



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Angela Ferreira Lopes de Teive e Argolo

**Circulação dos vírus dengue no Estado de Goiás: vigilância
laboratorial (1994-2013) e perfil de anticorpos neutralizantes
sorotipo específico durante o surto de 2013 em Goiânia**

**Goiânia,
2014**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

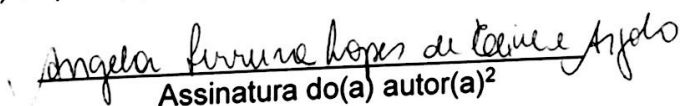
Nome completo do autor: Angela Ferreira Lopes de Teive e Argolo

Título do trabalho: Circulação dos vírus dengue no estado de Goiás: vigilância laboratorial (1994-2013) e perfil de anticorpos neutralizantes sorotipo específico durante o surto de 2013 em Goiânia

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

C Mantell

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 25 / 07 / 2018

Versão atualizada em setembro de 2017.

Angela Ferreira Lopes de Teive e Argolo

Circulação dos vírus dengue no Estado de Goiás: vigilância laboratorial (1994-2013) e perfil de anticorpos neutralizantes sorotipo específico durante o surto de 2013 em Goiânia

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli
Co-orientador: Profa. Dra. Valéria Christina Rezende Féres

**Goiânia,
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ferreira Lopes de Teive e Argolo, Angela

Circulação dos vírus dengue no Estado de Goiás: vigilância
laboratorial (1994-2013) e perfil de anticorpos neutralizantes sorotipo
específico durante o surto de 2013 em Goiânia [manuscrito] / Angela
Ferreira Lopes de Teive e Argolo. - 2014.

xx, 110 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli; co-orientadora
Dra. Valéria Christina de Rezende Féres.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2014.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Vírus dengue. 2. Vigilância laboratorial. 3. Anticorpos
neutralizantes. 4. Goiás. 5. Brasil. I. Maria Turchi Martelli, Celina,
orient. II. Título.

CDU 614



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgntsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE ANGELA FERREIRA LOPES DE TEIVE E ARGOLO - Aos dezenove dias do mês de dezembro do ano de 2014 (19/12/2014), às 09 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. CELINA MARIA TURCHI MARTELLI, MARIA CYNTHIA BRAGA, MARLI TENÓRIO CORDEIRO, MARILIA DALVA TURCHI e SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: “PERFIL DE ANTICORPOS SOROTIPO ESPECÍFICO EM COORTE DE PACIENTES COM DENGUE DURANTE A EPIDEMIA DE 2013, GOIÂNIA-GO, BRASIL”, em nível de DOUTORADO, área de concentração em EPIDEMIOLOGIA, de autoria de ANGELA FERREIRA LOPES DE TEIVE E ARGOLO, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. CELINA MARIA TURCHI MARTELLI, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli

Profa. Dra. Maria Cynthia Braga

Profa. Dra. Marli Tenório Cordeiro

Profa. Dra. Marília Dalva Turchi

Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo dos Santos

Aprovada / Reprovada

Aprovada

APROVADA

APROVADA

Aprovada

Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em EPIDEMIOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 50 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Maria Cynthia Braga (FIOCRUZ/PE)

Profa. Dra. Marli Tenório Cordeiro (FIOCRUZ/PE)

Profa. Dra. Marília Dalva Turchi (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo dos Santos (IPTSP/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Angela Ferreira Lopes de Teive e Argolo

Orientador (a): Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli

Co-orientador (a): Profa. Dra. Valéria Christina Rezende Féres

Membros:

1. Celina Maria Turchi Martelli

2. Marli Tenório Cordeiro

3. Maria Cynthia Braga

4. Marília Dalva Turchi

5. Silvia Helena Rabelo dos Santos

Data: 19/12/2014

Dedicatória

Com amor aos meus pais José e Terezinha e ao meu esposo Rogério.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar os meus passos e conduzir meu caminho.

Aos meus pais José e Terezinha que me ensinam diariamente que a vida é feita de muitas coisas entre elas amor, humildade, trabalho duro, fé e perseverança.

Ao meu companheiro de todas as horas, meu esposo Rogério Argolo. Agradeço seu amor, paciência e toda a alegria que acende na minha vida!

A toda minha família irmãs, tios, primos, madrinhas, padrinho e aos meus sogros. Agradeço especialmente aos meus avós: Joaninha, Ana, Lucas, Vó Bisa, Adélia e Joaquim que estando neste mundo ou não, sempre me enviam suas mensagens de amor. À irmã Angela que sempre olha por mim!

Aos amigos de longa data: Alba, Boto, Luciana, Junim, Dani, Jú, Fê, Nina, Lauro, Robs, Léo, Lina e Luciele, porque são meus amigos e isso é bom demais!

Aos amigos do LACEN-GO, especialmente ao Vinícius Lemes, Lucileis Fernandes, Marlene de Fátima, Livia Coutinho, Maysa Madalena, Aparecida de Paiva (Cida), Myriam Campos e Carmem Helena que muito me apoiaram nesta jornada.

Ao nosso grupo de estudos da UFG: Lucimeire Antonelle, Mônica da Guarda, Isabela Cinquini, Priscilla Teixeira, Benigno Rocha, Adriana Guilarde, Mariana Tassara, Loise Costa, pelo trabalho desenvolvido em conjunto e a contribuição de cada um para o crescimento do grupo.

Aos pesquisadores, professores e alunos do LaViTE, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE, pela acolhida, ensinamentos, apoio e amizade. Especialmente agradeço aos professores Marli Cordeiro, Bartolomeu Accioli, Laura Gil, Ernesto Marques, Rafael Dhalia e aos queridos amigos Doristela Sena, Priscila Castanha, Geórgia Guimarães, Amanda Oliveira, Laís Rodrigues, Mayara Marques, Kennya Lopes, Clintiano

Curvêlo, André Pastor, Janaína Correia, Sandra Arenhart, Verônica Gomes e Diégina, não tenho palavras para lhes agradecer!

Ao Prof. João Bosco Siqueira Jr. que está sempre disponível à me receber e a ensinar.

À Prof. Marília Dalva Turchi pelo carinho, amizade e praticidade em resolver as questões do dia a dia!

À FAPEG e ao CNPQ pelo financiamento deste estudo.

Agradeço especialmente as minhas professoras Dra. Celina Maria Turchi Martelli e Dra. Valéria Christina de Rezende Féres que me fazem sentir honrada em ser sua aluna. Nesses anos de convivência entre o mestrado e doutorado, nasceu uma amizade pautada no carinho e respeito. Muitas são as histórias que temos para contar!

SUMÁRIO

Sumário	Ix
Figuras e tabelas	X
Siglas e abreviaturas	Xii
Apresentação	Xiv
Resumo	Xvi
Abstract	Xviii
1. Introdução	20
Dengue no mundo	21
Dengue no Brasil	23
Vírus dengue	27
Fisiopatologia e manifestações clínicas	31
Imunopatogênese da dengue	33
Diagnóstico laboratorial da dengue	38
2. Justificativa	45
3. Objetivos	47
4. Resultados	48
4.1. Manuscrito 1	48
4.2. Manuscrito 2	60
5. Discussão	105
6. Conclusões	109
9. Anexos	110

FIGURAS, TABELAS E GRÁFICO

Introdução

Figura 1. Risco global de infecções por dengue, 2012.	14
Figura 2. Estrutura da partícula viral da família <i>Flaviviridae</i> .	22
Figura 3. Estrutura das partículas dos flavivírus.	23
Figura 4. Representação esquemática do ciclo replicativo dos vírus da família <i>Flaviviridae</i> .	23
Figura 5. Immunopatogênese da dengue grave na infecção secundária.	29
Figura 6. Mecanismo hipotético para explicar a atividade de citocinas durante a infecção por DENV.	33
Figura 7. Comparação dos testes diagnósticos de acordo com a acessibilidade às técnicas e confirmação da infecção por DENV.	35
Figura 8. Técnicas laboratoriais utilizadas para diagnóstico de dengue: interpretação de resultados e características das amostras para análise.	38
Tabela 1. Classificação dos genótipos dos vírus dengue.	25
Gráfico 1. Série histórica de casos notificados de dengue em Goiânia-GO, 1994-2013.	20

Manuscrito 1

Table 1. Characteristics of dengue patients and serotype-specific neutralizing antibody response by disease severity, during 2012-2013 outbreak in central Brazil	62
Table 2. Individual data of patients according to specific dengue tests, serotype-specific reciprocal PRNT ₅₀ titers and clinical classification, during 2012-2013 outbreak in central Brazil.	63
Figure 1. Neutralizing antibody response defined by PRNT ₅₀ to DENV-1 to 4 by age groups.	66
Figure 2. Representation of reciprocal DENV PRNT ₅₀ values in acute and convalescent sera.	66

Figure 3. Difference between reciprocal PRNT50 titers in paired samples. 67

Figure 4. Graphical representation of reciprocal PRNT50 titers (log 10) in paired sera stratified for acute or convalescent phase of disease stratified by DENV-1 or DENV-4 determined by RT-PCR. 68

Manuscrito 2

Tabela 1. Distribuição dos casos notificados de dengue em Goiás em relação ao percentual de positividade pelo isolamento viral e o sorotipo viral identificado, 1994 a 2013. 80

Figura 1. Incidência de dengue no Brasil e em Goiás no período de 1994 a 2013. 81

Figura 2. Circulação de sorotipos virais identificados por isolamento viral no estado de Goiás, 1994 a 2013. 81

SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	Antibody dependent enhancement
Ac	Anticorpo
AcN ou NAbs	Anticorpos neutralizantes
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAS	Dengue com Sinais de Alarme
DENV	Vírus dengue
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LACEN-GO	Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros – Goiás
MS	Ministério da Saúde
NS1Ag	Antígeno da proteína não estrutural 1 (<i>Non structural protein 1 antigen</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização PanamERICANA de Saúde
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas (<i>Plaque reduction neutralizing test</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>)
SCD	Síndrome de choque por dengue
SES/GO	Secretaria de Estado da Saúde de Goiás
SMS	Secretaria de Saúde Municipal
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
UFG	Universidade Federal de Goiás
WHO	World Health Organization

μL	Microlitro
%	Porcentagem
°C	Graus Célsius

APRESENTAÇÃO

O atual cenário da dengue no Brasil é caracterizado pela circulação dos quatro sorotipos virais (DENV-1 a 4) em todas as regiões do país com um incremento expressivo do número de casos, hospitalizações e óbitos de forma acentuada desde a última década (BRASIL, 2014, TEIXEIRA, 2013).

