção semelhante ao observado após uma infecção natural para todos os sorotipos com o mínimo de imunizações possível (Whitehead *et al.*, 2007). Além disso, deve possuir um baixo custo, produzir o mínimo de reações,

apresentarem pelo menos 85% de efetividade, prover imunidade duradoura (Almond *et al.*, 2002) e ser segura para uso em crianças de 9-12 meses em áreas endêmicas (Mackenzie *et al.*, 2004).

Uma grande dificuldade para a produção de vacinas anti-DENV deve-se à falta de um modelo animal para a realização dos testes de virulência (WHO, 2002). Macacos que são suscetíveis aos vírus e representam os hospedeiros selvagens naturais apenas desenvolvem uma viremia moderada e nenhuma doença significativa, mesmo após infecção secundária (Halstead *et al.*, 1973).

As abordagens utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contra os DENV incluem vacinas vivas atenuadas após passagens seriadas em culturas de células, vacinas recombinantes atenuadas, quiméricas e de subunidades (Pugachev *et al.*, 2003).

Esforços para desenvolver uma vacina começaram em 1920 com o uso de extratos inativados de mosquito *Aedes* infectados com os vírus e continuaram durante a 2ª Guerra Mundial usando vírus atenuado por passagem em cultura de células (Hombach, 2007). Recentemente, a Fundação Bill e Melina Gates criou uma Iniciativa para uma Vacina Pediátrica contra Dengue (PDVI) e está investindo milhões de dólares para acelerar o processo de geração e testes clínicos de vacinas (WHO, 2006; Edelman, 2007). O sucesso de vacinas atenuadas, como da febre amarela, aliada ao fato dessas vacinas promoverem imunidade completa e duradoura, fez com que duas candidatas a vacina tetravalentes fossem desenvolvidas.

A primeira, foi desenvolvida pela Universidade Mahidol em Bancoc na Tailândia, juntamente com a Sanofi Pasteur, por meio de passagens sucessivas de DENV-1, 2 e 4 virulentos em células primárias de rim de cachorro (PDK) e DENV-3 em células primárias de rim de macaco verde (PGMK) (Hombach, 2007). Estudos revelaram que o componente DENV-3 era pouco atenuado, induzindo reações moderadas ou sistêmicas e mesmo esforços de rederivar molecularmente esse sorotipo não foram bem sucedidos (Sanchez *et al.*, 2006).

O exército americano, por meio do Instituto Militar de Pesquisa (*Walter Reed Army Institute of Research* [WRAIR]), desenvolveu uma vacina utilizando uma estratégia similar à empregada pela Universidade de Mahidol. Sorotipos virulentos do DENV foram

passados em células PDK para atenuação e diferentes passagens foram escolhidas para analisar o nível de atenuação, imunogenicidade e capacidade protetora em modelos animais (Whitehead *et al.*, 2007). Embora os candidatos monovalentes tenham sido bem sucedidos em testes em humanos, foi observada interferência entre os sorotipos em formulações tetravalentes testadas, com o DENV-1 apresentando-se pouco atenuado em relação aos outros sorotipos (Sun *et al.*, 2003). Os testes clínicos conduzidos pelo WRAIR e pela Glaxo Smith Kline em 16 diferentes formulações tetravalentes foram analisados em humanos (Edelman *et al.*, 2003). Formulações tetravalentes estão em teste de Fase II na América do Norte e no Sudeste Asiático (Whitehead *et al.*, 2007) e os fabricantes ainda tentam aperfeiçoar a formulação da vacina (Hombach, 2007).

O Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos também está desenvolvendo uma vacina atenuada contra o vírus. Porém, diferentemente das candidatas anteriores, técnicas de manipulação genética foram utilizadas para atenuar o vírus por meio de uma deleção de 30 nucleotídeos na sua região 3' não traduzida (Whitehead *et al.*, 2003). Outra estratégia do mesmo Instituto é o desenvolvimento de vacinas quiméricas contendo os genes prM/E dos DENV-1, 2 e 3 no vírus atenuado de DENV-4 que contém a deleção de 30 nucleotídeos na 3' não traduzida (Blaney *et al.*, 2006).

Seguindo a mesma estratégia dos vírus quiméricos, as empresas farmacêuticas Acambis e Sanofi Pasteur criaram a ChimeriVax, uma vacina quimérica onde os genes prM/E dos quatro sorotipos de DENV são inseridos no vírus vacinal da Febre Amarela FA 17D (Guirakhoo *et al.*, 2001; Guirakhoo *et al.*, 2006). Vacinas quiméricas dengue/dengue estão sendo desenvolvidas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), mas ainda se encontram em ensaios pré-clínicos (Huang *et al.*, 2003).

Uma vacina quimérica tetravalente em estudo, submetida aos testes de avaliação, produziu anticorpos neutralizantes em macacos rhesus contra os quatro sorotipos do DENV (Raviprakash *et al.*, 2006). A maioria das vacinas em desenvolvimento utiliza a proteína E do DENV para induzir resposta imune. Entretanto, sabe-se que a resposta imune mediada pela célula estimulada por essa proteína é

fraca. Por essa razão, novas abordagens para o desenvolvimento de vacinas utilizam a proteína NS1, com resultados satisfatórios em camundongos (Timofeev *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2007; Hombach, 2007).

A companhia Hawaii Biotech está investindo em vacinas recombinantes onde as proteínas E/NS1 são expressas em células S2 de *Drosophila melanogaster* (Putnak *et al.*, 2005) e testes clínicos de Fase I devem começar em breve. Existem ainda vacinas de DNA sendo desenvolvidas pelo Centro de Pesquisas Médicas da Marinha Americana (Raviprakash *et al.*, 2003, 2006; Hombach, 2007).

Após a realização de estudos satisfatórios em pequenos animais e primatas não-humanos, as vacinas candidatas devem completar os estudos de Fase 1 e 2 (segurança e imunogenicidade) e o estudo de Fase 3 (eficácia vacinal) em populações selecionadas. Apesar do grande otimismo, a liberação de uma vacina efetiva contra os quatro sorotipos do DENV, ainda requer anos de pesquisa e testes clínicos em seres humanos. As principais tentativas para o desenvolvimento de vacinas contra o dengue estão apresentadas na Tabela 2 (Cordeiro *et al.*, 2007a).

Tabela 2: Lista parcial das vacinas candidatas contra os DENV (adaptado de Hombach *et al.*, 2007).

Estratégia	Responsável pelo projeto	Antígeno ou gene dos DENV	Fase Clínica
Viva, atenuada, produzida em célula PDK	Mahidol/Sanofi Pasteur	Todos os 10 genes de DENV	Fase 2, tetravalente
Viva, atenuada, produzida em célula FRhL *	WRAIR/GSK Biologicals	Todos os 10 genes de DENV	Fase 2b, tetravalente
Viva, atenuado por deleção da 3'	U.S. NIAID, Universidade Johns Hopkins	Todos os 10 genes de DENV	Fase 1-2, monovalente
Viva, com deleção da 3' Quimérica DEN/DEN	U.S. NIAID, Universidade Johns Hopkins	8 DENV-4, 2 quiméricas	Fase 1-2, monovalente
Viva, produzida por mutações pontuais na 3'	U.S. FDA		Pré-clínica (primatas não humano)
Viva, atenuada com vetor de DENV-2, Quimérica DEN/DEN	InViragen/Shanta	Todos os 10 genes de DENV (somente DENV-2)	Pré-clínica (primatas não humano) Programado para estudo em humano
Viva, atenuada com vetor FA17D	Acambis, Sanofi Pasteur	8 genes de FA, 2 genes e DENV-2 quimérica	Fase 1-2, tetravalente
Sub-unidade de antígeno recombinante, adjuvantes	Hawaii Biotech	2 (80%E e NS1)	Pré-clínica (primata não humano) Programado estudo em humano

FRhL: Célula de pulmão de feto de macaco Rhesus

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O dengue é um problema de saúde pública em muitos países tropicais e subtropicais do mundo. A inexistência de uma vacina licenciada e de terapias antivirais específicas requer um diagnóstico sensível e específico essenciais à vigilância da doença. O diagnóstico precoce pode guiar a implementação de medidas de controle do vetor, atuando preventivamente na expansão de surtos e epidemias.

As técnicas de diagnóstico mais utilizadas tem sido baseadas na detecção de anticorpos IgM e IgG anti-DENV por meio do MAC-ELISA e IgG-ELISA (Huang *et al.*, 2001). Porém, uma das limitações consiste na variação dos percentuais variáveis de detecção destes anticorpos durante a fase aguda da doença. Geralmente, são necessários de 3 a 5 dias para anticorpos IgM anti-DENV e de 1 a 14 dias para anticorpos IgG anti-DENV se tornam detectáveis, além de apresentarem diferentes perfis de indução em infecções primárias e secundárias (Schilling *et al.*, 2004).

Durante a fase aguda da infecção por DENV, a proteína NS1 é produzida associada à membrana ou pode ser secretada da superfície da célula infectada (Mason, 1989; Westaway *et al.*, 1997, Lapphra *et al.*, 2008; McBride, 2009), sendo encontrada circulando no soro de pacientes apresentando infecção primária ou secundária (Young *et al.*, 2000). Pode ser detectada até 9 dias após o início dos sintomas, tanto de pacientes com DC quanto FHD e antes mesmo que o IgM se torne detectável (Alcon *et al.*, 2002; Lapphra *et al.*, 2008).

A disponibilidade de testes comerciais para a captura do antígeno NS1 de DENV no soro agudo fornece uma ferramenta diagnóstica adicional às abordagens existentes como o PCR, sorologia e isolamento viral. Estudos recentes já demonstraram a sensibilidade e especificidade de testes comerciais para a captura de NS1 para o diagnóstico laboratorial das infecções por dengue (Kumarasamy *et al.*, 2007; Blacksell *et al.*, 2008; Dussart *et al.*, 2008; Lapphra *et al.*, 2008; McBride, 2009; Zainah *et al.*, 2009; Hang *et al.*, 2009; Chaiyaratana *et al.*, 2009).

Portanto, neste estudo, visamos avaliar a sensibilidade e especificidade dos três testes comerciais de captura de antígeno NS1 de DENV disponíveis no mercado em casos provenientes de epidemias ocorridas no estado do Rio de Janeiro de 1986 a 2008.

Diante da situação epidemiológica do dengue no país, com a co-circulação de três sorotipos e ocorrência de sucessivas epidemias, o diagnóstico precoce se torna de grande importância para atender as necessidades do SUS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de três kits comerciais de captura de antígeno NS1 (pan-E DENGUE EARLY ELISA - PanBio Diagnostics; Dengue Platelia NS1 - BioRad Laboratories e Dengue NS1 Ag STRIP; Bio-Rad Laboratories) disponíveis para o diagnóstico precoce das infecções por dengue com painel de amostras do Laboratório de Referência para Dengue e Febre Amarela no período de 1986- 2008.

3.1.1 Objetivos Específicos:

- Estudar a sensibilidade e especificidade de cada kit individualmente e em uma mesma subpopulação;
- Estudar a sensibilidade na confirmação de casos de DENV-1, DENV-2 e DENV-3;
- Estudar a sensibilidade em relação à técnica de RT-PCR, isolamento viral e MAC-ELISA;
- Estudar a sensibilidade na confirmação de casos de infecção primária e secundária por dengue;
- Realizar uma curva de detecção de NS1 no soro dos pacientes de acordo com o número de dias após o início dos sintomas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de *Flavivirus*, Laboratório de Referência Regional para Dengue e Febre Amarela, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

4.1 Definição dos casos de dengue e não-dengue

Os casos de doença aguda febril compatível com dengue de acordo com critérios da WHO (1997) e na qual a infecção foi confirmada por isolamento viral em cultura de células C6/36 (Igarashi, 1978), MAC-ELISA (Kuno et al, 1987), IgG-ELISA (Miagostovich et al, 1999) e RT-PCR (Lanciotti et al, 1992). Casos suspeitos apresentando quadro febril onde não houve confirmação por nenhuma metodologia disponível no laboratório e casos de indivíduos saudáveis foram definidos neste estudo como casos não-dengue. As amostras de casos de indivíduos saudáveis foram obtidas de doadores saudáveis do Banco de sangue, Hemocentro, no Hospital Universitário Clementino Fraga, UFRJ. As amostras foram doadas após a confirmação de testes sorológicos negativos para VDRL (sífilis), Doença de Chagas, Hepatites Virais (HBSag, anti-HCV) e Anti- HIV1 e HIV2.

4.2 Amostras clínicas

As amostras analisadas neste estudo foram obtidas a partir da coleção de soros do Laboratório de *Flavivirus*, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Foram examinadas amostras ($n=852$) do primeiro ao nono dia após o início dos sintomas, de casos ocorridos desde a introdução do dengue no Rio de Janeiro em 1986 até o ano de 2008. Os pacientes que foram incluídos neste estudo informaram por escrito o consentimento livre e esclarecido e este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP: 274/05).

Um total de **852** amostras foram analisadas pelo pan-E ELISA (PanBio Diagnostics), **845** amostras analisadas pelo NS1 Ag Strip (BioRad Laboratories) e **450** amostras analisadas pelo NS1 Dengue Platelia (BioRad). Uma subpopulação de **450**

amostras foi utilizada com o intuito de se comparar o desempenho dos três kits comerciais de captura do antígeno NS1 entre si.

Para a avaliação dos kits comerciais de captura de NS1 de DENV, um painel de amostras previamente caracterizadas foram distribuídas em 10: Grupo A: soros de pacientes infectados por DENV-1, Grupo B: soros de pacientes infectados por DENV-2, Grupo C: soros de pacientes infectados por DENV-3, Grupo D: soros de pacientes onde a infecção foi confirmada por MAC-ELISA, porém onde o sorotipo não pôde ser identificado, Grupo E: soros de indivíduos saudáveis, Grupo F: soros de casos suspeitos de dengue, mas que não foram confirmados após a realização do diagnóstico laboratorial de referência, Grupo G: soros de pacientes positivos para febre amarela, Grupo H: soros de pacientes vacinados para febre amarela, Grupo I: soros de pacientes positivos para sarampo e Grupo J: soros de paciente positivos para rubéola. A distribuição das amostras nos grupos de acordo com os kits comerciais utilizados está apresentada na Tabela 3. As amostras de pacientes positivos para rubéola e sarampo foram gentilmente cedidas pela Dr^a Marilda Siqueira do Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo /IOC-FIOCRUZ.

Tabela 3. Distribuição dos Grupos de amostras analisadas de acordo como o kit de captura de antígeno NS1 avaliado.

Grupo	Nº. de amostras analisadas		
	pan-E PanBio	NS1 Platelia	NS1 Ag Strip
A (casos de DENV1)	100	50	100
B (casos de DENV2)	100	50	100
C (casos de DENV3)	100	58	122
D (casos IgM positivo)	126	62	100
Total dos grupos A-D	426	220	422
E (pessoas saudáveis)	30	30	30
F (pessoas negativas para dengue)	277	86	274
G (casos de febre amarela)	22	20	22
H (vacinados para febre amarela)	47	44	47
I (casos de sarampo)	16	16	16
J (casos de rubéola)	34	34	34
Total dos grupos E-J	426	230	423
Total analisado	852	450	845

4.3 Isolamento Viral

O isolamento viral foi realizado em cultura de células de mosquito *Ae. Albopictus* clone C6/36 (Igarashi, 1978).

As células foram incubadas a 28°C em meio Leibovitz (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) (L15, Leibovitz, 1963) e mantidas por repiques semanais. Tubos foram preparados com 1,5 mL da suspensão celular em meio L-15 com 2% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os soros diluídos 1/10 em meio L-15 foram inoculados em alíquotas de 0,05 mL. Após inoculação, os tubos foram incubados a 28°C e observados diariamente, por um período de até dez a quatorze dias, em microscópio óptico invertido (Zeiss - Deutschland, Germany), com aumento de até 800 vezes.

As culturas que não apresentaram ECP (efeito citopático) após o 10° dia de inoculação foram testadas com fluido ascítico hiperimune de camundongo (Instituto Evandro Chagas – PA) para dengue, pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção dos DENV, sendo as reações negativas consideradas como isolamento negativo.

As culturas que apresentaram reação positiva pela IFI para detecção ou pela observação de ECP foram processadas pela técnica de IFI para a tipagem viral, empregando-se, neste caso, anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos dos DENV (Instituto Evandro Chagas – PA) (Henchal *et al*, 1982; Gubler *et al*, 1984).

Após agitação, os tubos de células inoculados foram mantidos a 4°C por no mínimo 2 horas para a sedimentação das células. Aproximadamente 1ml do fluido de cada cultura foi retirado e as células ressuspensas no meio restante.

Para a detecção viral, cerca de 0,025 mL de suspensão celular foram depositadas em lâminas de 26 x 76 mm (Biolab Merieux, New Zealand). Após secagem à temperatura ambiente, as células foram fixadas com acetona P.A. (VETEC QUÍMICA FINA LTDA) a - 20°C durante 20 minutos. Controles de células infectadas e não infectadas foram incluídas em cada grupo de lâminas processadas.

Após secagem à temperatura ambiente, foi adicionado 0,025 mL de fluido ascítico hiperimune de camundongo inoculado com DENV-2/Nova Guiné B (Research Reference

Reagent, Bethesda, USA), do inglês "mouse immune ascitic fluid" (MIAF), diluído 1:50 em PBS pH 7,5.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos e deixadas à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram adicionados 0,025 mL de anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (Antibodies Incorporated, Davis, USA.), diluído 1:30 em preto de naftaleno (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) a 0,1% e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após duas lavagens em PBS pH 7,2 por 10 minutos, as lâminas foram rinsadas com água destilada, colocadas à temperatura ambiente para secagem e montadas com glicerina tamponada (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) e lamínulas (24 x 60 mm) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

Para a tipagem viral, foi preparada uma lâmina para cada amostra, adicionando-se cerca de 0,025 mL de suspensão celular em cada círculo. As lâminas foram colocadas à temperatura ambiente para secagem e fixadas com acetona a -20°C durante 20 minutos.

Em cada círculo, foram adicionados 0,025 mL de anticorpos monoclonais específicos para os DENV-1(15F3), DENV-2 (3H5), DENV-3 (5D4) e DENV-4 (1H10) (Henchal *et al*, 1982), diluídos 1:50 (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) e 1:20 (DENV-2) em PBS pH 7,5. Controle positivo (MIAF diluído 1:120 em PBS pH 7,5) e controle negativo (PBS pH 7,5) foram adicionados para cada amostra testada.

Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos e deixadas à temperatura ambiente para secagem. A seguir, foram adicionados 0,025 mL de IgG de cabra anti-camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) diluída 1:30 em preto de naftaleno (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) 0,1% em PBS pH 7,5. Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos, rinsadas em água destilada, deixadas à temperatura ambiente para secagem, montadas com glicerina tamponada (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) e cobertas por lamínulas (24 x 50 mm).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss, Deutschland, Alemanha), com aumento de 400 vezes, equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão HBO 50 W e jogo de filtro convencional (FT 510 / LP 520).

4.4 Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído do soro pelo método da sílica, de acordo com o protocolo descrito por Boom *et al.* (1990) ou pela utilização do QIAmp Viral RNA mini Kit (Qiagen, USA) seguindo recomendações do fabricante.

4.4.1 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti *et al.* (1992) para detecção e tipagem dos DENV a partir de amostras de soro. Este protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento *semi-nested*, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos (em pb) para cada sorotipo dos DENV.

Em uma primeira etapa, foram utilizados iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as seqüências dos genes C e prM. No procedimento *semi-nested*, foram utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase para a tipagem dos vírus dengue.

Oligonucleotídeo iniciador* (Sentido do primer)	Seqüência (5´ - 3´)	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (em pares de base [pb])
D1 (+)	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG	134-161	511
D2 (-)	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644	
TS1 (-)	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482 (D1 + TS1)
TS2 (-)	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252	119 (D1 + TS2)
TS3 (-)	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	290 (D1 + TS3)
TS4 (-)	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527	392 (D1 + TS4)

* Invitrogen

O RNA extraído foi transcrito reversamente em cDNA (42°C/60 minutos) em uma primeira etapa e as condições de termociclagem para a amplificação do DNA consistiram de 35 ciclos de desnaturação (94°C/35 segundos), anelamento (55°C/1 minuto), extensão (72°C/2 minutos) e um ciclo de extensão final (72°C/5 minutos) utilizando os reagentes descritos na Tabela 5.

Para a tipagem dos DENV, os produtos obtidos na primeira etapa foram diluídos (1/100) e submetidos a 18 ciclos de desnaturação (94°C/30 segundos), anelamento (55°C/1 minuto), extensão (72°C/2 minutos) e extensão final (72°C/5 minutos) utilizando os reagentes descritos na Tabela 4. Após a Nested –PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% acrescido de brometo de etídeo (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) por 45 minutos e visualizados em luz ultravioleta.

Tabela 5: Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Reagentes	RT-PCR (1X)	Semi-nested PCR (1X)
Água livre de nucleases (Promega Corporation, Madison, USA)	39,5 µl	39,2 µl
10 X Tampão PCR livre de Mg *	5,5 µl	5,5 µl
10 mM desoxinucleotídios (dNTPs)*	4,0 µl	4,0 µl
0,1 M Dithiothreitol (DTT)*	0,25 µl	-
10 µM iniciador D1 *	0,13 µl	0,13 µl
10 µM iniciador D2 *	0,13 µl	-
10 µM iniciadores TS1-4 *	-	0,25 µl
40 U/µl RNAsin *	0,25 µl	-
5 U/µl Taq DNA Polimerase*	0,25 µl	0,25 µl
2,5 U/µl enzima AMV-RT*	0,063 µl	-
50 mM Cloreto de Magnésio*	1,2 µl	1,2 µl

* Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

4.5 MAC-ELISA

Foi empregado o teste imunoenzimático de captura de imunoglobulinas da classe M (MAC-ELISA) descrito por Kuno *et al.* (1987), com modificações.

Após 5 lavagens em PBS pH 7,4, as placas de poliestireno de fundo chato (Immulon II Dynatech Ind.) foram sensibilizadas com 0,1 mL anti-IgM humana (Kirkegaard & Perry Laboratories) diluída 1/200 em tampão carbonato/ bicarbonato 0,1 M pH 9,6. As placas foram incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C e em seguida, foram lavadas com PBS pH 7,4 por 5 vezes.

Como solução bloqueio, foram distribuídos 0,2 mL de soro albumina bovina (SAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) 4% em PBS pH 7,4. As placas foram incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 15 minutos e lavadas com

PBS pH 7,4 por 5 vezes. Foram adicionadas 0,05 mL de cada soro diluído 1/10 em 20% de soro humano normal (SHN) em PBS 7,4.

Após incubação em câmara úmida por duas horas à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS pH 7,4. Foram adicionados 0,05 mL dos antígenos virais (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) diluídos em SHN a 20%.

As placas foram incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C e após 5 lavagens com PBS pH 7,4, foram adicionados 0,025 mL de anticorpo monoclonal com especificidade para o gênero *Flavivirus*, conjugado com peroxidase (HRP-conjugated 6B6C-1/ Jackson Immuno Research), diluído 1/80 em 20% de SHN em PBS 7,4. As placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C.

Após 7 lavagens com PBS pH 7,4 foram adicionados 0,1 mL de substrato, resultante da mistura de igual volume de ABTS (2,2' -azino-di[3-etil-benthiazoline sulfonate]) e peróxido de hidrogênio (Kirkegaard & Perry Laboratories).

Após período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente foi realizada leitura visual e em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 410 nm (Multiskan MCC, Thermo Electron Corporation).

4.6 IgG-ELISA

Foi utilizado o ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgG anti-DENV conforme descrito por Miagostovich *et al.* (1999).

A classificação da resposta imune como primária ou secundária é resultante da análise dos títulos de IgG de acordo com o número de dias de doença após o início dos sintomas (Tabela 6).

Tabela 6: Critérios para interpretação do tipo de resposta imune de acordo com os títulos de IgG e dias de doença após o início dos sintomas (Miagostovich *et al.*, 1999).

	Dias após o início dos sintomas			Resposta Imune
	≤ 5 dias	6 - 9 dias	≥ 10 dias	
Títulos de IgG	< 160	< 10.240	≤ 40.960	Primária
	≥ 160	≥ 10.240	>40.960	Secundária

Microplacas Immulon II (Dynatech Ind.) foram lavadas uma vez com PBS pH 7.4. Foram adicionados 0,1mL de fluido ascítico hiperimune (mistura de anti-DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M pH 9.6 e as placas foram incubadas em câmara úmida à 4 °C por 18 horas.

Após 3 lavagens com PBS pH 7,4, os orifícios foram bloqueados adicionando-se diluente padrão (PBS pH 7.4, Tween 20 a 0,05%, soro normal de cabra a 3%). Após incubação em câmara úmida por 1 hora a 37°C, 0,075 mL de uma mistura de antígeno (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) diluída em diluente padrão, foram aplicadas a cada orifício e as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C.

Após serem lavadas 3 vezes em PBS 7,4, 0,1mL de soro diluído 1:40 em tampão de diluição (PBS pH 7.4, Tween 20 a 0,05%, leite em pó desnatado a 3%) foi adicionado ao primeiro orifício e 0,075 mL nos orifícios restantes. Foram realizadas diluições seriadas na razão 4, até o último orifício, transferindo e misturando 0,025 mL da amostra.

As placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C, lavadas 3 vezes com PBS 7,4 e 1 vez com diluente padrão. Foram adicionados 0,04mL de anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), diluído 1/1500 em tampão de diluição.

Após incubação em câmara úmida por 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS pH 7,4 e 0,1 mL de substrato, resultante da mistura de iguais volumes de ABTS (2,2' -azino-di[3-etil-benthiazoline sulfonate]) e peróxido de hidrogênio (Kirkegaard & Perry Laboratories) foi adicionado a cada orifício. Após 30 minutos à temperatura ambiente foi realizada leitura visual e em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 410 nm (Multiskan MCC, Thermo Electron Corporation) e títulos de IgG anti-DENV determinados, de acordo com as diluições máximas obtidas para cada amostra.

4.7 Kits comerciais para captura de antígeno NS1 de DENV

4.7.1 pan-E DENGUE EARLY ELISA (PanBio Diagnostics)

O teste é baseado em ensaio imunoenzimático em microplacas (cat. N ° E-DEN01P, lote n ° 06263; Panbio, Brisbane, Austrália) para detectar antígeno NS1 dos DENV, em soro humano ou plasma. O teste utiliza anticorpo monoclonal anti-NS1 conjugado com peroxidase. Se o antígeno NS1 estiver presente na amostra, um complexo imune-MAb-NS1-MAb/peroxidase será formado. Para o uso, os reagentes e os espécimes clínicos deverão estar em temperatura ambiente (21-22°C). Adicionaram-se 100µL dos espécimes clínicos e controles diluídos em seus respectivos orifícios e estes foram incubados por 60 min a 37°C.

As placas foram lavadas 6 vezes e 100 µL do conjugado anti-NS1 MAb HRP foram adicionados em cada orifício. Após incubação por 60 min a 37°C, as placas foram lavadas 6 vezes. Cem microlitros do substrato (Tetrametilbenzidina / H₂O₂) foram adicionados a cada orifício e as placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente em câmara escura. A presença de imunocomplexos é demonstrada pelo desenvolvimento de uma cor azul e a reação enzimática é interrompida pela adição de 100µL de H₃PO₄ a 1 M.

A densidade óptica (DO) foi obtida pela leitura em espectrofotômetro com filtro de 450-620nm e a quantidade de antígeno NS1 presente na amostra sérica foi determinada pela comparação do DO da amostra com a DO do controle.

O valor de corte corresponde ao valor médio das densidades ópticas dos três calibradores vezes o fator de calibração, fornecido pelo fabricante. Os resultados são expressos sob a seguinte forma, divide-se o valor da densidade óptica da amostra pelo valor de corte e em seguida multiplica-se por dez, onde obtem-se a unidade PanBio. Os resultados foram calculados como "unidades Panbio", com resultados <9,0, 9,0-11,0, e ≥ 11,0 definidos como negativo, inconclusivo e positivo, respectivamente. Amostras que inicialmente obtiveram resultado inconclusivo foram novamente testadas para confirmação do resultado.

4.7.2 Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories)

O teste Platelia™ Dengue NS1 Ag é um método imunoenzimático em fase única, do tipo sanduíche, em formato de microplaca, para captura do antígeno NS1 do DENV no soro ou plasma humano. O teste utiliza anticorpos monoclonais de camundongo (Mab) para a captura e a revelação.

Foram adicionados a cada orifício previamente sensibilizado com Mab, 50 µL do diluente, 50 µL do soro e 100 µL do conjugado simultaneamente. As placas foram incubadas durante 90 minutos a 37°C. Na presença do antígeno NS1 na amostra, forma-se um complexo imune Mab-NS1-Mab/peroxidase.

Após as 6 lavagens, a presença do complexo imune é revelada por adição de 160 µL, em cada poço, de uma solução reveladora (Tetrametilbenzidina/ H₂O₂). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a reação é parada por adição de 100 µL da solução de parada (H₂SO₄).

A DO obtida a 450/620 nm é proporcional a quantidade de antígeno NS1 presente na amostra testada. A presença do antígeno NS1 numa amostra individual é determinada por comparação entre a DO da amostra com a DO do controle.

O valor de corte corresponde ao valor médio das densidades ópticas das duplicatas de calibradores. Os resultados são expressos sob a seguinte forma, divide-se o valor da densidade óptica da amostra pelo valor da média dos calibradores. Os valores calculados e com resultados <0.5, 0.5 – 1.0, e ≥ 1.0 são definidos como negativo, inconclusivo e positivo, respectivamente. Amostras que inicialmente obtiveram resultado inconclusivo foram novamente testadas para confirmação do resultado.

4.7.3 Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories)

O Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) é um teste imunocromatográfico (TIC) para a detecção rápida do antígeno NS1.

Uma gota do tampão de migração foi adicionada a 50µL do espécime clínico em um tubo de hemólise e uma fita do teste foi colocada no tubo por 15 minutos.

A fita possui duas linhas: uma linha controle (C) (complexo de partículas coloidais de biotina - ouro revestidas com estreptavidina) e uma linha teste (T) (anticorpos monoclonais anti-NS1 (Mab) - NS1 Ag – complexo de partículas de ouro coloidais revestido com anti-NS1 MAb).

O aparecimento das linhas T e C após um tempo de migração de 15 minutos (min) indicam um resultado positivo. O surgimento apenas da linha C indica um resultado negativo. Se a linha C não estiver presente, o ensaio é considerado nulo e deve ser repetido (Figura 11). Foram avaliadas todas as amostras aos 15 min (15 min TIC) e, em seguida, aos 30 min (30 min TIC).

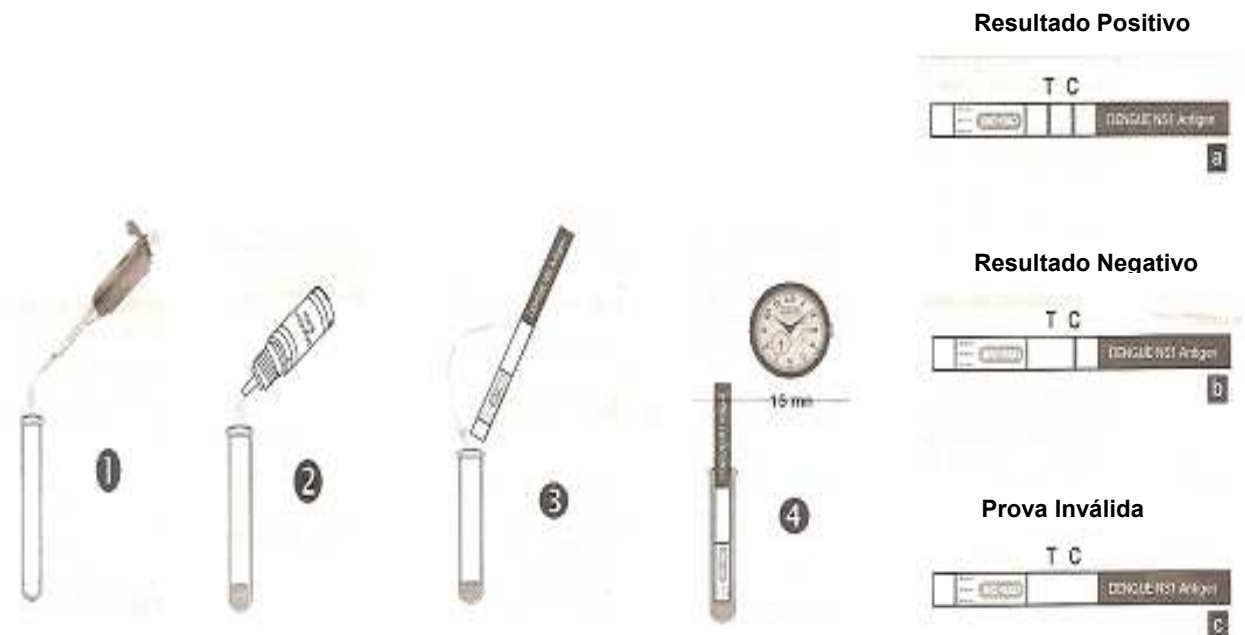


Figura 11: Diagrama esquemático da realização do kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories).