Evidências científicas correlacionam o desenvolvimento de formas graves da dengue durante infecção secundária heterotípica. Neste contexto mecanismos de resposta imunológica estariam alterados promovendo uma série de respostas anormais que contribuem para a patogenia e gravidade da dengue (LEI, 2001, COFFEY, 2009).

Para melhor compreender os mecanismos relacionados à imunopatogênese da dengue foi organizado um projeto de pesquisa que integra uma rede multidisciplinar- Pronex Rede-Dengue – financiado pelo CNPq/FAPEG, o qual congrega centros de excelência em pesquisa em dengue no Brasil.

Esta tese de doutorado integra a linha de pesquisa em dengue coordenada pela Prof^a. Dra. Celina Maria Turchi Martelli, sendo um produto do projeto de pesquisa multicêntrico intitulado: **“Imunopatogenia da infecção do dengue: determinantes genéticos virais e dos hospedeiros (humano e vetor) associados à patogenia do dengue”**, do qual nosso grupo de pesquisa participa sob a coordenação geral do Dr. Ernesto Marques do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE e coordenação na UFG da Profa. Dra. Valéria Christina de Rezende Féres.

A tese está apresentada com uma introdução ao tema dengue, dois artigos científicos, discussão e conclusão.

O primeiro artigo “Vigilância laboratorial de dengue: série histórica da circulação dos DENV em Goiás, 1994-2013”, objetivou analisar o monitoramento da circulação dos vírus dengue no estado a partir dos resultados dos testes de isolamento viral realizados no LACEN desde o início da década de 90. Acreditamos que este estudo contribui para melhor compreensão do cenário epidemiológico da dengue em Goiás assim como para aprimorar as ações de vigilância epidemiológica da dengue no estado.

O segundo artigo “*High frequency of pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Central Brazil*”, se refere à caracterização de anticorpos neutralizantes antidengue sorotipo específico em pacientes com dengue recrutados durante a maior epidemia de dengue já registrada no país no ano de 2013. Para a realização desse estudo houve intercâmbio técnico-científico com o Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE, que resultou em aperfeiçoamento de recursos humanos e transferência de conhecimento para implantação da técnica de neutralização por redução de placas (PRNT) no Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO). Esta técnica é importante na pesquisa de anticorpos neutralizantes preexistentes para avaliar sua relação com a gravidade clínica bem como frente à perspectiva de introdução de vacinas antidengue para identificar a imunidade protetora.

RESUMO

A dengue é uma doença endêmica em Goiás com atual circulação dos quatro sorotipos virais com aumento expressivo no número de casos, hospitalizações e óbitos pela doença de forma acentuada nos últimos cinco anos. Na presente tese o primeiro manuscrito analisou os dados da vigilância virológica dos DENV em Goiás no período de 1994-2013. Os testes de isolamento viral em cultura celular C6/36(*A.albopictus*) seguido de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais foram realizados no LACEN-GO. No período do estudo, os quatro sorotipos virais foram identificados no estado com introdução do DENV-1 em 1994, DENV-2(1998), DENV-3(2002) e DENV-4(2011). Do total de 21.684 testes de isolamento viral 4.839(22,3%) foram positivos. DENV-1 foi isolado em 3.023(62,5%), DENV-3 em 1.051(21,7%), DENV-4 em 413(8,5%) e DENV-2 em 352(7,3%) amostras. A predominância dos sorotipos virais alternou ao longo do período com DENV-1 dominante entre os anos de 1994-2002 e 2009-2011, DENV-3 entre 2003-2008 e DENV-4 em 2013. O DENV-2 nunca foi predominante entre os sorotipos isolados no LACEN-GO. A série histórica da vigilância virológica da dengue em Goiás mostrou a introdução e a sequência temporal da circulação dos DENV no estado. Este estudo contribui para a caracterização do cenário epidemiológico da dengue em Goiás com possíveis implicações nas ações de vigilância epidemiológica da doença na região.

O segundo manuscrito avaliou a presença de anticorpos neutralizantes (AcN) antidengue sorotipo específico em pacientes de uma coorte clínica de dengue estabelecida durante a epidemia de 2012-2013, em Goiânia-GO. Entre os 452 participantes da coorte, analisamos amostras pareadas de 60 pacientes classificados como dengue grave (n=40) ou dengue (n=20). Os critérios de elegibilidade foram a confirmação da infecção por IgM, NS1Ag e/ou RT-PCR; IgG positivo em pelo menos uma das amostras. Resposta monotípica ou multítípica foram definidas por PRNT₅₀≥1/20 para apenas um sorotipo viral ou ≥1/20 para dois ou mais sorotipos virais simultaneamente. O sorotipo viral infectante foi definido por um aumento ≥4 vezes no título dos AcN em amostras pareadas. No total 73,3% dos pacientes apresentaram AcN contra DENV-4, 68,3% contra DENV-1, 68,3% contra DENV-2 ou 61,6% contra DENV-3. A idade dos pacientes variou de 3 a 81 anos. Independente da faixa etária 85% dos pacientes apresentaram resposta multítípica enquanto

15% tiveram resposta monotípica. Pacientes infectados por DENV-4 apresentaram a maior diferença de títulos de AcN em comparação com outros sorotipos virais indicando predominância de soroconversão para o sorotipo 4. Não houve correlação entre preexistência de AcN com a gravidade da doença. A caracterização de resposta imune sorotipo específica é importante para estudar a relação de anticorpos neutralizantes preexistentes com a gravidade clínica da doença, bem como frente à perspectiva de introdução de vacinas antidengue para identificar a imunidade protetora.

Palavras-chave: Vírus dengue. Vigilância laboratorial. Anticorpos neutralizantes. Goiás. Brasil.

ABSTRACT (429 words)

Dengue is an endemic disease in Goias state with current circulation of the four serotypes. In the last five years has been occurred a significant increase in cases, hospitalizations and deaths caused by dengue in the region. In this thesis the first manuscript analyzed data from the virological surveillance of DENV in Goias during 1994-2013. Virus isolation in C6/36 (*A.albopictus*) cell culture followed by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies were performed in LACEN-GO. During the study period the four serotypes have been identified with introduction of DENV-1 in 1994, DENV-2(1998), DENV-3(2002) and DENV-4(2011). Among 21,684 virus isolation tests performed 4,839(22.3%) were positive. DENV-1 was isolated in 3,023(62.5%), DENV-3 in 1,051 (21.7%), DENV-4 in 413(8.5%) and DENV-2 in 352(7.3%) samples respectively. There were changes in the predominance of serotypes throughout the study period with dominance of DENV-1 between 1994-2002 and 2009-2011, DENV-3 in 2003-2008 and DENV-4 in 2013. The DENV-2 was never prevalent among serotypes isolated in LACEN-GO. The time series of the virological surveillance of dengue in Goias showed the introduction and the temporal sequence of circulation of DENV in the state. This study contributes to characterize the epidemiological scenario of dengue in Goias with possible implications for epidemiological surveillance of the disease in the region.

The second manuscript evaluated the presence of dengue serotype-specific neutralizing antibodies (NAb) in patients involved in a clinical dengue cohort established during epidemic of 2012-2013 in Goiania, state of Goias. Among 452 participants of the cohort we analyzed the paired samples from 60 patients classified as severe dengue (n=40) or dengue fever (n=20). The eligibility criteria were confirmation of the infection by IgM, NS1Ag and /or RT-PCR; IgG positive in at least one of the samples. Monotypic or multitypic response were defined: PRNT₅₀≥1/20 for only one serotype or ≥1/20 for two or more serotypes simultaneously. The infecting serotype was defined by ≥4 fold increase in the title of NAb in paired samples. Overall 73.3% of patients had NAb against DENV-4, 68.3% against DENV-1, 68.3% against DENV-2 or 61.6% against DENV-3. The patients' ages ranged from 3 to 81 years. Regardless of age group 85% of patients had multitypic response while 15% had monotypic response. Patients infected with DENV-4 showed the greatest difference in NAb titers in comparison to other serotypes indicating predominance

of seroconversion for serotype 4. There was no correlation among preexistent NAb and disease severity. The characterization of dengue serotype-specific immune response is important to study the relationship of preexistence of neutralizing antibodies with clinical outcomes of disease also facing the perspective of introducing of antidengue vaccines to identify protective immunity.

Keywords: dengue virus; neutralizing antibody; laboratory surveillance; Goias; Brazil.

INTRODUÇÃO

Dengue é uma doença febril aguda que apresenta um espectro clínico amplo o qual pode variar desde infecção assintomática à doença grave podendo evoluir para óbito (WHO, 2009a). Dentre as arboviroses que acometem os humanos, a dengue é considerada a de maior relevância para a saúde pública principalmente em países tropicais e subtropicais e representa um problema econômico mundial por afetar o sistema de saúde, o trabalho e o turismo com repercussões econômicas e sociais (SIMMONS, 2012; GUZMÁN; GARCÍA; KOURÍ, 2006). A doença é considerada endêmica em mais de 100 países situados nas áreas tropicais e subtropicais do globo. Em 2012 foi classificada como a arbovirose de maior capacidade de dispersão entre os continentes com potencial de promover epidemia mundial (WHO, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 50-100 milhões de pessoas se infectam por DENV anualmente, destes, 500 mil casos são considerados graves com mais de 22 mil óbitos os quais acometem principalmente crianças (WHO, 2013).

Os vírus dengue pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e possuem quatro sorotipos antigenicamente distintos descritos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (ICTV, 2014). As infecções por DENV são transmitidas pela picada do mosquito fêmea *Aedes spp.* infectado (GUBLER, 1988). O principal vetor responsável pela transmissão da dengue *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um vetor doméstico/urbano encontrado nas regiões tropicais e subtropicais do globo. A cada ano, novos países notificam a presença deste vetor, bem como de outras espécies a exemplo do *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Linnaeus, 1762) capaz de transmitir dengue em países com temperaturas mais baixas (ECDC, 2012).

O aumento da incidência da dengue assim como da atividade epidêmica destes vírus estão correlacionadas a um conjunto de fatores socioeconômicos e ambientais destacando-se a formação de grandes centros urbanos desorganizados, o manejo inadequado de água e esgoto em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, as mudanças climáticas, o alto e rápido deslocamento das pessoas em todo o mundo, bem como, programas não efetivos de controle do vetor (GUBLER, 1997a, 2002a; SIMMONS, 2012). Atualmente vacinas de dengue estão em desenvolvimento, entre elas, vacinas de vírus vivo atenuado, inativado,

quimérico, DNA e as vacinas de vetores virais, algumas das quais estão em fase de testes clínicos (WEBSTER; FARRAR & ROWLAND-JONES, 2009). Recentemente foram publicados os resultados de eficácia de ensaio clínico de fase três de uma vacina tetravalente testada em crianças na Ásia (CAPEDING, 2014) e na América Latina (VILLAR, 2014). Apesar do grande avanço na pesquisa de vacinas e na compreensão da imunopatogênese da dengue alcançado nos últimos anos, ainda não existem vacinas licenciadas sendo a prevenção ou redução da transmissão do DENV dependente do controle do mosquito vetor ou da interrupção do contato humano-vetor (WHO, 2009a).

Dengue no mundo

Os primeiros relatos da história de uma doença semelhante à dengue chamada de “veneno da água” associada a insetos voadores e água, foram descritos durante a dinastia de Chin entre 265 a 460 d.C. na China (GUBLER, 1998; BURKE; MONATH, 2002). Os registros das primeiras grandes epidemias de uma doença que se acredita ser dengue ocorreram na Ásia, África e América do Norte em 1779 e 1780 (GUBLER, 1997a, 1998). No início do século XX a dengue já era considerada um problema de saúde pública na maioria dos países tropicais (GUBLER, 2002a) e, as transformações ocorridas no mundo durante e após a segunda guerra mundial propiciaram um cenário ideal para a propagação de doenças veículas por vetores (GUBLER, 1998). Os primeiros vírus dengue (DENV-1 e DENV-2) foram isolados em amostras de pacientes provenientes da Índia, Nova Guiné e Hawaii por estudos conduzidos por Sabin e Schlesinger (1945) e Sabin (1952) (SABIN; SCHLESINGER, 1945; SABIN, 1952). Nesse cenário, foram descritas as primeiras epidemias de dengue hemorrágica em Manila (Filipinas) e em Bangkok (Tailândia). Na ocasião, outros dois sorotipos (DENV-3 e DENV-4) foram também isolados em amostras provenientes de pacientes da região (HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960; GUBLER, 1997a). No Sudeste Asiático, já na década de 70, a dengue era responsável por grande parte das hospitalizações e óbitos entre crianças (GUBLER, 1998).

A dengue é um problema de saúde pública mundial que, nos últimos 50 anos, vem progressivamente alcançando o status de pandemia (WHO, 2013). Ainda que não se tenha determinado a real carga da enfermidade na população, estudo recente descreveu um novo modelo matemático para calcular a distribuição global da doença e estimou que, no ano de 2010, ocorreram aproximadamente 390 milhões de infecções por DENV (BHATT, 2013).

A figura 1 apresentada por Simmons e colaboradores, demonstra uma expansão das áreas de risco de infecção por DENV no ano de 2012 (SIMMONS, 2012) e, atualmente, casos de dengue são notificados nos cinco continentes (ALVES, 2013; WHO, 2013). O verdadeiro impacto econômico causado por uma epidemia de dengue em uma região é difícil de ser mensurado. Estima-se que o custo gasto com cada caso de dengue para pacientes ambulatoriais e hospitalizados variam em torno de U\$514,00 a 1.394,00 respectivamente (SUAYA,2009).

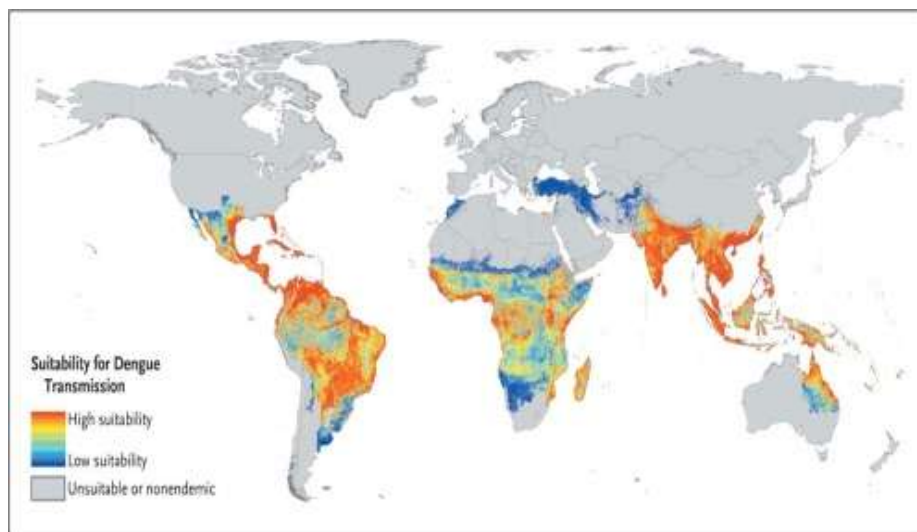


Figura 1: Risco global de infecções por dengue, 2012. **Fonte:** adaptado de Simmons, 2012.

Com exceção do Sudeste Asiático, epidemias de dengue foram efetivamente controladas na maioria dos países tropicais, entre as décadas de 50 e 60 como benefício dos programas de controle de vetores contra a malária e febre amarela, desenvolvidos pela Organização Pan-americana de Saúde (BRAGA; VALLE, 2007). Com o enfraquecimento do programa de controle intensivo ao vetor, houve um processo de reinfestação contínua do *Ae. aegypti* nos países situados nas Américas Central e Sul com consequente re-emergência de epidemias de dengue na região (GUBLER, 2002a).

Epidemias de dengue foram novamente registradas na América Central no início da década de 60, na Jamaica e em Porto Rico, por DENV-3. Em seis meses, este sorotipo se espalhou pelas ilhas do Caribe e para a Venezuela. Na década de 70, com a co-circulação de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, várias epidemias foram registradas em toda a América Central e norte da América do Sul (Colômbia, Venezuela) (HALSTEAD, 2006). No início da década de 80 o DENV-4 se espalhou por toda a Bacia do Caribe e no extremo norte do Brasil

quando os primeiros casos de dengue foram laboratorialmente registrados no país (OSANAI, 1983; PINHEIRO & CORBER, 1997). Em contraste ao Sudeste Asiático onde a dengue se configura como uma das principais causas de hospitalização e morte de crianças (WATANAVEERADEJ, 2003; HALSTEAD, 2006), no continente Americano, a doença acomete predominantemente adultos em sua forma clássica (TEIXEIRA, 2009). Com exceção do Chile e Uruguai, a dengue é endêmica em toda a América Latina e atualmente mais de 40 países notificam a doença nesta região com tendência ascendente da incidência do número de casos assim como de suas formas graves. Em 2013, mais de 2,2 milhões de casos de dengue foram registrados na região das Américas e, destes, o Brasil é responsável pela notificação de mais de 70% dos casos (PAHO, 2013).

Dengue no Brasil

Os primeiros casos de dengue confirmados laboratorialmente no Brasil ocorreram em 1981-1982 em Boa Vista, Roraima, numa epidemia restrita à região com o isolamento dos vírus DENV-1 e DENV-4 (OSANAI, 1983). Entretanto, registros datados do fim do século XIX evidenciam epidemias de dengue no país. Em, 1923, as observações clínicas do Dr. Antônio Pedro descreveram casos de dengue ocorridos em Niterói, Rio de Janeiro (BRASIL, 1996; PEDRO, 1923 apud FIGUEIREDO, 2000).