4.8 Análises Estatísticas

A sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo negativo e valor preditivo positivo foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

Sensibilidade: $a/a+c \times 100\%$

Especificidade: $d/d+b \times 100\%$

Eficiência: $a+b/a+b+c+d \times 100\%$

Valor preditivo negativo: $d/d+c \times 100\%$

Valor preditivo positivo: $a/a+b \times 100\%$

Onde: a= número dos verdadeiros positivos

b= número dos falsos positivos

c= número dos falsos negativos

d= número dos verdadeiros negativos

Os resultados obtidos foram postos em planilhas do Microsoft Excel e avaliada pelos testes qui-quadrado e/ou Fisher. O programa estatístico utilizado no processamento e análise dos dados foi o EPIINFO versão 6 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta).

5 RESULTADOS

A avaliação dos kits de captura do antígeno NS1 dos DENV foi realizada com painel de 852 amostras de soros de pacientes da coleção de amostras do Laboratório de *Flavivirus*, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. As amostras foram representativas desde a primeira epidemia de dengue no RJ, em 1986, até o ano de 2008, compreendendo tanto períodos interepidêmicos como períodos epidêmicos.

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram previamente testadas por todas as metodologias de referência disponíveis no Laboratório de *Flavivirus*. Portanto, o diagnóstico da infecção foi definido com bases nestes parâmetros.

O teste de sensibilidade dos três kits comerciais avaliados foi realizado baseado nos Grupos A a D, soros representativos de casos positivos de DENV-1, 2 e 3 e casos positivos pela sorologia, onde o sorotipo não pôde ser identificado, respectivamente. A especificidade foi baseada na análise dos resultados obtidos nos Grupos E e F, soros de indivíduos sadios e soros considerados negativos para dengue, respectivamente por todas as metodologias utilizadas para o diagnóstico na fase aguda .

Para avaliação da reação cruzada com outras doenças os Grupos de G a J foram investigados. Algumas reações inespecíficas e/ou cruzadas foram observadas em indivíduos negativos para DENV, vacinados para o VFA e/ou positivos para rubéola. Todas as amostras com resultado inconclusivo foram retestadas e excluídas ou re-incluídas após análise dos resultados.

5.1 Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics)

Para a avaliação do Kit pan-E Dengue Early ELISA da PanBio, foram testadas 852 amostras biológicas, divididas em amostras positivas (casos dengue) e negativas (casos não-dengue). Uma sensibilidade total de 72% (308 / 426) considerando casos até o 9º dia após o início dos sintomas e com especificidade de 100%.

Quando somente os soros agudos (0 a 6 dias) foram considerados, a sensibilidade foi de 72,2%. A sensibilidade variou de 71% a 86% dependendo do sorotipo viral

analisado (Tabela 7). Uma menor sensibilidade foi observada em soros de pacientes infectados pelo DENV-3.

Tabela 7: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com o sorotipo viral (n=300).

Casos Positivos	NS1 Pos / Test	Sensibilidade (%)
Grupo A: casos DENV-1	81 / 100	81
Grupo B: casos DENV-2	86 / 100	86
Grupo C: casos DENV-3	71 / 100	71
TOTAL	238 / 300	79

Dos 426 soros de pacientes com infecção por dengue, 126 foram confirmados por MAC-ELISA (Grupo D, casos de IgM positivo). A sensibilidade do kit em relação à presença ou ausência de IgM também foi avaliada. Na presença de IgM (Grupo D; n= 126) a sensibilidade foi de 55% (70/126), significativamente menor do que quando comparada com os casos positivos por RT-PCR e/ou isolamento viral (Grupo A-C) de 79% ($p < 0,001$, Odds ratio de 4,80 e 95% de IC 2,99 – 7,71). A Tabela 8 apresenta a comparação da detecção do antígeno NS1 na ausência e presença de anticorpos IgM.

Tabela 8: Comparação da sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) em relação aos casos onde há presença e ausência de IgM (n= 426).

Anticorpo IgM	NS1 Pos / Test	Sensibilidade (%)
Ausência (Grupo A-C)	238 / 300	79
Presença (Grupo D)	70 / 126	55
Total	308 / 426	72

Em casos positivos por isolamento viral, a sensibilidade foi de 84% e em casos positivos por RT-PCR foi de 67%. Porém, em amostras positivas por ambas as metodologias, a sensibilidade foi de 93% (Tabela 9).

Tabela 9: Sensibilidade do pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) em casos confirmados por Isolamento viral e/ou RT-PCR (n=300).

Casos confirmados (+)	NS1 Pos / Test	Sensibilidade (%)
RT-PCR (apenas)	75 / 111	67
ISOL (apenas)	121 / 144	84
ISOL e PCR	42 / 45	93
Total	238 / 300	79

A sensibilidade do kit também foi avaliada de acordo com o número de dias após o início dos sintomas. A análise (Grupo A – D) revelou que o antígeno NS1 pode ser detectado até o 6º dia após o início dos sintomas em aproximadamente 70% e decrescendo com o surgimento e elevação dos anticorpos IgM. A Figura 12 demonstra a sensibilidade de detecção do antígeno NS1 de acordo com o número de dias após o início dos sintomas.

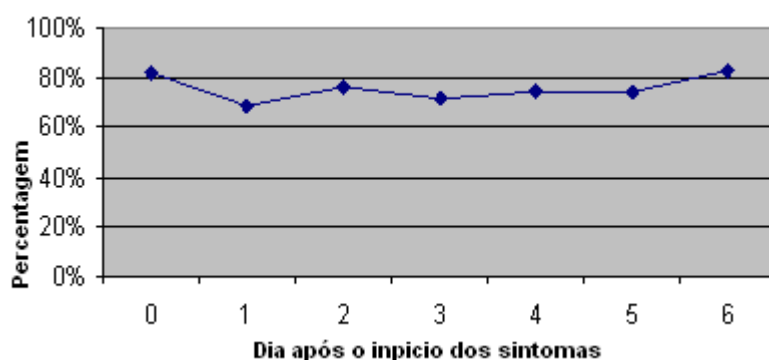


Figura 12: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) para captura do antígeno NS1 do dengue de acordo com o número de dias após o início dos sintomas (n=426).

Analizamos ainda a relação de detecção do antígeno NS1 de acordo com o sexo do paciente. Não houve diferença significativa na sensibilidade do kit, quando casos femininos ($n=218$) e masculinos ($n=208$) foram comparados, 71% e 74%, respectivamente ($p=0,141$, Odds ratio de 1,923 e 95% de IC 0,844 – 4,378), Figura 13.

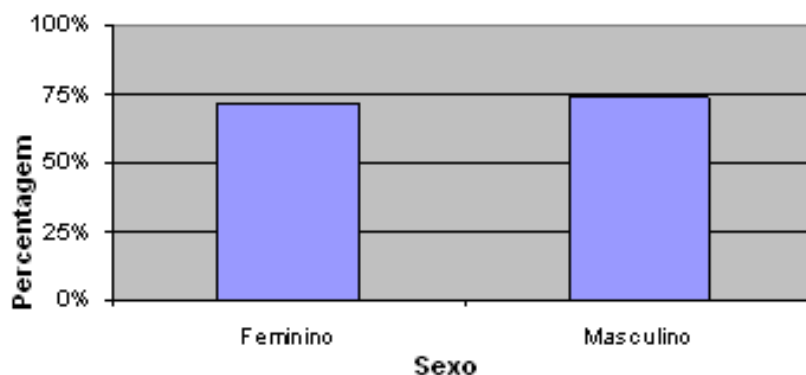


Figura 13: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early Elisa (PanBio Diagnostics) para detecção do antígeno NS1 do Dengue de acordo com o sexo do paciente ($n=426$).

Não houve diferença significativa na sensibilidade do kit, na confirmação dos casos tanto para os grupos de menores de 15 anos, quanto para os grupos de maiores de 60 anos, Figura 14.

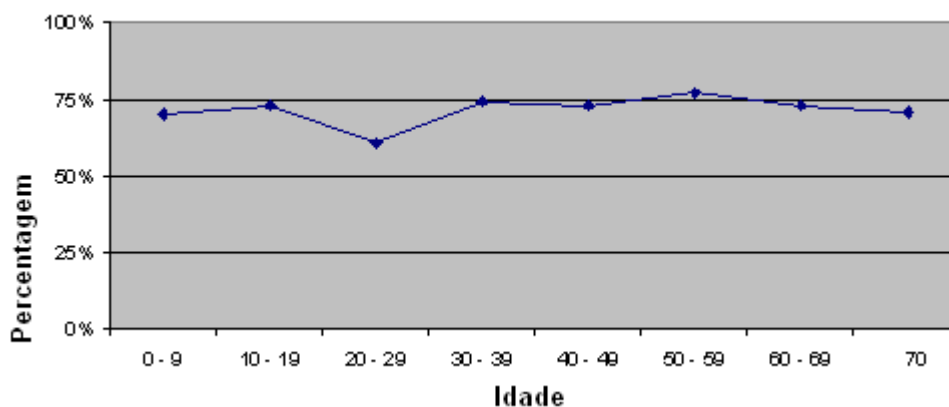


Figura 14: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early Elisa (PanBio Diagnostics) para detecção do antígeno NS1 do Dengue de acordo com a faixa etária ($n=426$).

A habilidade em detectar o antígeno NS1 em soros de casos primários e secundários também foi avaliada. Do total de 426 casos de dengue, 110 casos foram classificados pela resposta imune humoral, sendo 67 casos classificados pelo IgG-ELISA como infecção primária e 43 como infecção secundária, de acordo com os critérios de classificação do método. Os resultados obtidos pelo kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) nestes casos demonstraram uma maior sensibilidade na confirmação de casos primários 75% (50/67), do que em secundários 60% (26/43), ($p < 0,001$, Odds ratio de 4,50 e 95% de IC 1,83 – 11,19), Figura 15.

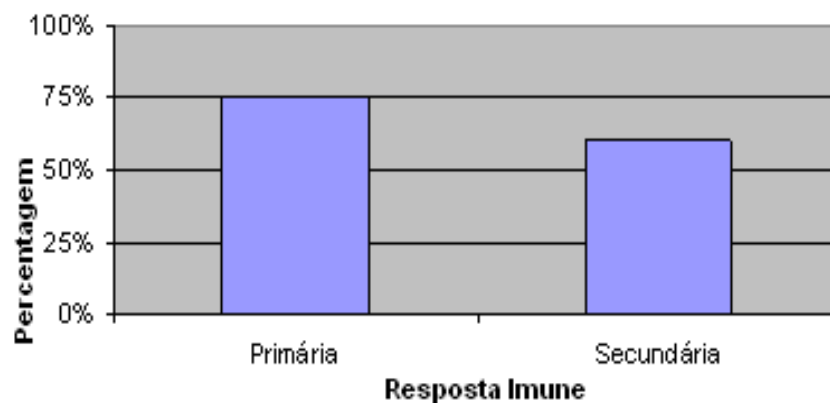


Figura 15: Sensibilidade do Kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) para detecção do antígeno NS1 de acordo com a resposta imune (n=110).

A especificidade do kit e a reação cruzada com outras doenças também foram avaliadas. Nenhuma inespecificidade (Grupos E e F) e reação cruzada (grupos G – J) foram observadas utilizando o kit pan-E Early ELISA (PanBio Diagnostics), Figura 16.

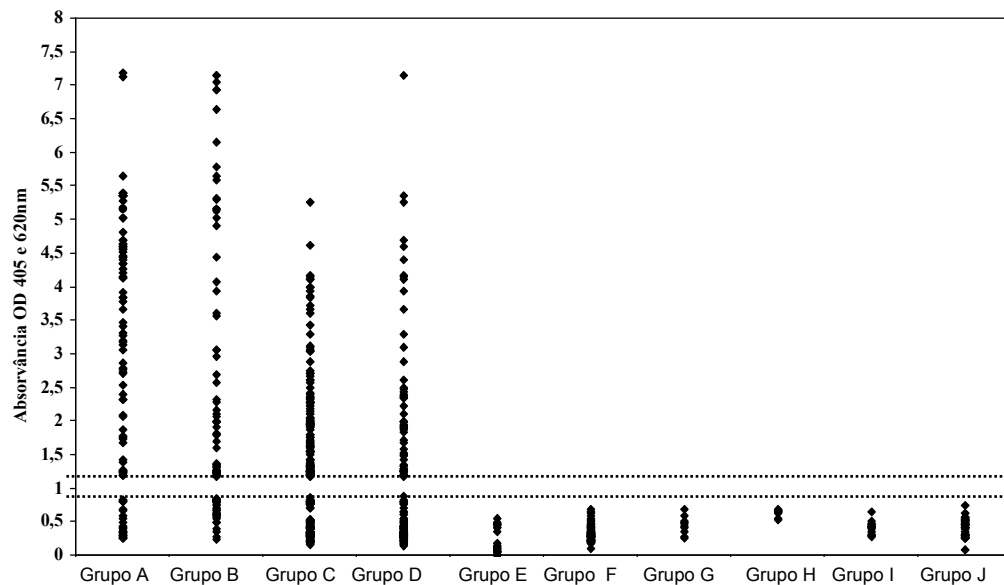


Figura 16: Resposta a captura de antígeno NS1 nos diferentes grupos estudados. Os valores de absorvância (D.O.405 e 620) estão representados para amostras de casos de dengue e de casos não-dengue e o “cut-off” está representado pela linha pontilhada.

5.2 Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories)

Para a avaliação do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories), utilizamos 450 amostras, compreendendo amostras positivas e negativas para dengue. Uma sensibilidade total de 84% (184 / 220) em amostras positivas (Grupos A - D) foi obtida considerando casos até o 9º dia de doença após início dos sintomas, e 99% de especificidade, baseado nas amostras de indivíduos saudáveis e soros negativos para dengue (Grupos E e F). A sensibilidade variou de 86% a 98% dependendo do sorotipo viral analisado (Tabela 10). Uma menor sensibilidade foi observada em soros de pacientes infectados pelo DENV-3, coincidindo com o resultado obtido do kit pan-E Early ELISA.

Tabela 10: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com o sorotipo viral (n=158).

Casos Positivos	NS1 Pos / Test	Sensibilidade (%)
Grupo A: casos DENV-1	49 / 50	98
Grupo B: casos DENV-2	45 / 50	90
Grupo C: casos DENV-3	50 / 58	86
TOTAL	144 / 158	91

Um total de 62 amostras do Grupo D (MAC-ELISA) foi analisado. Na presença de anticorpos IgM, a sensibilidade do kit foi de 64% quando comparado com casos positivos por RT-PCR e/ou isolamento viral, onde a IgM é geralmente ausente obtendo 91% (40 / 62) de sensibilidade ($p < 0,001$, Odds ratio 18,70 e 95% de IC 8,27 – 43,04) . A Tabela 11 apresenta a sensibilidade da detecção do antígeno NS1 na presença e ausência de anticorpos IgM.

Tabela 11: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) em relação a ausência (Grupo A – C) e presença (Grupo D) de IgM (n= 220).

Anticorpo IgM	NS1 Pos / Test	Sensibilidade (%)
Ausência (Grupo A-C)	144 / 158	91
Presença (Grupo D)	40 / 62	64
Total	184 / 220	84

Em amostras positivas tanto por isolamento viral quanto por RT-PCR o kit apresentou uma sensibilidade de 94%. A sensibilidade em casos positivos somente por RT-PCR foi de 82%. Porém, quando analisamos as amostras positivas somente por isolamento viral, verificamos que houve uma maior detecção do antígeno NS1, com 95% de sensibilidade. A sensibilidade do kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad

Laboratories) de acordo com RT-PCR e/ou isolamento viral está apresentada na Tabela 12.

Tabela 12: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) em casos confirmados por RT-PCR e/ou isolamento viral (n=158).

Casos confirmados	NS1 Pos / Test	Sensibilidade (%)
RT-PCR (apenas)	37 / 45	82
ISOL (apenas)	73 / 77	95
ISOL e RT-PCR	34 / 36	94
Total	144 / 158	91

A sensibilidade do kit também foi avaliada de acordo com o número de dias após o início dos sintomas dos casos de dengue (Grupos A – D). A análise revelou uma maior sensibilidade na detecção nos primeiros 4 dias de doença (80 – 90%). Após este período, uma diminuição na sensibilidade (70%) é observada, provavelmente devido ao início da produção de anticorpos (Figura 17).