O sucesso das campanhas de controle da febre amarela urbana liderada por Oswaldo Cruz no início do século XX com posterior apoio da Fundação Rockefeller, resultaram, como consequência, no controle da dengue nos centros urbanos do Brasil até meados da década de 70. O crescimento desorganizado das cidades e enfraquecimento dos programas de controles de vetores culminou na reinfestação e reestabelecimento do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) por todo o país (FIGUEIREDO, 2000). Neste cenário, em 1986 houve a introdução do DENV-1 no Rio de Janeiro (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; ROSA, 1986) com rápida dispersão, o que resultou em epidemias de dengue em vários estados brasileiros (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; NOGUEIRA, 1999b; SCHATZMAYR, 2001). Em 1990, com a introdução do DENV-2, também detectada no Rio de Janeiro (NOGUEIRA; MIAGOSTOVICH; SCHATZMAYR, 1990; NOGUEIRA, 1999a), houve incremento expressivo do número de casos de dengue no país assim como o registro dos primeiros casos graves da doença (NOGUEIRA, 1999a, 1991). Em 1998 mais

de 700 mil casos foram notificados caracterizando-a como a maior epidemia da década de 90 no país.

Um caso importado isolado de DENV-3 foi detectado em Limeira-SP em 1998 (ROCCO, 2001), mas, no ano 2000, a introdução deste sorotipo foi confirmada em pacientes com dengue no Rio de Janeiro (NOGUEIRA, 2001, 1991) e epidemias de grande magnitude ocorreram em vários estados da federação. Em 2002, 794 mil casos de dengue foram notificados no país (BRASIL, 2003) e em menos de três anos após sua introdução, o DENV-3 já era detectado em 25 dentre os 26 estados da federação (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Barreto e Teixeira descreveram um importante incremento no número de casos de FHD no país após a introdução do DENV-3. Aproximadamente 10% dos casos de FHD registrados no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), ocorreram entre 1990 e 2001 e o restante, mais de sete mil casos, ocorreram entre 2001 a junho de 2008 com uma taxa de letalidade média de 7,4% (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). De 2000 a 2009 ocorreram aproximadamente 3,5 milhões de casos de dengue no Brasil, destes, 12.625 classificados como FHD com 845 óbitos (BARRETO, 2011).

Na segunda metade de 2009, o DENV-1 ressurgiu como sorotipo circulante predominante no país e, após uma década de baixa circulação deste sorotipo com consequente aumento da susceptibilidade da população à infecção por DENV-1, em 2010, observou-se um cenário de alta transmissão da doença no país com ~ 1,5 milhão de casos notificados e mais de 100 mil internações dando início a um novo ciclo da doença no Brasil (BRASIL, 2010a, 2010b).

Em 2008, quase 30 anos após o primeiro registro laboratorial da circulação autóctone do DENV-4 no Brasil, este sorotipo foi identificado em três amostras de pacientes no estado do Amazonas (FIGUEIREDO, 2008). Oficialmente, a re-introdução do DENV-4 no país foi confirmada pelo Ministério da Saúde no segundo semestre de 2010 no estado de Roraima e em Manaus (BRASIL, 2011a). Este sorotipo tem se dispersado para todas as regiões do país. Entretanto, nos dois anos seguintes 2011 e 2012, o DENV-1 continuou como sorotipo predominante dentre os isolados e uma redução importante do número de casos foi observada em relação à epidemia de 2010. Até o momento, o maior surto de dengue já registrado no Brasil ocorreu no ano de 2013, com ~1,5 milhões de casos notificados e mais de 500 óbitos (PAHO, 2013).

As mudanças na epidemiologia da dengue, descritas em vários estudos desenvolvidos no país, tem imposto novos desafios ao Sistema Único de Saúde e o maior deles, é reduzir o número de óbitos por dengue (BRASIL, 2010b). Estudo recentemente publicado, discorre sobre a tendência da epidemiologia da dengue no Brasil durante 2000-2010. Este estudo descreve o aumento do número de casos da dengue no país, da incidência de casos graves, das taxas de hospitalização assim como o aumento significativo do número de óbitos no período analisado (TEIXEIRA, 2013). Outro aspecto importante observado foi o aumento significativo de casos graves e óbitos em crianças marcadamente descritos no período de 2007-2008 (TEIXEIRA, 2013).

Em um país continental como o Brasil, a compreensão da epidemiologia da dengue é complexa, relacionada não só às características dinâmicas da própria doença, dos vírus, hospedeiro e vetor, mas também aos diferentes cenários epidemiológicos regionais e suas características próprias.

A história da dengue em Goiás foi laboratorialmente registrada em 1994 a partir da introdução do DENV-1 quando ocorreu a primeira epidemia de dengue na região com mais de 3500 casos notificados (MACIEL; SIQUEIRA-JÚNIOR; MARTELLI, 2008). Casos de FHD foram registrados a partir da introdução do DENV-2 em 1998 configurando situação de endemia em Goiás (SIQUEIRA, 2004). Um inquérito soropidemiológico de base populacional realizado em Goiânia no ano de 2001 detectou uma soroprevalência de ~40% (SIQUEIRA-JUNIOR, 2008). Em janeiro de 2002, houve a introdução do DENV-3, genótipo III, que se dispersou rapidamente, sendo detectado simultaneamente em outros municípios do estado, tornando-se predominante dentre os isolados no ano de 2003 (FÉRES, 2004; FÉRES, 2006). No período de 2003 a 2007 observou-se a intensificação da interiorização da dengue no Estado de Goiás que foi acompanhado pelo aumento do número de casos notificados, de casos graves e óbitos no estado (BRASIL, 2008; MACIEL; SIQUEIRA-JÚNIOR; MARTELLI, 2008).

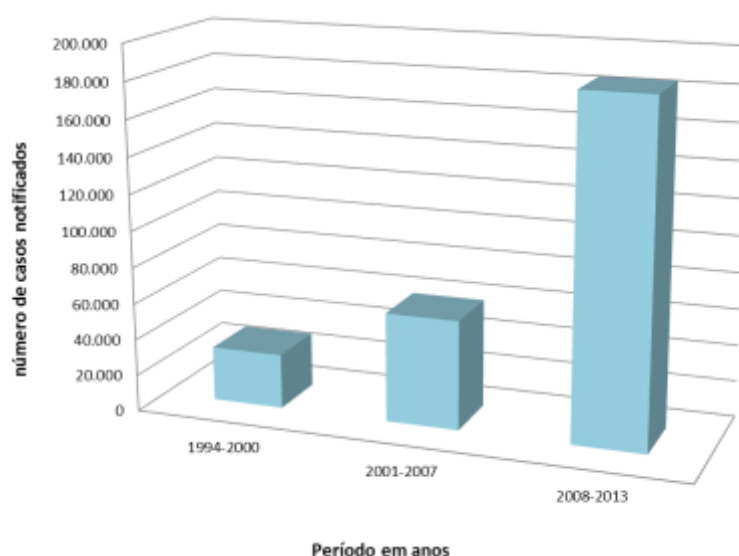
Ao longo de 2009, seguindo a tendência do país, o monitoramento da circulação de sorotipos virais apontou para uma nova mudança no sorotipo predominante no estado devido à recirculação importante do DENV-1. Segundo o Ministério da Saúde essa

recirculação do DENV-1 levou a um cenário de alta transmissão da doença ao longo de 2010 (BRASIL, 2010b).

O sorotipo 4 foi detectado em Goiás no final de 2011 e, após sua introdução observou-se uma importante redução no número de casos de dengue nos anos de 2011 e 2012 assim como do número de casos graves e óbitos (GOIÁS, 2013). Em 2013, Goiás notificou mais de 160.000 casos da doença excedendo o número de casos notificados em 2010 (considerada até então a epidemia com maior número de casos de dengue no país e na região) (GOIÁS, 2013) e, pela primeira vez, o DENV-4 assumiu a predominância dentre os isolados conforme indicado pelo sistema de vigilância laboratorial caracterizando uma nova mudança no perfil epidemiológico da circulação dos vírus dengue na região.

Em Goiânia, capital do estado de Goiás, mais de 250.000 casos de dengue foram notificados nos últimos 20 anos de epidemias sucessivas (~40% do total de casos registrados no estado). Uma intensificação do número de casos pode ser caracterizada em três períodos distintos: a) 1994 a 2000: ~ 30.000 casos; b) 2001 a 2007: ~60.000 casos c) 2008 a 2013: mais de 185.000 casos notificados incluindo os três maiores picos epidêmicos de dengue ocorridos na região (2008/2010/2013) em consonância com os dados registrados no país (GOIÂNIA, 2013) (**Gráfico 1**).

Gráfico 1: Série histórica de casos notificados de dengue em Goiânia-GO, 1994-2013.



Fonte: GOIÂNIA, 2013.

Vírus dengue

Os vírus dengue são membros da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* (ICTV, 2014). O nome da família assim como do gênero originam-se do vírus da febre amarela, considerado o protótipo dessa família (do latim “*flavus*”, amarelo) (LINDENBACH; RICE, 2007). Dentre os arbovírus, os DENV são os únicos que evoluíram de forma a se adaptar completamente ao hospedeiro humano e seu ambiente, essencialmente eliminando a necessidade de manter um ciclo enzoótico silvestre (GUBLER, 2002b).

Existem quatro sorotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) antigenicamente relacionados com variações genotípicas em cada sorotipo. No entanto, infecção causada por um dos sorotipos virais não induz imunidade efetiva contra outro sorotipo (ROEHRIG, 2003; WAHALA, 2011). Novo sorotipo viral (DENV-5) foi descrito em 2013 na Malásia. Trata-se de um vírus silvestre mais relacionado ao DENV-4. Até o momento as implicações em saúde pública deste novo sorotipo viral não estão esclarecidas (GUBLER, 2014).

Os *Flavivirus* possuem vírions pequenos (40-60nm de diâmetro) com um nucleocapsídeo icosaédrico (30nm) que consiste numa fita simples de RNA (*ssRNA*) de polaridade positiva armazenada como genoma. O nucleocapsídeo é complexado e revestido por um envelope composto de uma bicamada lipídica formada por glicoproteína derivada de membrana da célula hospedeira (CHAMBERS, 1990; ICTV, 2014).

O genoma dos flavivírus, com tamanho aproximado de 11kb, possui apenas uma fase aberta de leitura denominada *open reading frame (ORF)*, que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos. Esta longa poliproteína é clivada em proteínas individuais à medida que é produzida e originam três proteínas estruturais (envelope (E), capsídeo (C) e membrana (M)) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Nas extremidades da poliproteína existem duas regiões não codificantes denominadas: 5' e 3' com 96 e 454 aminoácidos respectivamente (LINDENBACH; RICE, 2007). As proteínas estruturais formam a partícula viral icosaédrica e as proteínas não estruturais participam da replicação do RNA genômico, da montagem do vírion e da evasão da resposta imune inata do hospedeiro (NOBLE, 2010; LINDENBACH; RICE, 2007).

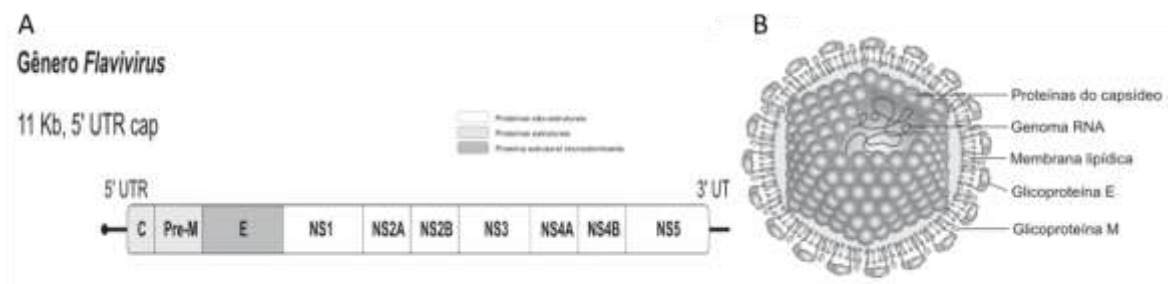


Figura 2. Estrutura da partícula viral da família *Flaviviridae*. A) Organização genômica. B) Representação esquemática de uma partícula viral e seus componentes. **Fonte:** adaptado de FLORES, 2007.

O processo de infecção das células pelos flavivírus ocorre por meio da interação entre o envelope viral e os receptores presentes na superfície de células permissivas. Há consenso de que as células da linhagem fagocítica mononuclear como monócitos, macrófagos e células dendríticas são alvos primários *in vivo* (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Após endocitose do vírus, o pH ácido da vesícula lisossomal propicia a fusão das membranas viral e vesicular expondo o nucleocapsídeo no citoplasma culminando no desempacotamento do genoma. Em seguida, dá-se início à replicação do genoma, tradução para formação de proteínas estruturais e não estruturais e montagem de novas partículas virais aptas a infectar outras células do hospedeiro (LINDENBACH; RICE, 2007; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; RIDPATH; FLORES, 2007).

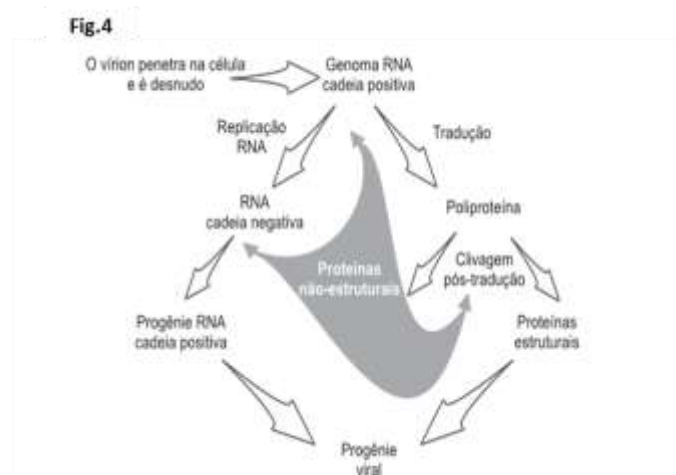
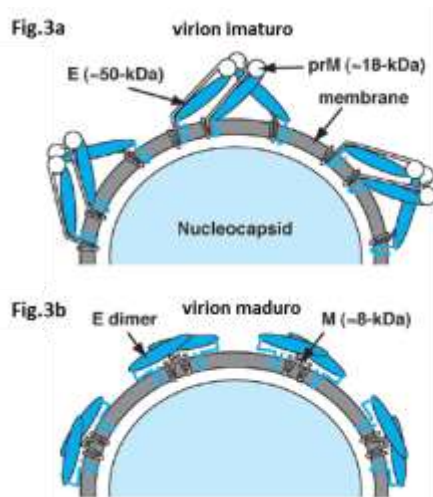


Figura 3. Estrutura das partículas dos flavivírus. A) vírion imaturo; b) vírion maduro. **Fonte:** adaptado de LINDENBACH; RICE, 2007. **Figura 4.** Representação esquemática do ciclo replicativo dos vírus da família *Flaviviridae*. **Fonte:** adaptado de RIDPATH; FLORES, 2007.

Dentre as proteínas estruturais, a proteína E (55 a 60kDa) é responsável pela ligação dos vírus ao receptor na célula do hospedeiro, adesão e fusão de membrana, penetração e montagem viral (CHAMBERS, 1990; HEINZ; ALLISON, 2001) além de várias outras atividades biológicas relacionadas à resposta imunológica do hospedeiro como indução de anticorpos neutralizantes e proliferação de monócitos (CHANG, 1997; HENCHAL; PUTNAK, 1990).

A proteína M (8kDa) encontra-se presente na superfície do vírion maduro e provém da clivagem específica de uma proteína que a precede chamada de prM (22kDa) contida em vírions intracelulares imaturos (**Figura 3**). Esta clivagem ocorre na fase terminal da morfogênese do vírion e admite-se que a sua formação seja necessária para a geração da atividade de fusão do envelope viral (HENCHAL; PUTNAK, 1990; LINDENBACH; RICE, 2007).

As proteínas não estruturais NS1, NS3 e NS5 são as mais conservadas entre os flavivírus (LINDENBACH; RICE, 2007). Por sua vez, as proteínas NS2a, NS2b, NS4a e NS4b são pouco conservadas e podem formar os componentes de membrana de complexos de replicação viral (CHANG, 1997; HENCHAL; PUTNAK, 1990).

A NS1 é uma glicoproteína imunogênica (48kDa) que atua na fase precoce da infecção viral (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008). Em sua forma solúvel é capaz de induzir resposta imune humoral e pode ter um papel significativo na patogênese da doença (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A maior parte das clivagens proteolíticas na longa poliproteína precursora na região das proteínas não estruturais é efetuada por uma protease composta de duas proteínas virais, a NS2b e NS3 (FALGOUT; MILLER; LAI, 1993). Ainda, NS2a (18 a 22kDa) está implicada no processamento da NS1 (LINDENBACH; RICE, 2007).

A NS3 (68 a 70 kDa) é a segunda maior proteína viral. Postula-se que tenha atividades enzimáticas multifuncionais, exercendo atividade de protease, NTPase e RNA helicase (CHAMBERS, 1990; ROEHIG, 1997). A NS5 é a maior proteína não estrutural e a mais conservada (103-104 kDa) dentre os flavivírus. Possui função de RNA polimerase (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Além dos quatro sorotipos de DENV descritos, a evolução de técnicas laboratoriais, a exemplo da técnica de sequenciamento, possibilitou o aprimoramento dos estudos moleculares e a caracterização da variabilidade genética dentre os DENV. Entretanto, atualmente, não existe uniformidade na classificação dos vírus dengue em grupos genótipos. A tabela um mostra os genótipos caracterizados segundo gene da junção E/NS1 e envelope (**Tabela 1**). Embora uma correlação direta entre o sorotipo/genótipo viral e a gravidade da doença não possa ainda ser estabelecida, aparentemente, os genótipos asiáticos parecem estar mais relacionados às formas graves da doença comparados aos genótipos encontrados inicialmente nas Américas e no Pacífico Sul (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Os estudos moleculares dos DENV possuem grande importância epidemiológica para compreensão da distribuição e circulação destes vírus, determinação de sua origem e dispersão no globo (LEITMEYER, 1999; RICO-HESSE 1997). Ainda, contribuem para o entendimento da patogênese de formas graves da dengue a evolução de cepas mais virulentas e a sequência de infecção sorotipo específica (ROSEN, 1977; RICO-HESSE, 2003; WEAVER & VASILAKIS, 2009, NOGUEIRA, 2010, ARAÚJO, 2012).

Tabela 1: Classificação dos genótipos dos vírus dengue

<i>Sorotipo</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Distribuição Geográfica</i>	<i>Referências</i>
DENV-1	I, II,III,IV, V	Tailândia; Ásia; Pacífico Sul; Américas/África; Malásia(silvestre)	Rico-Hesse, 1990 Gonçalves, 2002
DENV-2	I, II,III,IV, V, VI	Malásia/Índia Subcontinental; Sudeste da Ásia; Américas; Oeste da África	Rico-Hesse, 1990 Rico-Hesse, 1997 Anez, 2011
DENV-3	I, II,III,IV, V	Sudeste da Ásia / Pacífico Sul; Tailândia; Índia Subcontinental; Américas	Lanciotti, 1994 Wittke, 2002
DENV-4	I, II,III,IV, V	Indonésia; Sudeste da Ásia; Malásia	Lanciotti, 1997 Abubakar,2002

Fisiopatologia e Manifestações Clínicas da dengue

A dengue é uma doença sistêmica e dinâmica que, em sua forma branda é uma enfermidade febril, autolimitada com duração de cinco a sete dias. Entretanto, seu espectro clínico pode ser variado apresentando desde formas oligosintomáticas a formas graves da doença podendo evoluir ao óbito (SHEPARD, 2004; SIMMONS, 2012). Após o período de incubação viral que pode variar de 3 a 15 dias (usualmente de 5-7 dias) a doença tem início abrupto e segue seu curso que pode ser caracterizado em três fases: febril, crítica e convalescência (WHO, 2009a).