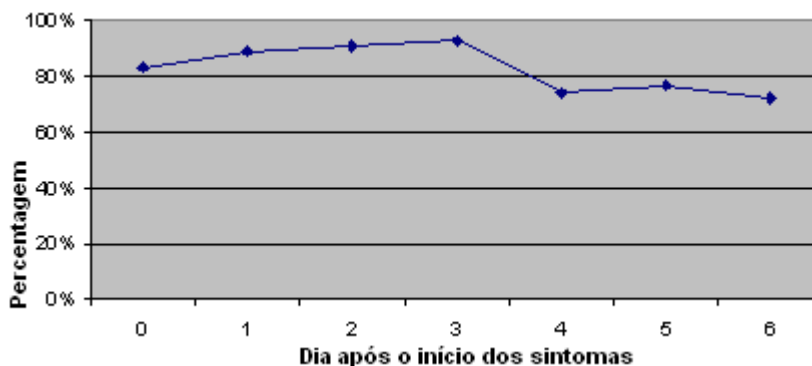


Figura 17: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para captura do antígeno NS1 em relação ao número de dias após o início dos sintomas (n=220).

A análise da detecção do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) de acordo com o sexo do paciente infectado, demonstrou que não houve diferença significativa entre casos femininos ($n=116$) e masculinos ($n=104$) (81% e 86%, respectivamente) ($p=0,281$, Odds Ratio de 0,665 e 95% de IC 0,320 – 1,38), Figura 18.

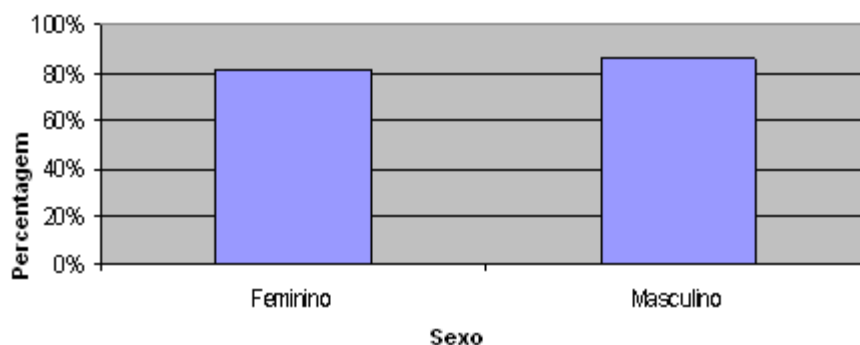


Figura 18: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para detecção do antígeno NS1 de acordo com o sexo do paciente ($n=220$).

Não houve diferença significativa na sensibilidade do kit, tanto para os grupos de menores de 15 anos, quanto para os grupos de maiores de 60, Figura 19.

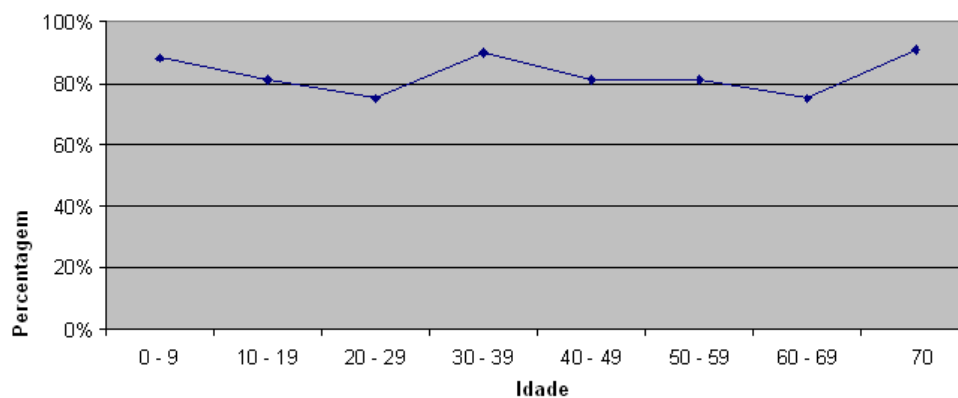


Figura 19: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para captura do antígeno NS1 de acordo com a faixa etária ($n=220$).

A habilidade do Platelia™ em detectar o antígeno NS1 em casos primários e secundários também foi avaliada. Do total de 220 casos confirmados de dengue, 54 casos foram classificados pela resposta imune humoral, sendo 40 casos classificados pelo IgG-ELISA como infecção primária e 14 como infecção secundária, de acordo com os critérios de classificação do método. Os resultados obtidos demonstraram que o teste foi mais sensível na confirmação de casos primários 95% (38/40), do que em secundários 71% (10/14) ($p < 0,001$ – Teste Exato de Fisher - Odds ratio de 47,50), Figura 20.

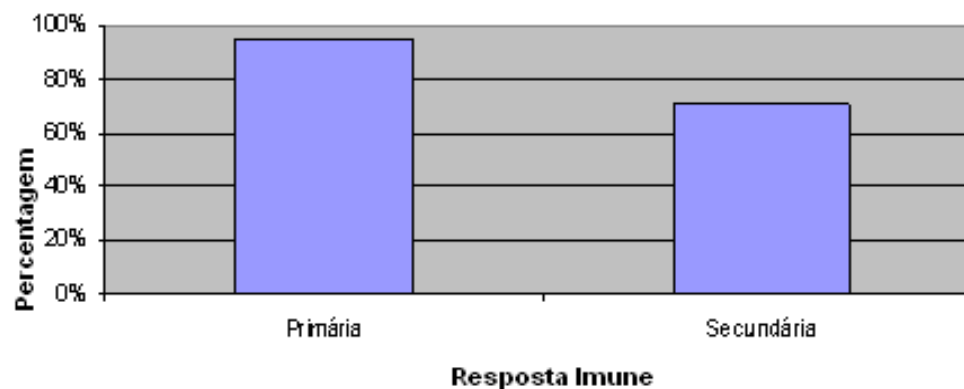


Figura 20: Sensibilidade do Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para detecção do antígeno NS1 de acordo com a resposta imune (n=110).

Os testes de especificidade e reação cruzada demonstraram uma reação inespecífica em um soro de paciente negativo para dengue (Grupo F), uma reação cruzada com o soro de um paciente vacinado para FA e com um caso positivo para rubéola (Figura 21).

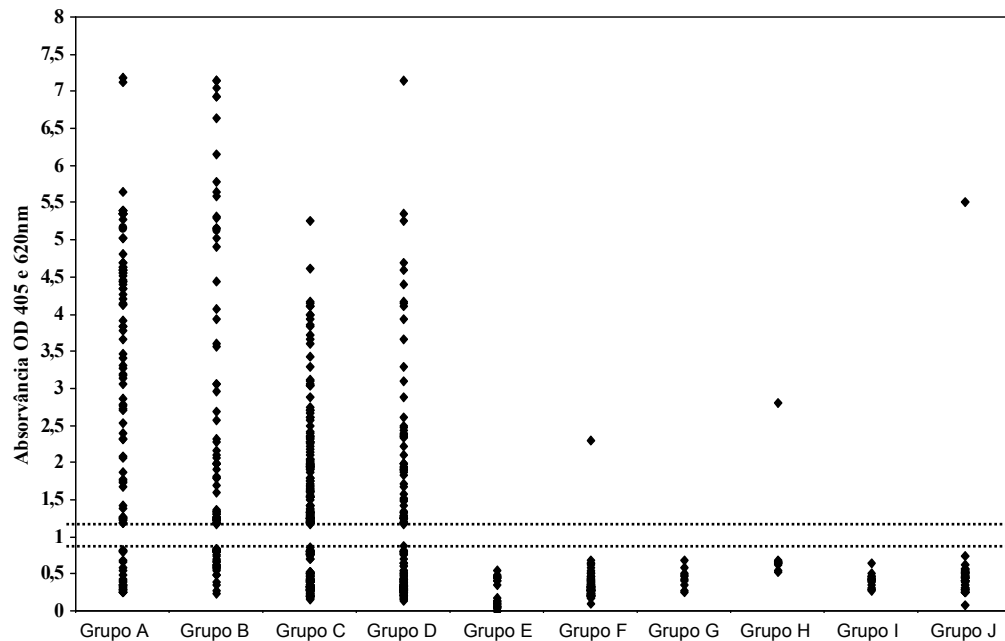


Figura 21: Resposta a captura de antígeno NS1 nos diferentes Grupos estudados. Os valores de absorbância (D.O.405 e 620) estão representados para amostras de casos de dengue e de casos não-dengue e o “cut-off” está representado pela linha pontilhada.

5.3 Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories)

Para a avaliação do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories), um total de 845 amostras, divididas em amostras positivas e negativas para dengue foram analisadas. O kit apresentou uma sensibilidade total de 90% (381/422) em amostras positivas para dengue (Grupos A - D), considerando casos até o 9º dia após o início dos sintomas e 99% de especificidade baseado em indivíduos saudáveis e soros negativos para dengue (Grupos E e F). A sensibilidade variou de 88% a 98% dependendo do sorotipo viral analisado (Tabela 13). Como nos outros dois kits, a sensibilidade em detectar o antígeno NS1 em amostras positivas por DENV-3 foi a menos observada em soros de pacientes infectados.

Tabela 13: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com o sorotipo viral (n=322).

Casos Positivos	NS1 Pos / Test	Sensibilidade (%)
Grupo A: casos DENV-1	98/100	98
Grupo B: casos DENV-2	98/100	98
Grupo C: casos DENV-3	108/122	88
TOTAL	304/ 322	94

A análise de amostras IgM positiva (Grupo D) demonstrou uma sensibilidade de 77%, significativamente menor do que a sensibilidade observada quando anticorpo IgM é ausente 94% (304/322) ($p < 0,001$, Odds Ratio de 39,41 e 95% de IC 20,21 – 77,77). A Tabela 14 apresenta a sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) na ausência e presença de anticorpos IgM.

Tabela 14: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) na presença e ausência de IgM (n= 422).

Anticorpo IgM	NS1 Pos / Test	Sensibilidade (%)
Ausência (Grupo A-C)	304/322	94
Presença (Grupo D)	77/100	77
Total	381/422	90

As amostras positivas por isolamento viral foram detectadas em 99% dos casos quando comparado aos casos positivos por RT-PCR (86%). Porém, todas as amostras positivas para isolamento viral e para RT-PCR, foram detectadas (Tabela 15).

Tabela 15: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) em casos confirmados por RT-PCR e/ou isolamento viral (n=322).

Casos confirmados	NS1+ Pos / Test	Sensibilidade (%)
RT-PCR (apenas)	102/118	86
ISOL (apenas)	155/157	99
ISOL e RT-PCR	47/47	100
Total	304/322	94

A sensibilidade também foi avaliada de acordo com o número de dias após o início dos sintomas. A análise (Grupo A – D) revelou que o antígeno NS1 pode ser detectado até em torno do 6º dia após o início dos sintomas. A figura 22 demonstra a sensibilidade de detecção do antígeno NS1 de acordo com os dias após o início dos sintomas.

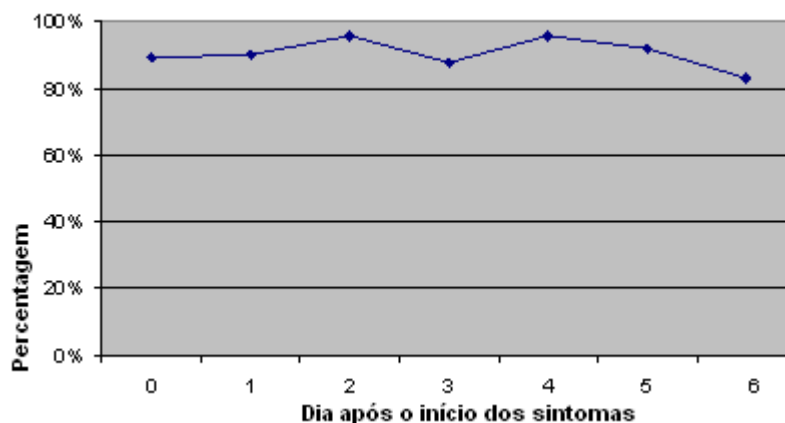


Figura 22: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 do Dengue relacionado ao início dos sintomas (n=422).

Cerca de 88% dos casos femininos (n=217) e 92% dos casos masculinos (n=205) foram confirmados pelo kit. Esta diferença não foi significativa e esta relação não possui efeito protetor (p= 0,249, Odds ratio de 0,650 e 95% de IC 0,336 – 1,26), Figura 23.

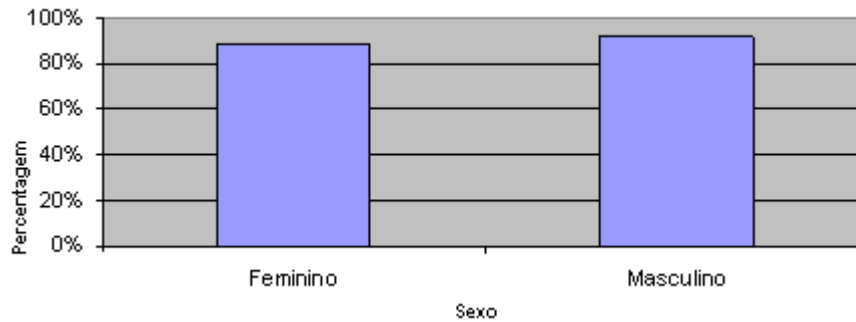


Figura 23: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 do dengue de acordo com o sexo (n=422).

A sensibilidade por faixa etária também foi avaliada. Contudo, não houve diferença significativa na sensibilidade do kit, tanto para os grupos de menores de 15 anos, quanto para os grupos de maiores de 60 anos, Figura 24.

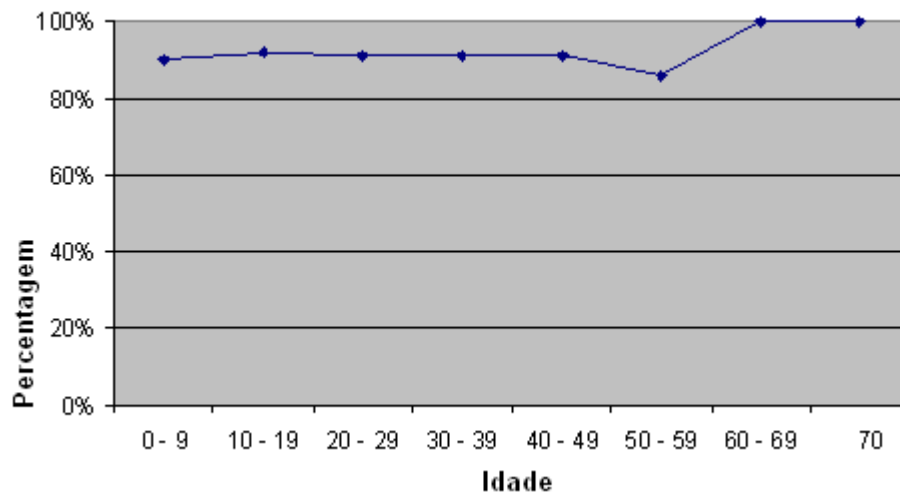


Figura 24: Sensibilidade do Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 do dengue de acordo com a faixa etária (n=422).

A habilidade em detectar o antígeno NS1 em casos primários (n=57) e secundários (n= 31) também foi avaliada. Os resultados obtidos pelo Kit Dengue NS1 Ag Strip demonstraram 93% de sensibilidade em confirmar tanto os casos primário como os de infecção secundária (p=1.000, Odds ratio de 0,913 e 95% de IC 0,157 – 5,296), Figura 25.

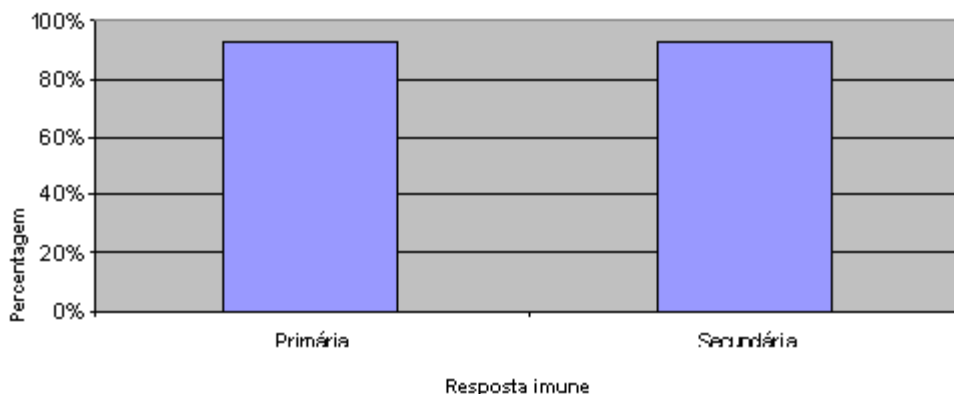


Figura 25: Sensibilidade o Kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) para captura do antígeno NS1 do dengue de acordo com a resposta imune ($n=88$).