Na fase febril, o paciente frequentemente apresenta sinais e sintomas como rubor facial, exantema, dor generalizada, mialgia, artralgia, dor retro orbital e cefaleia. Anorexia, náuseas e vômitos também são comuns. A prova do laço positiva nesta fase aumenta a probabilidade de ser dengue (positiva em 50% dos casos) (BRITO, 2004; GREGORY, 2010). Esse quadro sindrômico inespecífico dificulta o diagnóstico clínico da dengue tornando-se importante confirmação da etiologia da doença por testes laboratoriais específicos. Dessa forma pode-se destacar o diagnóstico diferencial em síndromes clínicas como: síndrome febril, exantemática febril, hemorrágica febril, dolorosa abdominal, síndrome do choque e síndrome meníngea (BRASIL, 2011b; BUSTOS, 1990). Adicionalmente, os sinais e sintomas iniciais da infecção por DENV não permitem a distinção clínica entre casos de dengue graves e não graves. Dessa maneira, o monitoramento dos sinais de alarme assim como, de outros parâmetros clínicos e laboratoriais, é crucial para o reconhecimento da progressão da doença para uma fase crítica (GUZMAN, 2014).

As complicações da dengue surgem geralmente, no período da defervescência, com a ocorrência de sinais de alarme como dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, acumulação de líquidos cavitários, sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, lipotímia, aumento progressivo do hematócrito entre outros. Em geral estes sinais de alarme anunciam a perda plasmática e a iminência de choque (NAVARRETE-ESPINOSA, 2005; BRITO, 2007). Na sua forma grave, a dengue caracteriza-se por uma síndrome de permeabilidade vascular aguda acompanhada por anormalidades na hemostasia (LEI, 2001). A dengue grave é caracterizada pelo extravasamento plasmático que pode levar ao choque; acumulação de líquidos cavitários; insuficiência respiratória;

sangramento importante e/ou grave disfunção de órgãos (SRIKIATKHACHORN, 2007; WHO, 2009a, 2012). Cerca de 10% dos pacientes sintomáticos evoluem para formas graves da doença (WHO, 2009a) e passam a apresentar sinais de alarme da dengue em função do aumento da permeabilidade vascular com ou sem manifestações hemorrágicas (BRASIL, 2011b). Os aspectos envolvidos na imunopatogênese das formas graves da dengue são complexos e seus mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos (ROTHMAN & ENNIS, 1999; LEI, 2001, NOISAKRAN & PERNG, 2008, COFFEY, 2009). Estes mecanismos serão discutidos em seção específica.

Atualmente, não há tratamento específico para a dengue, mas apesar de ser uma doença com manifestações complexas, o manejo clínico da doença é relativamente simples, barato e muito eficiente para salvar vidas desde que as medidas corretas de suporte e tratamento sejam iniciadas em tempo hábil e oportuno (MALAVIGE, 2004; WHO, 2009a). A identificação precoce dos casos de dengue, manejo e monitoramento clínico adequado dos pacientes nas diferentes fases da doença são fundamentais para se alcançar um bom desfecho clínico e principalmente evitar a ocorrência de óbitos (GUZMAN, 2014; WHO, 2009a). Neste ensejo, um dos pontos críticos é a condução do atendimento ao enfermo nas unidades de atenção à saúde (BRASIL, 2011b).

As diferenças fisiológicas naturais que ocorrem no organismo humano durante as variadas fases da vida, principalmente durante os extremos das faixas etárias (crianças e idosos) e em situações específicas de comorbidades (diabetes, hipertensão arterial) ou gestação, também são fatores que influenciam nas manifestações clínicas da dengue (BRASIL, 2011b; WHO, 2012). Estas situações específicas favorecem o desenvolvimento de formas graves da doença. Neste ensejo, o manejo clínico destes pacientes infectados por DENV, também são diferenciados e requer atenção especial durante a evolução dos sintomas e sinais de alarme objetivando um melhor desfecho clínico destes pacientes (WHO, 2009a, 2012).

Em janeiro de 2014, o Brasil passou a adotar a classificação da dengue definida pela Organização Mundial de Saúde em 2009, que define os casos de dengue em: Dengue, Dengue com Sinais de Alarme e Dengue Grave (WHO, 2009a). Essa ferramenta permite uma comparação da situação epidemiológica de dengue entre os países. Entretanto, a classificação epidemiológica dos casos de dengue é habitualmente realizada após desfecho

clínico quando informações clínico-laboratoriais estão disponíveis e permitem ao clínico avaliar todos os parâmetros necessários para classificar os casos. Dessa maneira, há uma discussão importante a respeito da classificação dos casos e, apesar de ser uma ferramenta indubitavelmente importante, esta nem sempre é útil no manejo clínico do paciente durante o curso da doença (BRASIL, 2011b). Entre 2002 e 2013, o Brasil adotou um protocolo de conduta baseado na valorização da abordagem clínico-evolutiva, no reconhecimento de elementos clínico-laboratoriais e de condições associadas, que podem ser indicativos de gravidade, com sistematização da assistência, que independe da discussão de classificação final de caso, com o objetivo de orientar a conduta terapêutica adequada a cada situação e evitar o óbito. Entretanto, mesmo com uma ferramenta validada, o número de óbitos continuou superior do índice de letalidade preconizado pela OMS de 1% (BRASIL, 2011b).

Imunopatogênese da dengue

Há mais de 60 anos vários estudos vêm se desenvolvendo no intuito de melhor compreender os mecanismos da imunopatogênese da dengue principalmente de suas formas graves. Apesar destes mecanismos ainda não estarem completamente esclarecidos, como na maioria dos processos biológicos multifatoriais, os desfechos da infecção por DENV resultam de uma interação entre diversos fatores associados aos aspectos virais, imunológicos e outros também relacionados ao hospedeiro humano (ROTHMAN & ENNIS, 1999; LEI, 2001, NOISAKRAN & PERNG, 2008, COFFEY, 2009).

Segundo Rosen (1977) o desenvolvimento de formas graves da doença está relacionado à virulência do genótipo dos diferentes sorotipos dos DENV envolvidos na infecção viral (ROSEN, 1977). Estudos de biologia molecular descrevem a evolução molecular dos DENV, sua origem e reemergência em diferentes regiões geográficas, além de inferir sobre a relação entre virulência e diferentes formas de expressão clínica da doença (RICO-HESSE, 2007). Outras hipóteses correlacionam uma interação da infecção viral à resposta imunológica do hospedeiro. Esta correlação sugere o envolvimento do sistema imune no aumento da gravidade da doença e patogenia das formas graves da dengue.

A resposta imune inata é a primeira a ser ativada na interação do patógeno com o hospedeiro humano (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Na fase inicial da infecção por DENV, a intensidade da replicação viral, estimula o sistema imune inato a produzir

uma resposta por meio de mecanismos antivirais mediados por IFN-I (α e β) assim como por células NK (*natural killer*). Estes mecanismos são inicialmente os mais importantes nas vias de defesa antivirais do hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2012; HALLER; KOCHS & WEBER, 2006; MAZZON, 2009) e podem direcionar o desfecho clínico da doença, principalmente durante a infecção primária por DENV (CLYDE; KYLE & HARRIS, 2006). No transcorrer da infecção uma resposta imunológica do tipo adaptativa, com produção de anticorpos sorotipos específicos, é desenvolvida conferindo ao indivíduo proteção duradoura específica e uma proteção heteróloga, contra outros sorotipos, limitada por um curto período de tempo (RUSSELL; UDOMSAKDI; HALSTEAD, 1967; ROTHMAN, 2004). Na oportunidade de uma infecção secundária por DENV, ou seja, uma nova infecção por outro sorotipo viral, uma resposta anormal e deletéria parece estar envolvida no processo da imunopatogênese de formas graves da dengue (**Figura 5**) (CEDILLO-BARRON, L., 2014; WHO, 2006).

Neste contexto, a teoria da imunoamplificação da infecção mediada por anticorpos denominada ADE (*antibody dependent enhancement*) postula que em infecções secundárias heterotípicas, os anticorpos produzidos durante primo-infecção ligam-se aos vírus de forma ineficiente ocasionando falha na atividade funcional de neutralização o que facilita o processo de infecção das células do sistema fagocitário (alvos primários de infecção dos DENV). Este processo de infecção celular é mediado pela ligação da porção Fc dos anticorpos aos receptores Fc γ (Fc γ R) presentes na membrana celular, facilitando e potencializando a infecção viral (ADE) (HALSTEAD, 1988, FLIPSE, J., WILSCHUT, J., SMIT, J.M., 2013). Além de facilitar a infecção das células com receptores Fc γ , os complexos imunes (vírus-anticorpos) podem mediar uma evasão aos mecanismos protetores, suprimindo funções relacionadas com a imunidade inata e a adaptativa. Uma das maneiras de evasão é indução da produção de IL10 com amplificação da resposta Th2 e também inibindo a produção do IFN tipo I pela regulação da ativação dos receptores MDA-5 e RIG-I dispersos no citoplasma celular (CEDILLO-BARRON, 2014; UBOL, 2010).

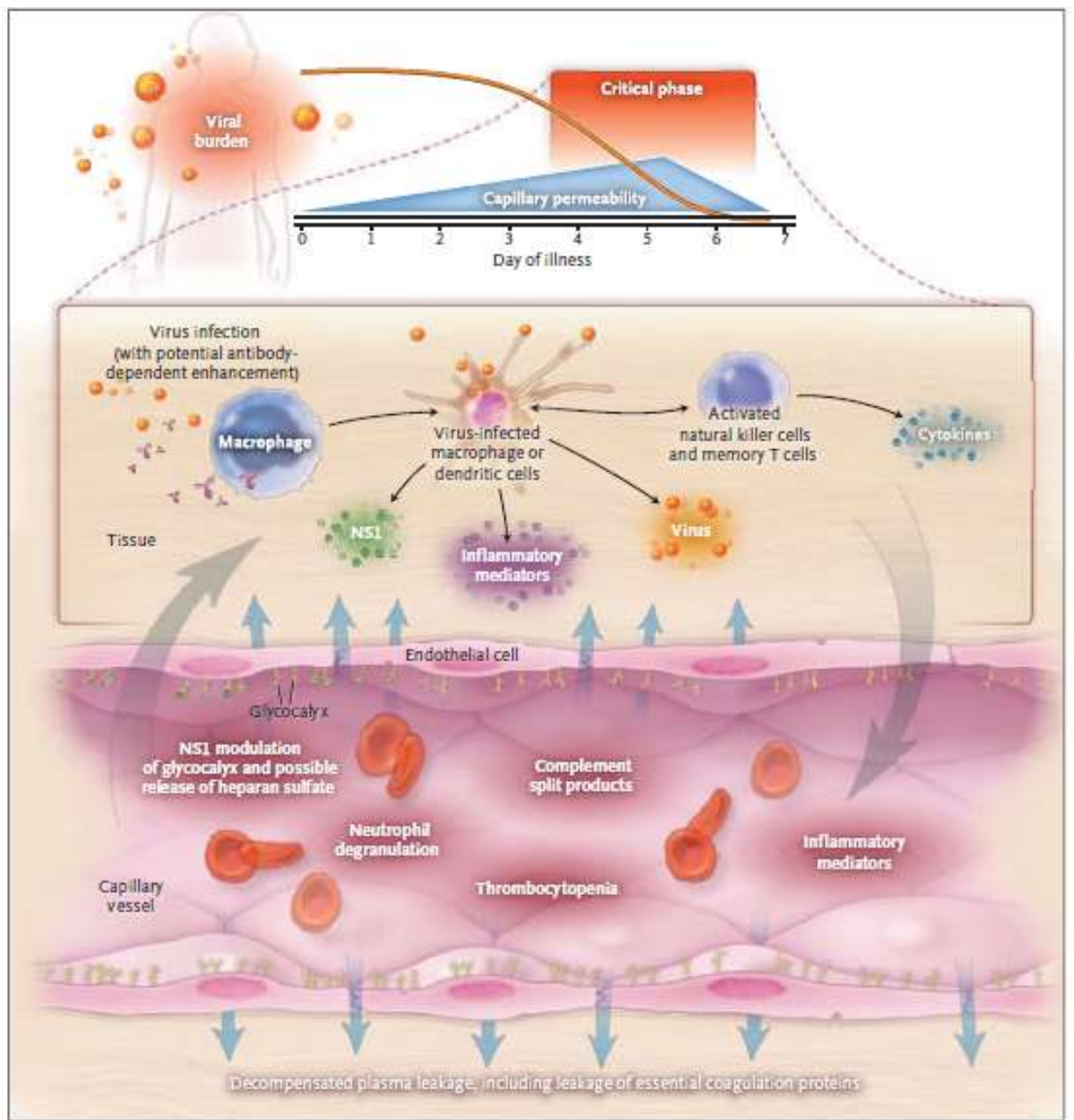


Figura 5. Imunopatogênese da dengue grave na infecção secundária. A cinética da viremia em um paciente com dengue secundário, o momento de complicações comuns e possíveis causas mecânicas são mostrados. Ainda, segundo a teoria da amplificação da infecção dependente de anticorpos, no início de infecção secundária (ou infecção primária de crianças), ocorre o aumento da concentração dos vírus dengue durante o processo infeccioso. **Fonte:** adaptado de SIMMONS, 2012.

A teoria ADE é ainda aplicada no contexto de infecções primárias. Este fenômeno tem sido bem caracterizado por vários estudos que demonstram o desenvolvimento de FHD em crianças menores de um ano de idade durante primo-infecção. Em geral, anticorpos maternos transferidos durante a gestação desempenham um papel duplo frente às infecções por DENV. Nos primeiros meses de vida da criança, quando os níveis de anticorpos são elevados, estes desempenham papel de proteção. Entretanto quando atingem níveis

subneutralizantes, geralmente a partir do 6º mês de idade, estes anticorpos podem favorecer o desenvolvimento de formas graves da dengue durante primo-infecção (GUZMAN, 2013; JAIN; CHATURVEDI, 2010; KURANE, 1997).

Aspectos da imunidade celular também são reportados como envolvidos na imunopatogênese da dengue. Frente a uma infecção secundária heterotípica, células T CD4+ pré-existentes com baixa afinidade pelos epítomos da infecção corrente, promovem uma resposta imunológica inapropriada ocasionando aumento do estímulo de secreção de citocinas pró-inflamatórias, deficiência na eliminação de corpos apoptóticos e atraso na remoção de imunocomplexos (MANGADA; ROTHMAN, 2005; MONGKOLSAPAYA, 2003). A permanência destes imunocomplexos na corrente sanguínea pode favorecer a formação de uma vasculite sistêmica (ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2012) com alta ativação do sistema complemento amplificando a produção de citocinas pró-inflamatórias (KURANE, 1994; LIBRATY, 2002), dentre outros fatores que resultam em viremia aumentada e possível aumento da gravidade da doença (COFFEY, 2009; KURANE, 2007).

Independente do tipo de infecção (primária ou secundária) há consenso sobre o importante envolvimento das citocinas na imunopatogênese da dengue especialmente relacionada aos seus efeitos pró-inflamatórios nas células do endotélio vascular (CEDILLO-BARRON, 2014; CLYDE; KYLE & HARRIS, 2006). Várias células são capazes de produzir citocinas durante um processo infeccioso e suas ações estão geralmente limitadas ao sítio de produção. Outra função importante das citocinas é a sua capacidade de estimular a síntese e ação de outras citocinas com propriedades pleiotrópicas e redundantes (ABBAS & LICHTMAN, 2012) (**Figura 6**).

Monócitos infectados assim como linfócitos T específicos ativados parecem estar relacionados ao aumento da produção de citocinas durante o processo de infecção por DENV especialmente na FHD (KURANE, 2007). Muitos estudos descrevem níveis plasmáticos de citocinas significativamente maiores em pacientes com FHD comparados àqueles com dengue dentre elas: TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IFN- γ (AVIRUTNAN, 1998; KURANE, 2007; MANGADA & ROTHMAN, 2005). Estudos tem se desenvolvido no intuito de melhor compreender a associação entre as diferentes formas clínicas da doença e as citocinas relacionadas ao aumento da gravidade ou à proteção. Essas informações seriam de grande utilidade durante o manejo clínico do paciente

utilizando a dosagem destas citocinas como marcadores preditivos do desfecho da infecção. Entretanto vários fatores limitam essa compreensão dentre eles: a) a ação pleiotrópica e redundante (ABBAS & LICHTMAN, 2012) que promovem maior complexidade de ação durante o processo infeccioso; b) diferenças no *timing* da coleta de amostras para dosagem das citocinas em estudos de coorte podem confundir a compreensão das atividades das citocinas no desfecho da infecção; c) estudos de citocinas *post mortem* podem refletir a consequência do processo de morte e não estar associada ao processo de patogênese; d) em estudos *in vitro*, as células são tratadas e analisadas fora do seu “ambiente normal” e fora da complexa interação às outras células e tecidos do organismo (PÉREZ, 2004; SIERRA, 2010).

Estes e outros fatores limitam a compreensão da real magnitude da atividade destas substâncias no contexto da imunopatogênese da dengue. Entretanto, sua ação no endotélio vascular é comprovadamente um fator importante no processo de extravasamento plasmático com consequente agravamento do quadro clínico do paciente.

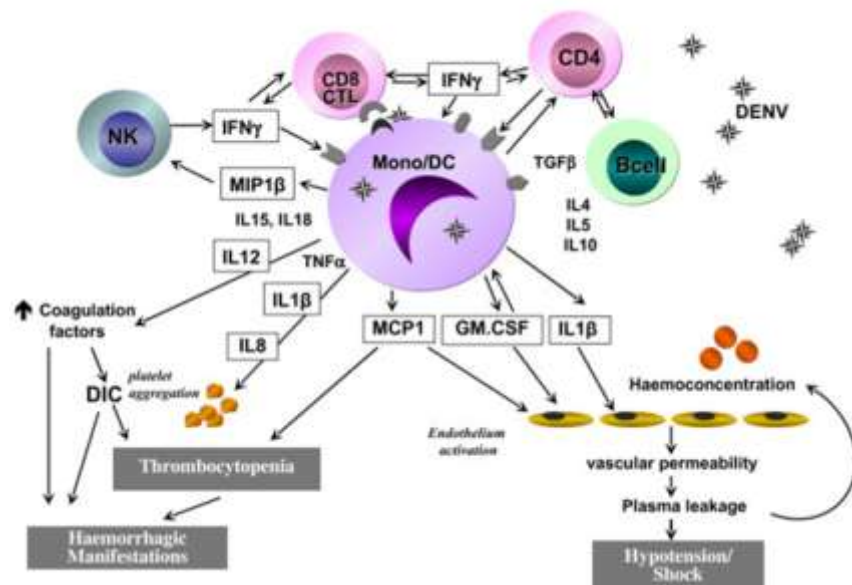


Figura 6. Mecanismo hipotético para explicar atividade de citocinas durante a infecção por DENV. **Fonte:** adaptado de BOZZA, 2008.