5.4 Comparação dos três kits comerciais de captura de antígeno NS1 para o diagnóstico das infecções DENV

Com o objetivo de compararmos o desempenho dos três kits, entre si, avaliamos um total de 450 amostras ($n= 220$ casos dengue e $n= 230$ de casos não dengue), todas testadas pelas três metodologias.

O Kit pan-E Early ELISA (PanBio) apresentou 72% (159/220) de sensibilidade e 100% de especificidade, enquanto que o Kit Platelia NS1 (BioRad), apresentou 84% (184/220) de sensibilidade e 99% de especificidade, já o Kit NS1 Ag Strip (BioRad), apresentou 89% (197/220) de sensibilidade e 99% de especificidade. Uma maior sensibilidade (92%, 94% e 100%), foi observada em casos positivos por ambas as técnicas, RT-PCR e isolamento viral, quando comparados com os casos positivos somente por Isolamento viral (71%, 95% e 99%) e somente por RT-PCR (62%, 82% e 82%), para os kits pan-E Early ELISA, Platelia NS1 e Dengue NS1 Ag Strip, respectivamente. Em amostras IgM positivas, uma menor sensibilidade foi observada (69%, 64% e 77%), para os três kits estudados, pan-E Early ELISA, Platelia NS1 e Dengue NS1 Ag Strip, respectivamente (Figura 26).

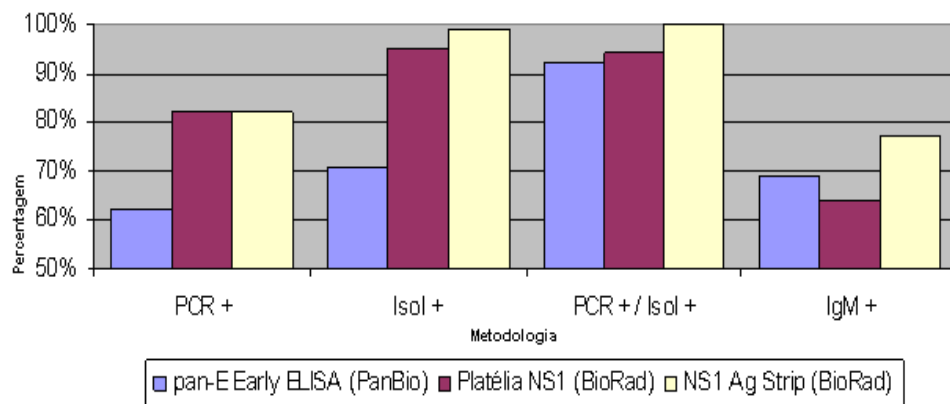


Figura 26: Sensibilidade entre os três kits para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com a metodologia utilizada (n=220).

Em relação ao sorotipo viral, houve uma variação da sensibilidade entre os três kits de captura de antígeno NS1. O Kit pan-E Early ELISA (PanBio), apresentou uma maior sensibilidade (82%) em casos de DENV-2. O Kit Platelia NS1 (BioRad) foi mais sensível em casos de DENV-1 (98%). O Kit Dengue NS1 Ag Strip (BioRad) apresentou a mesma sensibilidade em casos DENV-1 e DENV-2 (98%). Casos de DENV-3 apresentaram um percentual menor de confirmação pelos três kits (65%, 86% e 88%), respectivamente (Figura 27).

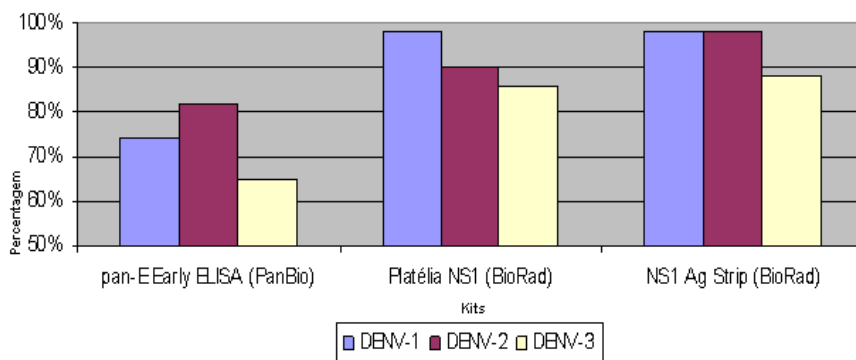


Figura 27: Sensibilidade entre os três kits para captura do antígeno NS1 em casos positivos de dengue de acordo com o sorotipo viral infectante (n= 158).

Uma maior detecção foi observada pelos três kits nos primeiros quatro dias após o início dos sintomas com diminuição após este período tanto por pan-E EARLY ELISA, como por Platelia NS1. Porém, pelo Platelia NS1 após o quarto dia dos sintomas a sensibilidade permaneceu em torno de 75% até o sexto dia dos sintomas. Enquanto, o NS1 Ag Strip permaneceu com uma sensibilidade constante (89%) até o sexto dia após o início dos sintomas (Figura 28).

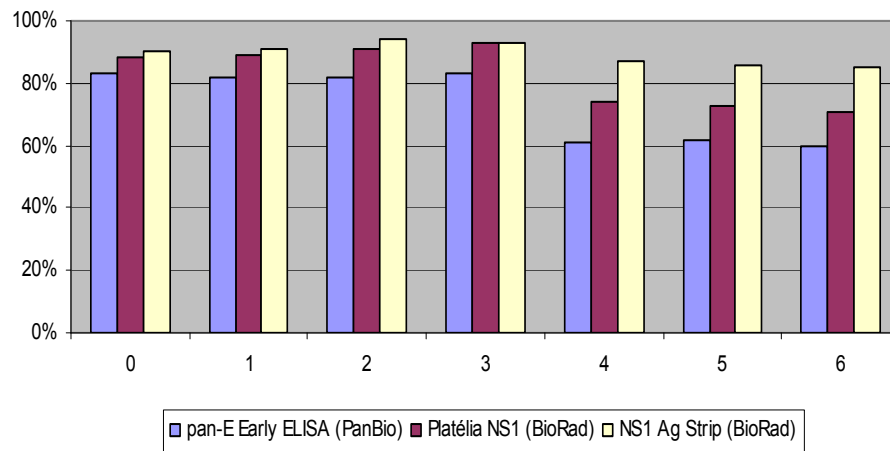


Figura 28: Comparação da sensibilidade entre os três kits para captura do antígeno NS1 relacionado ao número de dias após o início dos sintomas (n=220).

Comparamos a relação da captura do antígeno NS1 dos três kits de acordo com o sexo do paciente infectado. Foram analisados pacientes do sexo feminino (n=116) e do sexo masculino (n=104). Foi demonstrado que os três kits foram mais sensíveis em confirmar a infecção em pacientes do sexo masculino. Uma maior sensibilidade foi obtida em ambos os casos pelo kit NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories), ($p= 0.14$, OR 1,92 e 95% de IC 0.84 – 4.37), Figura 29.

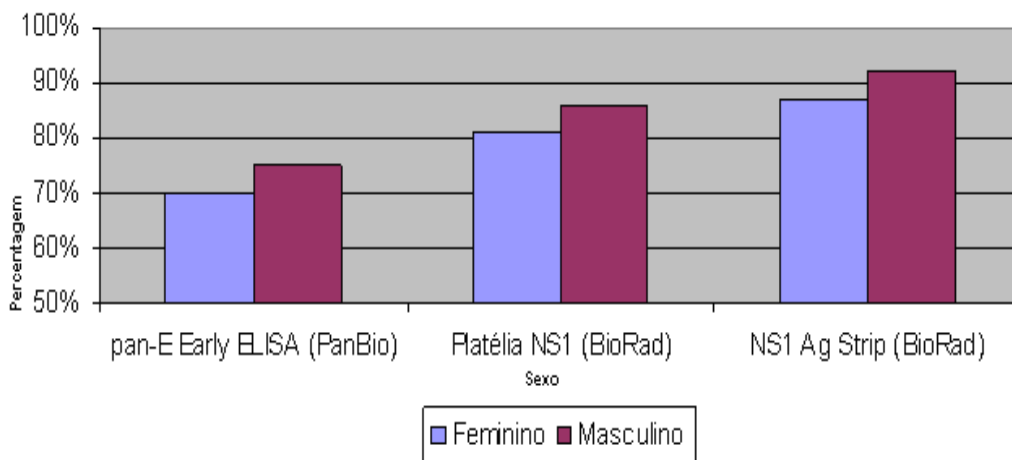


Figura 29: Comparação da sensibilidade entre os três kits analisados de acordo com o sexo do paciente ($n=220$).

A habilidade dos kits em detectar o antígeno NS1 em casos primários ($n= 40$) e secundários ($n=14$) também foi comparada (Figura 30). Os resultados obtidos demonstraram uma maior sensibilidade de confirmação de casos de infecção primária pelos três kits, porém não houve diferença significativa em relação aos casos de infecção secundária.

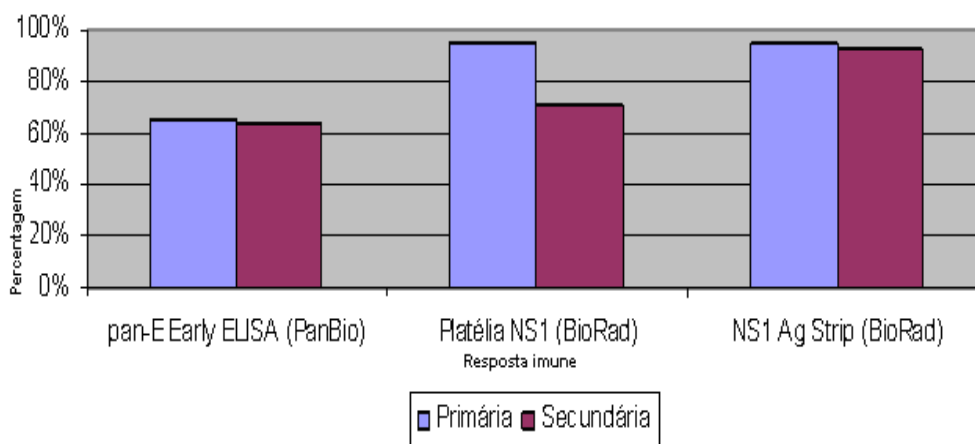


Figura 30: Comparação da sensibilidade entre os três kits em casos primários e secundários de dengue ($n=54$).

A Figura 31 resume a sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos três kits analisados. A sensibilidade variou de acordo com o kit (72%, 84%, 90%, para PanBio, Platelia e Strip).

Os três kits se mostraram altamente específicos com especificidade entre 99% e 100%. O kit da PanBio (pan-E Early ELISA) mostrou-se menos eficiente em confirmar os casos de dengue (86%) quando comparado com o Platelia (91%) e o Ag Strip (95%). O valor preditivo positivo variou de 98 a 100%, porém uma menor variação foi observada para o valor preditivo negativo 78% para o pan-E Early ELISA, 86% para o Platelia e 91% para o Ag Strip.

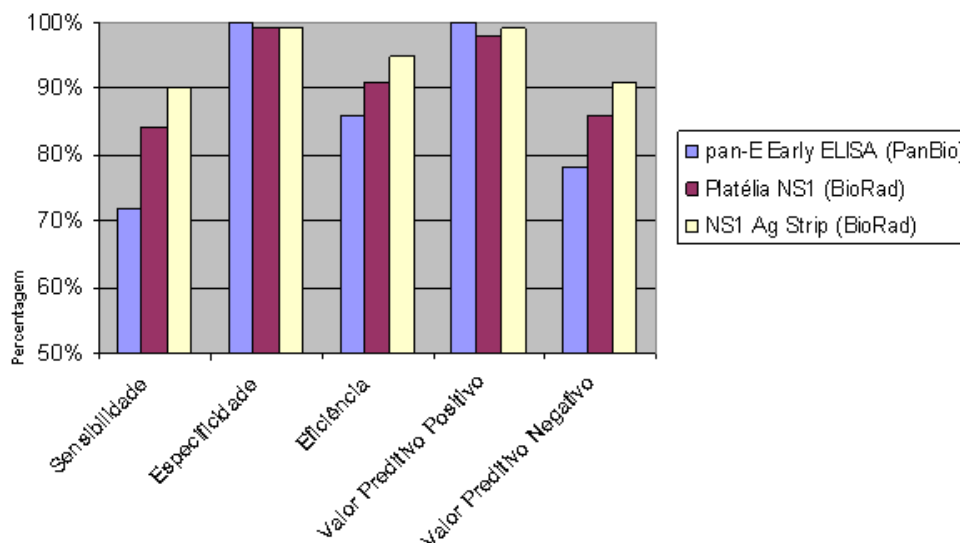


Figura 31: Comparação entre os três kits de NS1 do dengue, em relação à sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

6 DISCUSSÃO

O dengue é a arbovirose mais importante da atualidade e a cada década o número de casos reportados a OMS cresce exponencialmente (Nathan & Drager, 2006). A importância do dengue como um problema de saúde pública crescente em países tropicais e subtropicais, com sérias implicações médicas, econômicas e políticas têm estimulado pesquisas relacionadas à epidemiologia, virologia molecular e metodologias de diagnóstico desta infecção.

O estabelecimento do diagnóstico laboratorial precoce das infecções por DENV é de grande importância para guiar a implementação de medidas de controle que visem à prevenção de surtos e epidemias.

Até então, as técnicas de diagnóstico mais amplamente utilizadas tem sido baseadas na detecção de anticorpos IgM por MAC-ELISA e IgG por IgG-ELISA. Porém, uma das limitações destas técnicas é a variação dos níveis dos anticorpos anti-DENV específicos na fase aguda da doença (PAHO, 1997, Schilling *et al.*, 2004). São necessários de 3 a 5 dias para anticorpos IgM anti-DENV e de 10 a 14 para o IgG anti-DENV se tornarem detectáveis. Além disso, infecções primárias e secundárias apresentam diferentes perfis de produção destes anticorpos (Shu *et al.*, 2004).

A detecção de produtos virais tais como antígeno ou RNA, é apropriada para o diagnóstico durante a fase aguda ou virêmica da doença. Porém, apesar do isolamento viral ser considerado o “padrão-ouro” para o diagnóstico laboratorial precoce das infecções por DENV, é ainda considerado um método caro, além de serem necessários de 6 a 10 dias para a replicação viral em cultura celular. O método molecular de detecção do ácido nucléico viral, RT-PCR também ainda consiste em um método caro e é indisponível em muitos laboratórios de países em desenvolvimento.

A forma hexamérica da proteína NS1 é altamente conservada nos quatro sorotipos e foi encontrada circulando no soro de pacientes do primeiro ao nono dia após o início da febre (Falconar, 1997; Flamand *et al.*, 1999, Young *et al.*, 2000, Alcon *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2006).

Aproveitando-se destas características, ensaios imunoenzimáticos para a detecção específica da proteína NS1 têm sido desenvolvidos e avaliados para a

confirmação de casos agudos primários e secundários de dengue (Xu *et al.*, 2006; Dussart *et al.*, 2006; Kumarasamy *et al.*, 2007; Sekaran *et al.*, 2007; Blacksell *et al.*, 2007; Lapphra *et al.*, 2008; Chuansumrit *et al.*, 2008; Phuong *et al.*, 2009; Chaiyaratana *et al.*, 2009; Hang *et al.*, 2009).

Atualmente, três kits comerciais estão disponíveis para o diagnóstico precoce das infecções de dengue baseado na captura de antígeno NS1: pan-E DENGUE EARLY ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia), PLATELIA™ DENGUE NS1 ANTIGEN e DENGUE NS1 Ag STRIP (Biorad Laboratories, Marnes La Coquette, França).

No presente estudo, tivemos a oportunidade de avaliar e comparar os três kits disponíveis com um painel de amostras ($n=852$) do primeiro ao nono dia após o início dos sintomas, de casos ocorridos desde a introdução do dengue no Rio de Janeiro em 1986 até o ano de 2008.

A sensibilidade foi baseada na análise de amostras positivas para dengue (Grupos A-D). A especificidade e análise de reação cruzada com outras doenças foram baseadas em amostras de indivíduos saudáveis, pacientes negativos para infecções por DENV, pessoas vacinadas contra febre amarela, pacientes positivos para febre amarela, sarampo e rubéola (Grupos E-J). Todas as amostras foram previamente submetidas ao diagnóstico laboratorial por metodologias estabelecidas no Laboratório de *Flavivirus*, IOC-FIOCRUZ, constituído por isolamento viral, RT-PCR, IgM-ELISA e IgG-ELISA.

Dentro desta amostragem, os kits foram avaliados quanto a habilidade de confirmar casos de pacientes infectados por DENV-1, DENV-2, DENV-3, casos de pacientes IgM positivos e casos de infecção primária e secundária.

6.1 pan-E Dengue Early ELISA (Panbio Diagnostics)

Sensibilidades entre 63 e 91% foram observadas em diferentes estudos de avaliação do kit pan-E Dengue Early ELISA (Blacksell *et al.*, 2007; Bessoff *et al.*, 2008; McBride, 2009).

Uma das primeiras avaliações do kit da Panbio foi realizada em Laos, onde a sensibilidade total do kit foi de 63% e especificidade de 100%, em um painel de 92 amostras (Blacksell *et al.*, 2007). Estudos seguintes obtiveram sensibilidades similares,

de 60,4% (Bessoff *et al.*, 2008) e 64,9% (Dussart *et al.*, 2008). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos recentemente em estudo realizado com 91 amostras na Austrália, onde a sensibilidade total foi de 63,7% (McBride, 2009).

Neste estudo, o kit pan-E Dengue Early ELISA apresentou uma maior sensibilidade total (72%, 308/426) em casos confirmados de dengue até o 9º dia de doença e 100% de especificidade. Não houve diferença na sensibilidade (72,2%) quando a análise foi realizada considerando-se as amostras até o 6º dia de doença. Porém, estas sensibilidades foram menores do que a obtida em um estudo realizado na Malásia, onde 91% (60/66) dos casos testados foram confirmados com 100% de especificidade (Sekaran *et al.* 2007). Nenhuma reação cruzada foi observada com soros de pacientes vacinados contra febre amarela, positivos para febre amarela, sarampo ou rubéola.

A sensibilidade do kit variou de 71% a 86% dependendo do sorotipo viral infectante analisado. Uma menor sensibilidade foi observada em soros de pacientes infectados pelo DENV-3 (71%, 71/100) e a aparente inabilidade do kit em detectar NS1 em infecção causada por este sorotipo já havia sido demonstrada (Blacksell *et al.*, 2007). Diferenças de sensibilidades entre os sorotipos demonstraram que o kit também foi menos sensível em casos de DENV-2 (McBride, 2009) e DENV-4 (Bessoff *et al.*, 2008; McBride, 2009), porém foi sugerida uma análise com um maior número de amostras representativas destes sorotipos.

Nosso estudo não incluiu amostras de DENV-4 pela não circulação deste sorotipo no país.

A sensibilidade do kit em relação à presença ou ausência de IgM também foi avaliada. Na presença de IgM (Grupo D; n= 126) a sensibilidade foi de 55% (70/126), significativamente menor do que quando comparada com os casos positivos por RT-PCR e/ou isolamento viral (Grupo A-C) de 79% ($p < 0,001$, Odds ratio de 4,80 e 95% de IC 2,99 – 7,71). Na maioria dos casos destes Grupos o anticorpo IgM estava ausente. O mesmo perfil foi observado previamente, onde na presença do IgM a sensibilidade foi significativamente menor (48,3%). Sekaran e colaboradores (2007) demonstraram que conforme os níveis de anticorpos IgM aumentam, a taxa de detecção do NS1 diminui em concordância com os nossos resultados.

Uma maior sensibilidade (84%) foi observada quando o kit foi testado em amostras positivas por isolamento viral do que em amostras positivas por RT-PCR (67%). Este fato é de grande relevância, uma vez que o isolamento viral, apesar de ser o “padrão-ouro” para o diagnóstico das infecções por DENV, é um método trabalhoso e que requer pelo menos 10 dias para a obtenção do resultado.

O pan-E Dengue Early ELISA também demonstrou ser capaz de confirmar casos de infecção primária e secundária por DENV, apesar de ser um consenso entre os estudos realizados, que uma maior sensibilidade é obtida em casos de infecção primária (Kumarasamy *et al.*, 2006; Sekaran *et al.*, 2007). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma maior sensibilidade na confirmação de casos primários [75% (50/67)], do que em secundários [60% (26/43)], ($p < 0,001$, Odds ratio de 4,50 e 95% de IC 1,83 – 11,19), corroborados pela análise realizada recentemente na Austrália por McBride e colaboradores (2009), com 77,5% e 54,5%, para infecções primárias e secundárias, respectivamente. Foi demonstrado que dissociação de imunocomplexos de antígeno-anticorpo de amostras de soro de pacientes com infecção secundária, aumentou significativamente a detecção do antígeno NS1 (Koraka *et al.*, 2003).

Neste estudo, amostras até o 9º dia após o início dos sintomas foram testadas. Porém, a insuficiência de amostras com 7, 8 e 9 dias e a indisponibilidade de amostras mais tardias, inviabilizou a análise a partir do 6º dia de doença.

O antígeno NS1 pôde ser detectado até o 6º dia após o início dos sintomas em aproximadamente 70%, decrescendo com o surgimento e elevação dos anticorpos IgM. Sekaran e colaboradores (2007) detectaram antígeno NS1 até o 10º dia após o início dos sintomas (cerca de 30%), com uma diminuição após este período.

6.2 Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories)

Diversos estudos demonstraram a utilidade do kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) para o diagnóstico precoce das infecções por DENV (Dussart *et al.*, 2006; Kumarasamy *et al.*, 2007; Lapphra *et al.*, 2008; Chuansumrit *et al.*, 2008; Phuong *et al.*, 2009; McBride, 2009; Zainah *et al.*, 2009; Hang *et al.*, 2009).

O Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA é um ensaio imunoenzimático sanduíche de uma etapa em microplaca para a detecção qualitativa ou semi-quantitativa do antígeno NS1 de DENV presente no soro ou plasma humano.

Neste estudo, um total de 450 amostras foram analisadas e a sensibilidade total obtida foi de 84% (184 / 220) considerando casos até o 9º dia de doença após início dos sintomas com uma especificidade de 99%. De igual modo, neste estudo, devido a insuficiência de amostras com 7, 8 e 9 dias e a indisponibilidade de amostras mais tardias, inviabilizou a análise a partir do 6º dia de doença. O mesmo foi observado em estudos prévios onde sensibilidade de 82% e 88%, ambos com 100% de especificidade foram obtidos em estudos realizados no Vietnã (Hang *et al.*, 2009) e Guiana Francesa (Dussart *et al.*, 2006), respectivamente. Porém sensibilidades de 63,2% e 93,3 % também foram observadas por outros autores (Lapphra *et al.*, 2008; Kumarasamy *et al.*, 2007).

A sensibilidade variou de 71% a 86% dependendo do sorotipo viral analisado. Uma menor sensibilidade foi observada em soros de pacientes infectados pelo DENV-3, coincidindo com o resultado obtido com o kit pan-E Early ELISA (Panbio Diagnostics). Porém, Dussart e colaboradores (2006) não observaram diferenças na sensibilidade em casos de pacientes infectados pelos diferentes sorotipos (DENV-1 a 4).

A diferença de sensibilidade obtida pelo kit quando o anticorpo IgM estava ausente (91% Grupos A-C) e presente (64%, Grupo D), foi significativa ($p < 0,001$, Odds ratio 18,70 e 95% de IC 8,27 – 43,04) e já havia sido descrita anteriormente (96,3% e 88,6%, respectivamente; Kumarasamy *et al.*, 2007).

A comparação do kit com os outros dois métodos de diagnóstico de casos agudos, isolamento viral e RT-PCR, demonstrou que o kit obteve melhor desempenho em casos previamente positivos por isolamento viral (95%) do que aqueles positivos por RT-PCR (82%). Estes dados corroboram os resultados prévios, onde 94,1% e 85% dos casos positivos por isolamento viral e RT-PCR, respectivamente, foram confirmados pelo kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (Dussart *et al.*, 2006). Recentemente, McBride (2009) demonstrou que a captura de antígeno NS1 foi possível em 87% dos casos positivos por RT-PCR, coincidindo com os nossos resultados.

A sensibilidade do kit foi avaliada quanto o número de dias após o início dos sintomas. A análise revelou uma maior sensibilidade na detecção do antígeno NS1 nos primeiros 4 dias de doença (80 – 90%). Após este período, uma diminuição na sensibilidade (70%) é observada, provavelmente pela diminuição da viremia. Este fato é um consenso em diferentes estudos, onde a sensibilidade ótima está de 0 a 4 dias após o início dos sintomas, sendo considerado dia 0, o primeiro dia do estabelecimento da febre (Dussart *et al.*, 2006; Hang *et al.*, 2009). Uma maior sensibilidade (88,5%) também foi observada em amostras com até 5 dias após o início dos sintomas em relação aquelas amostras de pacientes com de 5-8 dias de doença (53,8%; McBride, 2009).

A habilidade do Platelia™ em detectar o antígeno NS1 em casos primários e secundários foi avaliada. Os resultados obtidos demonstraram que o teste foi mais sensível na confirmação de casos primários 95% (38/40), do que em secundários 71% (10/14) ($p < 0,001$ – Teste Exato de Fisher - Odds ratio de 47,50). Sensibilidades de 97,4% e 68,8% para infecções primárias e secundárias, respectivamente foram obtidas por Kumarasamy e colaboradores (2007) e de 97,5% e 59,1 % por McBride (2009).

Em nossa avaliação, foi observada uma reação cruzada com o soro de um paciente vacinado para FA e com um caso positivo para rubéola. Porém, nenhuma reação com malária, leptospirose e encefalite japonesa foi observada (Hang *et al.*, 2009).

Não foi observada diferença significativa na confirmação dos casos femininos e masculinos (81% e 86%, respectivamente) pelo kit ($p < 0,001$, Odds Ratio de 27,47 e 95% de IC 12,53 – 61,36).

6.3 Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories)

A importância do estabelecimento de ferramentas precisas para o diagnóstico precoce das infecções por DENV já foi demonstrada. A nova abordagem para confirmação dos casos agudos de dengue baseada na captura do antígeno NS1 circulante no soro de pacientes infectados se mostrou de grande importância até então, pelos resultados obtidos nas diversas avaliações. Os kits pan E Early ELISA (Panbio Diagnostics) e Platelia™ (Biorad Laboratories) são de ampla aplicação para o

diagnóstico, uma vez que utilizam os mesmos equipamentos. Porém, recentemente, um método alternativo foi desenvolvido para atender às necessidades de aplicação no campo.

O kit Dengue NS1 Ag STRIP (BioRad Laboratories) consiste em um teste imunocromatográfico, formado por uma membrana em fita com uma esponja para aplicação da amostra, uma esponja de conjugado contendo partículas coloidais revestidas por anticorpos monoclonais anti-NS1 de DENV e partículas coloidais revestidas por estreptavidina, onde os resultados são obtidos de 15-30 minutos.

Com um total de 845 amostras, divididas em amostras positivas e negativas para dengue como parte deste trabalho. Até a conclusão deste trabalho, apenas dois estudos de avaliação do NS1 Ag STRIP estão disponíveis.

Neste estudo, o kit apresentou uma sensibilidade total de 90% (381/422) com casos positivos até o 9º dia após o início dos sintomas e 99% de especificidade. Uma avaliação recente do kit na Malásia demonstrou 90,4% de sensibilidade e 99,5% de especificidade (Zainah *et al.*, 2009). Em uma outra análise, porém, a sensibilidade foi de 72% e especificidade de 100% (Hang *et al.*, 2009).

A sensibilidade variou de 88% a 98% dependendo do sorotipo viral analisado. Como nos outros dois kits, uma menor sensibilidade também foi observada em casos de pacientes infectados por DENV-3. Contudo, Hang e colaboradores (2009) descreveram uma menor sensibilidade em amostras de pacientes infectados por DENV-2 (55%)

Na presença de anticorpo IgM, a sensibilidade do kit foi de 77%, significativamente menor do que a sensibilidade observada quando anticorpo IgM não está presente (94%, $p < 0,001$, Odds Ratio de 39,41 e 95% de IC 20,21 – 77,77).

As amostras positivas por isolamento viral foram detectadas em 99% dos casos quando comparado aos casos positivos por RT-PCR (86%), resultados corroborados por Zainah e colaboradores (2009) onde 96.3% dos casos positivos por isolamento viral e 87% dos casos positivos por RT-PCR foram confirmados pelo kit.

No presente estudo, utilizando o kit Dengue NS1 Ag STRIP, cerca de 90% dos casos foram confirmados até o 6º dia de doença após o início dos sintomas. Porém, Hang e colaboradores (2009) demonstraram uma maior sensibilidade em amostras coletadas até o terceiro dia após o início dos sintomas.

A sensibilidade em confirmar tanto os casos primários como os de infecção secundária foi de 93% ($p=1.000$, Odds ratio de 0,913 e 95% de IC 0,157 – 5,296). Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos para os casos de infecção primária, porém menor sensibilidade foi observada em casos de infecção secundária (65,6% - 79,1%; Hang *et al.*, 2009, Zainah *et al.*, 2009).

6.4 Comparação dos três kits de captura de antígeno NS1 em uma subpopulação de 450 amostras

A análise dos três kits testados foi avaliada entre si. Um total de 450 amostras ($n= 220$ casos dengue e $n= 230$ de casos não-dengue) foram selecionadas e testadas pelas três metodologias.

Dentre os três kits analisados, o kit NS1 Ag Strip (BioRad) foi o mais sensível em confirmar casos de dengue na amostragem testada (89%, 197/220), seguido pelo Platelia NS1 (BioRad) (84%, 184/220). O menos sensível foi o pan -E Early ELISA (PanBio) com 72% (159/220) de sensibilidade. Porém, neste estudo o kit da PanBio foi o mais específico (100%) enquanto que ambos os kits da BioRad apresentaram 99% de especificidade. Em estudos de comparação entre os kits pan-E Early ELISA (PanBio) e Platelia NS1 (BioRad), também demonstrou-se menor sensibilidade para o kit da PanBio (Bessoff *et al.*, 2008, McBride, 2009).

Os três kits pan-E Early ELISA, Platelia NS1 e Dengue NS1 Ag Strip, foram mais sensíveis em confirmar casos positivos por isolamento viral do que em casos positivos por RT-PCR.

O kit pan-E Early ELISA (PanBio) foi o menos sensível em casos IgM positivos (69%), porém mais sensível em detectar casos de paciente infectados por DENV-2 (82%). O kit Platelia NS1 (BioRad) foi mais sensível em casos de DENV-1 (98%) e o Dengue NS1 Ag Strip (BioRad) apresentou a mesma sensibilidade tanto em casos de DENV-1 quanto de DENV-2 (98%). Casos de DENV-3 foram os menos confirmados pelos três kits, em menor proporção.

Corroborando os dados da literatura, o período ótimo para a captura do antígeno NS1 pelos três kits analisados compreende os quatro primeiros dias de doença após o

aparecimento dos sintomas. Porém, os dois kits da BioRad, Platelia NS1 e NS1 Ag Strip sustentam a detecção até o sexto dia, com sensibilidades de 75% e 89%, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram uma maior sensibilidade de confirmação de casos de infecção primária pelo pan-E Early ELISA e pelo Platelia NS1, conforme observado em estudos prévios (Sekaran *et al.*, 2007, Kumarasamy *et al.*, 2007; Chuansumrit *et al.*, 2008, Lapphra *et al.*, 2008, Hang *et al.*, 2009, Zainah *et al.*, 2009). Porém, o NS1 Ag Strip apresentou a mesma sensibilidade em casos primários e secundários.

O kit da PanBio (pan-E Early ELISA) mostrou-se menos eficiente em confirmar os casos de dengue (86%) quando comparado com o Platelia NS1 (91%) e o NS1 Ag Strip (95%). O valor preditivo positivo variou de 98 a 100%, porém uma menor variação foi observada para o valor preditivo negativo 78% para o pan-E Early ELISA, 86% para o Platelia NS1 e 91% para o NS1 Ag Strip. Dentre os kits avaliados, o Dengue NS1 Ag Strip (Biorad) foi o kit mais eficiente em confirmar casos de dengue pela captura do antígeno NS1. Além disso, é o mais conveniente por ser de fácil utilização, os resultados são obtidos em 15 minutos e a realização não envolve a utilização de equipamentos laboratoriais específicos. O kit Platelia Dengue NS1 Ag é realizado apenas com um período de incubação e onde os resultados são obtidos em torno de 2 horas, sendo mais rápido do que o kit pan-E Dengue Early ELISA que é realizado com duas incubações e os resultados são obtidos em torno de 2 horas e 30 minutos.

De acordo com estudos prévios e com os resultados obtidos neste estudo, a presença do antígeno NS1 no soro humano pode ser confirmado entre os dias 0 e 9 após o início dos sintomas. Neste contexto, a combinação da utilização da captura de antígeno NS1 aplicado a soros de fase aguda com a utilização do MAC-ELISA, em soros com 5-10 dias após o início dos sintomas, poderia aumentar a sensibilidade total de ambos os ensaios.

Resultados negativos para captura de antígeno NS1, não devem ser considerados necessariamente casos não-dengue. Resultados falso-negativos podem ser resultantes da formação de imunocomplexos do antígeno NS1 com a IgG, particularmente em

infecções secundárias para dengue, onde antígenos alvos não são mais acessíveis ao mAb (anticorpo monoclonal) do ELISA (Hang *et al*, 2008).

Portanto, de modo geral, os kits de captura de antígeno NS1 se mostraram sensíveis e específicos para utilização no diagnóstico precoce do dengue. Porém, como são mais eficientes na fase aguda da doença, os kits deverão ser utilizados em combinação com MAC-ELISA para aumentar a sensibilidade de detecção, principalmente em áreas de alta prevalência de infecções secundárias.

7 CONCLUSÕES

- O kit pan-E Dengue Early ELISA (PanBio Diagnostics) apresentou uma sensibilidade de 72% (308 / 426) e especificidade de 100%, considerando casos até o 6º dia após o início dos sintomas.
- A análise revelou que o antígeno NS1 pode ser detectado até o 6º após o início dos sintomas em aproximadamente 80% dos casos.
- Uma sensibilidade de 84% e 99% de especificidade foi obtida para o kit Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories), considerando casos até o 6º dia de doença após início dos sintomas.
- O kit Dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories) apresentou uma sensibilidade de 90% e 99% de especificidade, considerando casos até o 6º dia após o início dos sintomas.
- Os três kits foram mais sensíveis em confirmar casos positivos por isolamento viral do que em casos positivos por RT-PCR.
- A sensibilidade variou de 71% a 98% dependendo do sorotipo infectante. Casos de DENV-3 foram confirmados em menor proporção pelos três kits avaliados.
- Na presença de IgM a sensibilidade variou de 55% a 77%, significativamente menor do que quando o IgM era ausente (79% a 94%).
- Os resultados obtidos demonstraram uma maior sensibilidade de confirmação de casos de infecção primária pelo pan-E Early ELISA e pelo Platelia NS1, entretanto o NS1 Ag Strip não se observou variação em relação ao tipo de resposta imune humoral.

8 PERSPECTIVAS

A detecção precoce das infecções por dengue em áreas susceptíveis é de grande importância para auxiliar a prevenção de surtos e/ou epidemias.

Três estudos de comparação entre os kits da PanBio e BioRad haviam sido descritos (Bessoff et al., 2008, Dussart et al., 2008, McBride, 2009) e os resultados aqui obtidos, confirmaram a sensibilidade e alta especificidade dos testes de captura de antígeno NS1 para o diagnóstico precoce do dengue.

A disponibilidade destes kits tem possibilitado a detecção do vírus em localidades onde o isolamento viral e RT-PCR são inacessíveis. Neste contexto, o Ministério da Saúde tem utilizado estes kits como um método de triagem de amostras a serem submetidas ao isolamento viral, como um método na vigilância ativa do dengue. Dessa forma, amostras positivas para o antígeno NS1 devem ser estudadas por métodos clássicos de isolamento em cultivo de células permitindo estudos complementares de caracterização genética dos vírus isolados ou métodos moleculares para se determinar o sorotipo envolvido.

Por serem métodos mais eficientes na fase aguda da doença, a utilização em combinação com o MAC-ELISA em especial em áreas de alta prevalência de infecções secundárias, como no Brasil possibilitará o aumento do número de casos confirmados da doença.

Uma abordagem a ser proposta será a utilização dos kits de captura de antígeno NS1 a tecidos provenientes de casos fatais suspeitos de dengue, considerando-se que o país tem sido marcado por epidemias cada vez graves com a ocorrência de óbitos e a presença do vetor.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol.** 2002. 40:376-81.
- 2) Almond J, Clemens J, Engers H, Halstead S, Khiem HB, Pablos-Mendez A, Pervikov Y, Tram TT. Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children, 5-8 December 2001, Ho Chi Minh City, VietNam. **Vaccine.** 2002. 20:3043-6.
- 3) Alvarez DE, Lodeiro MF, Filomatori CV, Fucito S, Mondotte JA, Gamarnik AV. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Found Symp.** 2006. 277:120-32; discussion 132-5, 251-3.
- 4) Anonymus. Dengue 3 in Central America. Dengue Surveillance. Summary. San Juan, Puerto Rico. **Division of Vector-Borne Infectious Diseases (CDC).** 1995. 70: 4.
- 5) Araújo JM, Schatzmayr HG, de Fillipis AM, dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, Coelho JM, Nogueira RMR. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **J Virol Methods.** 2009a.155(1): 34-8.
- 6) Araújo JM, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Zanotto PM, Bello G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. **Infect Genet Evol.** 2009b. [Epub ahead of print].

- 7) Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsr A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul S, Yenchitsomanus P, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S, Malasit P. Vascular leakage in severe Dengue virus infections: a potential role for the non-structural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis**. 2006. 193: 1078–1088.
- 8) Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Atkinson JP, Diamond MS. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparin sulfate and chondroitin sulfate E. **PLoS Pathog**. 2007. 3(11):e183.
- 9) Bancroft TL. On the etiology of dengue fever. **Australian Medical Gazette**. 1906. 25:17.
- 10) Bessoff K, Delorey M, Sun W, Hunsperger E. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. **Clin Vaccine Immunol**. 2008. 15:1513-8.
- 11) Blacksell SD, Bell D, Kelley J, Mammen Jr MP, Gibbons RV, Jarman RG, Vaughn DW, Jenjaroen K, Nisalak A, Thongpaseuth S, Vongsouvath M, Davong V, Phouminh P, Phetsouvanh R, Day NP, Newton PN. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. **Clin Vaccine Immunol**. 2007. 14:1458-64.
- 12) Blacksell SD, Mammen MP Jr, Thongpaseuth S, Gibbons RV, Jarman RG, Jenjaroen K, Nisalak A, Phetsouvanh R, Newton PN, Day NP. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2008. 60(1):43-9.

- 13) Blaney JE Jr, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. **Viral Immunol.** 2006. 19(1):10-32.
- 14) Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaam J. Rapid and single method for purification of nucleic acid. **J Clin Microbiol.** 1990.28: 495-503.
- 15) Brandt WE, Chiewslip D, Harris DL, Russell PK. Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. **J Immunol.** 1970. 105:1565-8.
- 16) Brinton MA, Kurane I, Mathew A, Zeng L, Shi PY, Rothman A, Ennis FA. Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. **Clin Diagn Virol.** 1998. 10:129-39.
- 17) Brown J., Wilkinson R, Davidson RN, Wall R, Lloyd G, Howells J, Pasvol G. Rapid diagnosis and determination of duration of viraemia in dengue fever using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1996. 90(2):140-3.
- 18) Burke DS, Monath TP. 2001. Flaviviruses, p. 1043-1126. *In* a. PMHDM Knipe (ed.), **Fields Virology**, 4th ed, vol. 1. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- 19) CDC. 2006. **Emerging Infectious Diseases.** [online] www.cdc.gov/eid Vol. 12, No. 6, June.
- 20) Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2009. 64:91-2.

- 21)Chambers TJ, Hahn C, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annu Rev Microbiol.** 1990. 44:649-688.
- 22)Chang KJ. Studies on the serological cross-reaction between dengue and Japanese encephalitis. **J Microbiol Immunol Infect.** 1997. 30:207-18.
- 23)Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **J Virol.** 1996. 70:8765-72.
- 24)Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. **Pediatr Infect Dis J.** 2008. 27:43-48.
- 25)Chungue E., Boutin JP, Roux J. Antibody capture ELISA for IgM antibody titration in sera for dengue serodiagnosis and surveillance. **Research in Virology.** 1989. **140**, pp. 229–240.
- 26)Clarke DH & Casals J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. **Am J Trop Med Hyg.** 1958. 7:561-73.
- 27)Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J of Virology.** 2006. 80(83): 11418-11431.
- 28)Cordeiro MT, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Oliveira VF, Melo WT, Carvalho EF. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2007a. 40(6): 605-611.

- 29)Cordeiro MT, Silva AM, Brito CA, Nascimento EJ, Magalhães MC, Guimarães GF, Lucena-Silva N, de Carvalho EM, Marques Jr ET. Characterization of a Dengue Patient Cohort in Recife, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** 2007b. 77:1128-1134.
- 30) Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AM. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. **Virology.** 2007. 358:413-423.
- 31)Crooks, A.J., Lee, J.M., Dowsett, A.B., Stephenson, J.R., Purification and analysis of infectious virions and naïve non-structural antigens from cells infected with tick-borne encephalitis virus. **J. Chromatogr.** 1990. 502, 59–68.
- 32)Crooks, A.J., Lee, J.M., Easterbrook, L.M., Timofeev, A.V., Stephenson, J.R., The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. **J. Gen. Virol.** 1994. 75, 3453–3460.
- 33)Cunha RV & Nogueira RMR. Dengue e Dengue Hemorrágico. Cap. 151, p. 1767-1781. In: Coura JR (ed). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2005.
- 34)Cuzzubbo AJ, Endy TP, Nisalak A, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Ogata SA, Clements DE, Devine PL. Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2001. 8(6):1150-5.
- 35)DePaula SO, Pires Neto RJ, Correa JÁ, Assumpção SR, Costa ML, Lima DM, Fonseca BA. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue vírus in endemic region: a validation study. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2002. 96:266-269.

- 36)Drosten C, Gotting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Gunther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. **J Clin Microbiol.** 2002. 40(7): 2323-2330.
- 37)Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, Storck-Herrmann C, Cesaire R, Morvan J, Flamand M, Baril L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clin Vaccine Immunol.** 2006. 13:1185-1189.
- 38)Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, Matheus S, Baril L. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. **PLoS Negl Trop Dis.** 2008. 2:e280.
- 39)Edelman R, Wasserman SS, Bodison SA, Putnak RJ, Eckels KH, Tang D, Kanesa-Thanan N, Vaughn DW, Innis BL, Sun W. Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. **Am J Trop Med Hyg.** 2003. 69:48-60.
- 40)Edelman R. Dengue vaccines approach the finish line. **Clin Infect Dis.** 2007. 45 Suppl 1:S56-60.
- 41)Edelman R & Hombach J. "Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas": summary of a World Health Organization Technical Consultation. **Vaccine.** 2008. 26(33):4113-4119.
- 42)Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, Elm J, Tom T, Reiter P, Rigau-Perez JG, Hayes JM, Mills K, Napier M, Clark GG, Gubler DJ. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. **Emerg Infect Dis.** 2005. 11: 742-749.

- 43)Falconar AK & Young PR. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. **J Virol Methods**. 1990. 30:323-332.
- 44)Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol**. 1997.142(5):897-916.
- 45)Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Epault, J., Rey, F.A., Deubel, V., 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J. Virol.* 73, 6104–6110
- 46)Figueiredo LT, Carlucci RH, Duarte G. Prospective study with infants whose mothers had dengue during pregnancy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 1991. 36: 417-421.
- 47)Figueiredo LT, Batista WC, Igarashi A. A simple reverse transcription-polymerase chain reaction for dengue type 2 virus identification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1997. 92(3):395-398.
- 48)Figueiredo LT, Batista WC, Kashima S, Nassar ES. Identification of Brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using Flavivirus universal primers. **Am J Trop Med Hyg**. 1998. 59:357-362.
- 49)Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect**. 2000. 2:1643-9.
- 50)Figueroa R & Ramos C. Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. **Arch Med Res**. 2000. 31:429-30.

- 51)Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **J Virol**. 1999. 73(7):6104-10.
- 52)FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 2002. 5 ed. Brasília: FUNASA.
- 53)Gollins SW & Porterfield JS. A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by antiviral antibody. **Nature**. 1986. 321:244–246.
- 54)Gómez-Dantés H & Willoquet JR. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. **Cad Saude Publica**. 2009. 25 Suppl 1:S19-31.
- 55)Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicase of flavi-and pestiviruses may be serine proteases. **Nucleic Acids Res**. 1989a. 17:3889-38897.
- 56)Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. Two related superfamilies of putative helicase involved in replication, recombination, repairs and expression of DNA and RNA genomes. **Nucleic Acids Res**. 1989b. 17: 4713-4729.
- 57)Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg**. 1984. 33:158-165.
- 58)Gubler DJ & Sather G. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. **Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue**. 1988. Rio de Janeiro, Brasil.
- 59)Gubler DJ. Dengue. pp. 223-260. In: Monath TP (ed.). Arboviruses: **Epidemiology and Ecology**. 1992. Vol. II, Chapter 23. Boca Raton, FL: CRC Press.

- 60)Gubler DJ & Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerg Infect Dis**. 1995. 1:55-7.
- 61)Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. 1 - 22. In: Gubler DJ, Kuno G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 1997. **CAB International**, New York, New York, USA.
- 62)Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev**. 1998. 11: 480-96.
- 63)Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med Res**. 2002. 33: 330-42.
- 64)Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp**. 2006. 277:3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-253.
- 65)Guimarães R. Princípios de imunopatogenia da dengue hemorrágica. **J Bras de Medicina**. 1999. 77(1).
- 66)Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, Georgakopoulos K, Catalan J, Ocran S, Soike K, Ratterree M, Monath TP. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. **J Virol**. 2001. 75:7290-7304.
- 67)Guirakhoo F, Kitchener S, Morrison D, Forrat R, McCarthy K, Nichols R, Yoksan S, Duan X, Ermak TH, Kanesa-Thanan N, Bedford P, Lang J, Quentin-Millet MJ, Monath TP. Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. **Hum Vaccin**. 2006. 2(2):60-67.

- 68)Guzman MG, Rosario D, Mune M, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G. [Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994]. **Rev Cubana Med Trop.** 1996. 48:114-117.
- 69)Guzman MG & Kouri G. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis.** 2002. 2:33-42.
- 70)Halstead SB & Palumbo NE. Studies on the immunization of monkeys against dengue. II. Protection following inoculation of combinations of viruses. **Am J Trop Med Hyg.** 1973. 22:375-381.
- 71)Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. **Bull World Health Organ.** 1980. 58:1-21.
- 72)Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science.** 1988. 239(4839): 476-481.
- 73)Halstead SB. Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir. **Rev Cubana Med Trop.** 2002. 54(3): 171-179.
- 74)Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Rev Panam Salud Publica.** 2006. 20:407-415.
- 75)Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science.** 1960. 131:1102-1103.
- 76)Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, Van Ngoc T, Hien TT, Farrar J, Wills B, Simmons CP. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. **PLoS Negl Trop Dis.** 2009. 3:e360.

- 77) Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaseda A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. **J Clin Microbiol.** 1998. 36(9):2634-9.
- 78) Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **Am J Trop Med Hyg.** 1982. 31:830-836.
- 79) 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. 34:162-169.
- 80) Henchal EA & Putnak JR. The dengue viruses. **Clin Microbiol Rev.** 1990. 3:376-396.
- 81) Heymann WR. Dengue Fever. **J Am Acad Dermatol.** 2009. 60:306-307.
- 82) Holmes EC, Bartley LM, Garnett GP. The emergence of dengue past, present and future In: Krause RM, editor. **Emerging Infectors** ; London: Academic Press; 1998. p. 301-25.
- 83) Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. **Novartis Found Symp.** 2006. 277:177-87; discussion 187-92, 251-253.
- 84) Hombach J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. **Rev Panam Salud Publica.** 2007. 21:254-260.
- 85) Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, Lin YL, Kuo MD, Yao CW, Shaio MF. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. **J Med Virol.** 2001. 65:553-560.

- 86)Huang CY, Butrapet S, Tsuchiya KR, Bhamarapravati N, Gubler DJ, Kinney RM. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. **J Virol**. 2003. 77:11436-11447.
- 87)Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **J Gen Virol**. 1978. 40:531-544.
- 88)Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **Am J Trop Med Hyg**. 1989. 40:418-427.
- 89)Jan LR, Yang CS, Trent DW, Falgout B, Lai CJ. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. **J Gen Virol**. 1995. 76 (Pt 3):573-580.
- 90)Khromykh AA & Westaway EG. "Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications" **J Virol**. 1997 71:1497-1505.
- 91)Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, Osterhaus AD. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. **J Clin Microbiol**. 2003. 41(9):4154-9.
- 92)Kouri G, Guzman MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. **Bull Pan Am Health Organ**. 1986. 20:24-30.
- 93)Kumarasamy V. Dengue fever in Malaysia: time for review? **Med J Malaysia**. 2006. 61(1):1-3.

- 94)Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, Mohamad M, Chua KB. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. **J Virol Methods**. 2007.140:75-79.
- 95)Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Med Hyg**. 1987. 36:153-159.
- 96)Kuno G, Cropp CB, Wong-Lee J, Gubler DJ. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. **Am J Trop Med Hyg**. 1998. 59(5): 757-62.
- 97)Lam SK & Devine PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. **Clin Diagn Virol**. 1998. 10(1):75-81.
- 98)Lam SK, Ew CL, Mitchell JL, Cuzzubbo AJ, Devine PL. **Clin Diagn Lab Immunol**. 2000. 7(5):850-852.
- 99)Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**. 1992. 30:545-551.
- 100) Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, Chakorn T, Yoksan S, Wattanamongkolsil L, Thamlikitkul V. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2008. 60:387-391.
- 101) Libraty DH, Endy TP, Houn H, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **J Infect Dis**. 2002. 185:1213-1221.

- 102) Lindenbach BD & Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **J Virol.** 1999. 73:4611-4621.
- 103) Lindenbach BD & Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication.. *In* Knipe DM & Howley PH (ed.), **Fields Virology**. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2001. p. 991-1041.
- 104) Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **J Virol.** 2002. 76, 5480–5491.
- 105) Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Despres P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A. Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. **J Biol Chem.** 2005. 280:23698-23708.
- 106) Ludert JE, Mosso C, Ceballos-Olvera I, del Angel RM. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. **Virology.** 2008. J 5:51.
- 107) Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology.** 1996. 220:232-240.
- 108) Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat Med.** 2004.10:S98-109.

- 109) Malavige GN, Fernando S, Dernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. **Postgrad Med J**. 2004. 80(948):588-601.
- 110) Martínez E. Dengue. **Estudos Avançados**. 2008. 22(64): 33-52.
- 111) Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. **Virology**. 1989. 169: 354-364.
- 112) McBride WJ. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2009. 64:39-44.
- 113) McSherry JA. Some medical aspects of the Darien scheme: was it dengue? **Scott Med J**. 1982. 27:183-184.
- 114) Miagostovich MP, Nogueira RMR, Cavalcanti SMB, Marzochi KBF, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 1993. 35: 149-154.
- 115) Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. 1997. **Clin Neuropathol**. 16: 204-208.
- 116) 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. 14:183-189.
- 117) Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker L, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations alterations in a 2K-regulated manner. **J Biol Chem**. 2007. 282(12): 8873-8882.

- 118) Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog.** 2008. 4:e17.
- 119) Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1994. 91:2395-2400.
- 120) Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.** 1991. 29(10): 2107-2110.
- 121) Nathan MB & Dayal-Drager R. Recent epidemiological trends, the global strategy and public health advances in dengue. **Report of the Scientific Working Group on Dengue.** 2006.
- 122) Nawa M. Effects of bafilomycin A1 on Japanese encephalitis virus in C6/36 mosquito cells. **Arch Virol.** 1998. 143 (8):1555-1568.
- 123) Nestorowicz A, Chambers TJ, Rice CM. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: effects on proteolytic processing, viral replication, and evidence for alternative processing of the NS2A protein. **Virology.** 1994. 199(1):114-123.
- 124) Nishiura H & Halstead SB. Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. **J Infect Dis.** 2007. 195:1007-1013.
- 125) Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MFDB, Farias Filho JC. Virological Study of a Dengue Type 1 Epidemic at Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1988. 83 (2): 219-25.

- 126) Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: cocirculation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiol Infect.** 1993.111: 163-170.
- 127) Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Moraes GC, Cardoso FMA, Ferreira J, Cerqueira V, Pereira M. Dengue type 2 outbreak in the south of the State of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 1995. 37: 507-510.
- 128) Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad Saude Publica.** 2000. 16:205-1.
- 129) Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue virus in Brazil. **Dengue Bull.** 2002. 26: 1-10.
- 130) Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Fillipis AMB, dos Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, Souza LJ, Guimarães FR, Araújo ESM, De Simone TS, Baran M, Teixeira JR G, Miagostovich MP. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis.** 2005. 11(9): 1376-1381.
- 131) Ong SH, Yip JT, Chen YL, Liu W, Harun S, Lystiyaningsih E, Heriyanto B, Beckett CG, Mitchell WP, Hibberd ML, Suwandono A, Vasudevan SG, Schreiber MJ. Periodic re-emergence of endemic strains with strong epidemic potential-a proposed explanation for the 2004 Indonesian dengue epidemic. **Infect Genet Evol.** 2008; 8(2): 191-204.
- 132) Ooi EE, Goh KT, Gubler DJ. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerg. Infect. Dis.** 2006. v.12, n.6, p.887-893.

- 133) Osanai CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos AC, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 1983. 25: 53-54.
- 134) **PAHO** (Organização Panamericana de Saúde). 1989. El desafio de la epidemiologia. Problemas y lecturas seleccionadas. Publicación científica n° 505. Washington, DC.
- 135) **PAHO** (Organização Panamericana de Saúde). Resurgimiento del dengue en las Américas. Boletín Epidemiológico. 1997. 18: 1-6.
- 136) **PAHO Dengue website**. 2002. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2002. www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2002.htm Acesso em: 03/06/2009.
- 137) **PAHO Dengue website**. 2003. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2003. www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2003.htm Acesso em: 03/06/2009.
- 138) **PAHO Dengue website**. 2004. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2004. www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2004.htm Acesso em: 03/06/2009.
- 139) **PAHO Dengue website**. 2005. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2005. www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2005.htm Acesso em: 03/06/2009.

- 140) **PAHO Dengue website**. 2006. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2006. www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2006.htm Acesso em: 03/06/2009.
- 141) **PAHO Dengue website**. 2008. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2008. www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2008.htm Acesso em: 03/06/2009.
- 142) **PAHO**. 2009. Regional Update on Dengue in the Americas. Epidemiological Status, January to March 2009.
- 143) Palmer CJ, King SD, Cuadrado RR, Perez E, Baum M, Ager AL. Evaluation of the MRL diagnostics dengue fever virus IgM capture ELISA and the PanBio Rapid Immunochromatographic Test for diagnosis of dengue fever in Jamaica. **J Clin Microbiol**. 1999. 37:1600-1.
- 144) Perera R. & Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microbiol**. 2008. 11(4): 369-77.
- 145) Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hungle Q, Binh TQ, Nam NV, Groen J, de Vries PJ. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2009. 63:372-8.
- 146) Pinheiro FP. Dengue in the Americas. 1980-1987. **Epidemiol Bull**. 1989. 10:1-8.
- 147) Pryor MJ & Wright PJ. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. **Virology**. 1993. 194: 769-780.

- 148) Pugachev KV, Guirakhoo F, Trent DW, Monath TP. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. **Int J Parasitol.** 2003. 33:567-582.
- 149) Putnak RJ, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Hough HS, Chen RC, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garçon N, Gheysen D, Kanesa-Thanan N, McDonnell M, Humphreys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine.** 2005. 23(35):4442-4452.
- 150) Raviprakash K, Ewing D, Simmons M, Porter KR, Jones TR, Hayes CG, Stout R, Murphy GS. Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. **Virology.** 2003. 315:345-352.
- 151) Raviprakash K, Apt D, Brinkman A, Skinner C, Yang S, Dawes G, Ewing D, Wu SJ, Bass S, Punnonen J, Porter K. A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. **Virology.** 2006. 353(1):166-173.
- 152) Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science.** 1985. 229: 726-733.
- 153) Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Adv Virus Res.** 2003. 59: 315-341
- 154) Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet.** 1998. 352:971-977.

- 155) Rigau-Perez JG, Ayala-Lopez A, Garcia-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, Cano MP, Clark GG. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **Am J Trop Med Hyg.** 2002.67:355-362.
- 156) Rodhain F, Rosen L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. 1997. 45 - 60. *In:* Gubler DJ, Kuno G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 1997. **CAB International**, New York, New York, USA.
- 157) Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. **Am J Trop Med Hyg.** 1954. 3:878-882.
- 158) Rothman AL & Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology.** 1999. 257:1-6.
- 159) Sá RT & Zagne SMO. Classificação da Dengue. *In:* Souza LJ. **Dengue – Diagnóstico, Tratamento e Prevenção.** 2008. 2ed. Rio de Janeiro: Rubio. Cap. 5:66-74.
- 160) Sabin AB. Research on dengue during World War II. **Am J Trop Med Hyg.** 1952. 1:30-50.
- 161) Sanchez V, Gimenez S, Tomlinson B, Chan PK, Thomas GN, Forrat R, Chambonneau L, Deauvieu F, Lang J, Guy B. Innate and adaptive cellular immunity in flavivirus-naïve human recipients of a live-attenuated dengue serotype 3 vaccine produced in Vero cells (VDV3). **Vaccine.** 2006. 24(23):4914-4926.

- 162) Sang CT, Cuzzubbo AJ, Devine PL. Evaluation of a commercial capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. **Clin Diagn Lab Immunol.** 1998. 5(1):7-10.
- 163) Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA. An outbreak of Dengue Virus at Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1986. 81(2): 245-6.
- 164) Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2000. 95 Suppl 1:179-181.
- 165) Schilling S, Ludolfs D, Van An L, Schmitz H. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. **J Clin Virol.** 2004. 31(3):179-184.
- 166) Schliesman DJ, Calheiros LB. A review of the status of yellow fever and *Aedes aegypti* eradication programs in the Americas. **Mosq. News** 1974. 34: 1-9.
- 167) Sekaran SD, Ew CL, Kantesh BM, Appana R, Subramaniam G. Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. **J. Infect. Developing Countries.** 2007. 1: 182-188.
- 168) **SES/RJ** (Secretaria de Saúde e Defesa Civil – RJ). 2008. Relatório de Casos de Dengue – 2008. [online]<http://www.saude.rj.gov.br/Docs/Acoes/dengue/Dengue/Relat%C3%B3rio%20de%20Casos%20de%20Dengue%2018-02-2009%20-%2019h25m%20-%202008.pdf> Acesso em: 23/05/2009.
- 169) Shu PY, Chen LK, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. **J Clin Microbiol.** 2004. 42(6):2489-94.

- 170) Siler J, Hal M, Hitchens A. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philippine Journal of Science**. 1926. 29:1-302.
- 171) Siqueira JB, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis**. 2005. 11:48-53.
- 172) Simmons CP, Halstead SB, Rothman A, Harris E, Sreaton G, Rico-Hesse R, Vaughn D, Holmes E, Guzman M. Understanding pathogenesis, immune response and viral factors. **Report of the Scientific Working Group meeting on Dengue**. 2006. Oct 1–5; Geneva, Switzerland.
- 173) Smith GW & Wright PJ. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. **J Gen Virol**. 1985. 66 (Pt 3):559-571.
- 174) Souza JS, Zagne SMO, Siqueira EWS, Bastos DA, Gonçalves PA, Zagne LO. Aspectos Clínicos, Manifestações Típicas e Atípicas e Dengue na Gravidez. In: Souza LJ. **Dengue – Diagnóstico, Tratamento e Prevenção**. 2008. 2ed. Rio de Janeiro: Rubio. Cap. 4:44-65 .
- 175) Sun W, Edelman R, Kanesa-Thanan N, Eckels KH, Putnak JR, King AD, Hough HS, Tang D, Scherer JM, Hoke Jr CH, Innis BL. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. **Am J Trop Med Hyg**. 2003. 69:24-31.
- 176) **SVS** (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2007. Balanço Dengue Janeiro a Julho de 2007. Disponível em: http://www.infectologia.org.br/anexos/MS-SVS_balan%C3%A7o%20dengue%20jan-jul%202007.pdf Acessado em: 17/08/2008.

- 177) **SVS** (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2008. Informe epidemiológico da dengue. Janeiro a Novembro de 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf. Acessado em: 03/12/2008.
- 178) **SVS** (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2009. Relatório de casos de dengue – 2008. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/Docs/Acoes/dengue/Relat%C3%B3rio%20de%20Casos%20de%20Dengue%2021-01-2009%20-%2018h40m.pdf> Acessado em: 26/03/2009.
- 179) Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cad Saude Publica**. 2005. 21:1307-1315.
- 180) Teixeira MG; Costa Mda C; Barreto F; Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad Saude Publica**. 2009. 25 Suppl 1: S7-18.
- 181) Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. **Adv Virus Res**. 2003. 61:235-289.
- 182) Timofeev AV, Butenko VM, Stephenson JR. Genetic vaccination of mice with plasmids encoding the NS1 non-structural protein from tick-borne encephalitis virus and dengue 2 virus. **Virus Genes**. 2004. 28:85-97.
- 183) Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. **Infect Disord Drug Targets**. 2009. 9(3):327-343.

- 184) Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J Gen Virol.** 2006. 87(Pt 9): 2605-2614.
- 185) Valdes K, Alvarez M, Pupo M, Vazquez S, Rodriguez R, Guzman MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2000. 7:856-857.
- 186) Varas CY. Rol de las Proteinas no Estructurales en los Eventos de Replicación del ARN del Virus Dengue: Propuesta de un Modelo de Replicación del ARN. **Rev Peru Med Exp Salud Publica.** 2003. 20(1): 51-57.
- 187) Vasconcelos PFC, Rosa APAT, Dégallier N, Rosa JFST, Pinheiro FP. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of **Science.** 1992. 44: 117-124.
- 188) Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Nguyen MD, Kneen R, Cuzzubbo A, Devine PL. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. **Am J Trop Med Hyg.** 1999. 60:693-698.
- 189) Vorndam V & Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler, DJ, Kuno G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York: **CAB International.** 1997.
- 190) Wengler G, Nowak T, Wahn K. Analysis of the influence of proteolytic cleavage on the structural organization of the surface of the West Nile flavivirus leads to the isolation of a protease-resistant E protein oligomer from the viral surface. **Virology.** 1987.160:210-219.

- 191) Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich YA, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JS, Russell PK, Trent DW. Flaviviridae. **Intervirology**. 1985. 24: 183–192.
- 192) Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. **J. Virol**. 1997. 71:6650–6661.
- 193) Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. **Virology**. 1989. 171:302-305.
- 194) Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE, Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. **J Virol**. 2003. 77:1653-1657.
- 195) Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol**. 2007. 5: 518-528.
- 196) **World Health Organization**. 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/index.html>. Acesso em: 26/05/2009.
- 197) **World Health Organization**. 2002. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Fact Sheet N° 117, revised April 2002. www.who.int/csr/disease/en/who. Acesso em: 26/05/2009.

- 198) **World Health Organization**. 2006. Report of the meeting of the WHO task force on clinical trials of dengue vaccine. Geneva. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. (WHO/ IVB/06.10).
- 199) **World Health Organization**. 2008. **Experts propose simplified system of dengue classification**. www.who.int/tdr/svc/news-events/new/dengue-classification. Acesso em: 02/02/2009.
- 200) Wu SJ, Hanson B, Paxton H, Nisalak A, Vaughn DW, Rossi C, Henschel EA, Porter KR, Watts DM, Hayes CG. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue virus. **Clin Diagn Lab Immunol**. 1997. 4(4):452-7.
- 201) 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, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat Med**. 2000. 6:816-820.
- 202) Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, He LJ, Yuen KY, Che XY. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J Clin Microbiol**. 2006. 44:2872-2878.
- 203) Yauch LE & Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. **Antiviral Res**. 2008. 80(2):87-93.
- 204) Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol**. 2000. 38:1053-1057.

- 205) Zainah S, Wahab AH, Mariam M, Fauziah MK, Khairul AH, Roslina I, Sairulakhma A, Kadimon SS, Jais MS, Chua KB. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. **J Virol Methods**. 2009. 155:157-160.
- 206) Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**. 2003. 22(11): 2604-2613.
- 207) Zaki A, Perera D, Jahan SS, Cardoso MJ. Phylogeny of dengue viruses circulating in Jeddah, Saudi Arabi: 1994 to 2006. **Trop Med Int Health**. 2008; 13(4):584-592.