Há também evidências de que fatores genéticos como raça, HLA e outros polimorfismos genéticos, assim como fatores individuais (ex.: estado nutricional) estão envolvidos na susceptibilidade/resistência a doenças infecciosas e na determinação de uma resposta imunológica mais ou menos protetora (CLYDE; KYLE & HARRIS, 2006; COFFEY, 2009; SIERRA, 2007; ACIOLI-SANTOS, 2008; PASTOR, 2013). Ainda, outros elementos como a definição do papel de anticorpos neutralizantes e a elucidação dos

mecanismos de escape do vírus ao sistema imune, a determinação do papel da autoimunidade no curso da dengue com a produção de auto anticorpos considerando aqueles que reagem de forma cruzada e inespecífica, necessitam ser mais detalhados (FALCONAR, 1997; RODRIGO, 2009; UBOL, 2010). Estudos que descrevem uma conexão entre suscetibilidades genéticas como polimorfismos de receptores celulares e a produção de citocinas entre outros componentes são importantes não só para ajudar na elucidação do fenômeno dengue no decorrer de uma infecção secundária, mas também para definir fatores de predisposição para o desenvolvimento de formas graves da doença, o que seria uma importante ferramenta prognóstica no momento do manejo clínico do paciente (KURANE & TAKASAKI, 2001; PÉREZ, 2010; BUTTHEP, 2012; RATHAKRISHNAN, 2012).

Diagnóstico laboratorial de dengue

O diagnóstico laboratorial é parte fundamental da vigilância epidemiológica da dengue e desempenha várias funções dentre elas: confirmação da doença; monitoramento da circulação viral pela identificação da introdução e/ou recirculação de um novo sorotipo/genótipo; apoio aos estudos epidemiológicos; alerta ao sistema de vigilância epidemiológica para o aumento da atividade viral como fator preditivo de epidemia iminente (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Para o clínico é ferramenta de suma importância para o manejo e evolução dos pacientes envolvendo o diagnóstico precoce da infecção, diagnóstico diferencial frente a outras patologias assim como prognóstico de formas graves da doença. Adicionalmente, apoia pesquisas de características inerentes ao hospedeiro, vetor e vírus envolvidos na patogênese da dengue bem como estudos para avaliar a resposta vacinal (CORDEIRO, 2012; WHO, 2004, 2009b).

As primeiras técnicas utilizadas para diagnóstico laboratorial de infecção por flavivírus foram: inibição da hemoaglutinação (IH), fixação de complemento e inoculação em camundongos. Desde então, houve um grande avanço nas técnicas de diagnóstico da dengue principalmente com o desenvolvimento dos testes imunoenzimáticos (ELISA), testes imunocromatográficos (“teste rápido” ou *bedside*) e testes de biologia molecular (GUZMÁN; KOURÍ, 2004).

Informações relativas às características clínico-epidemiológicas e o *timing* da doença precisam ser considerados para a escolha do método adequado para diagnóstico da dengue (**Figura 7**) (HUNSPERGER, 2014; GUZMÁN & KOURÍ, 2004; PAHO, 1994; VORNDAM & KUNO, 1997). Atualmente o diagnóstico laboratorial é baseado na detecção direta dos vírus e/ou de seus componentes (ácido nucléico e antígenos virais) em soro, plasma e células sanguíneas (amostras mais utilizadas) durante a fase de viremia, geralmente em até cinco dias do início dos sintomas. Adicionalmente podem ser detectados em fragmentos de tecido do fígado, pulmão e rins assim como em outros tecidos nos estudos *post-mortem*. No fim da fase aguda da infecção (~6º dia) o uso de técnicas sorológicas para a pesquisa de anticorpos antidengue são métodos indiretos amplamente utilizados para o diagnóstico.

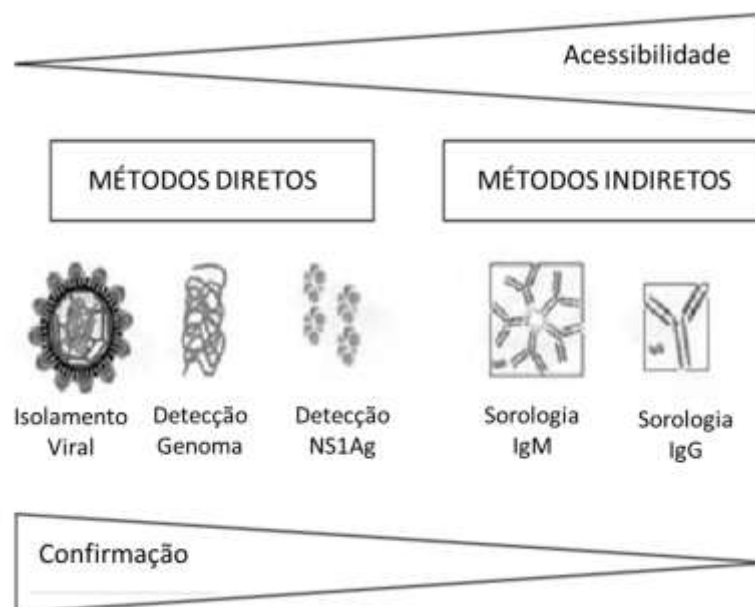


Figura 7: Comparação dos testes diagnósticos de acordo com a acessibilidade às técnicas e confirmação da infecção por DENV. A figura mostra que enquanto os métodos diretos de diagnóstico de dengue apresentam maior confiabilidade na confirmação da infecção por dengue, os métodos indiretos apresentam melhor oportunidade de diagnóstico. **Fonte:** WHO, 2009b. **Nota:** adaptado e traduzido pela autora.

Deteção viral e/ou seus componentes

A técnica padrão para o isolamento e identificação viral envolve cultura celular, usualmente de linhagem de mosquito (clone C6/36, *Aedes albopictus*) (IGARASHI, 1978) seguida de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais contra os quatro sorotipos (GUBLER, 1984). No Brasil, esta técnica é amplamente utilizada em laboratórios de referência regionais e nacionais e exige maior habilidade técnica, além de requerer alto investimento em estrutura e longo tempo de processamento das amostras para liberação

dos resultados. Outras técnicas de isolamento viral de dengue tais como a inoculação intratorácica em mosquitos ou intracraniana em camundongos recém-nascidos apresenta maior sensibilidade, entretanto requerem mais investimentos em manutenção, biossegurança e equipamentos quando comparadas à técnica por cultura celular (GUZMÁN & KOURÍ, 2004; TANG & OOI, 2012). Em Goiás, o monitoramento da circulação dos vírus dengue é realizado pelo Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO) desde 1998 quando a técnica de isolamento viral em cultura celular foi implantada. Entre os anos de 1994 a 1997 as amostras eram enviadas ao Instituto Evandro Chagas (IEC) (Laboratório de Referência Nacional).

Outro método amplamente utilizado para diagnóstico de dengue na fase aguda da doença é a detecção do ácido nucléico viral (RNA). Primeiramente, o RNA é extraído das amostras utilizando técnica *in house*, kits com colunas de extração ou equipamentos automatizados. Na sequência é realizada uma reação utilizando a transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*: RT-PCR) na qual os produtos da amplificação são geralmente detectados por gel de eletroforese (GUZMAN & KOURI, 2003; LANCIOTTI, 1992). Vários oligonucleotídeos e protocolos de RT-PCR têm sido desenvolvidos, validados e utilizados em todo o mundo. Essas variações conferem diferentes sensibilidades e especificidade à técnica. Nas Américas o protocolo de Lanciotti (1992) tem sido amplamente utilizado (CORDEIRO, 2012; GUZMAN & KOURI, 2003). Recentemente uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em tempo real, a qual associa uma detecção mais sensível dos produtos amplificados utilizando sondas com marcadores fluorescentes após a reação de PCR convencional, tem sido amplamente utilizada (JOHNSON; RUSSELL & LANCIOTTI, 2005; WAGGONER, 2013a). A PCR em tempo real agrega ainda outras vantagens ao método como a possibilidade de testar várias amostras simultaneamente assim como analisar os resultados de forma qualitativa e quantitativa (JOHNSON; RUSSELL & LANCIOTTI, 2005; WAGGONER., 2013b). As limitações para a ampla utilização destas técnicas de biologia molecular estão ligadas aos altos investimentos em infraestrutura, equipamentos assim como na qualificação profissional.

Outras ferramentas diagnósticas para dengue têm sido desenvolvidas utilizando as proteínas não estruturais mais conservadas dentre os flavivírus, como NS1, NS3 e NS5, (KAO, 2005). A glicoproteína NS1, em sua forma solúvel, é utilizada como biomarcador

no diagnóstico precoce da infecção por DENV. Esta glicoproteína, secretada durante a fase de viremia, desempenha importante papel para a replicação viral e pode ser detectada por imunoenaios. Atualmente kits comerciais para detecção de NS1Ag estão disponíveis no mercado e são amplamente utilizados. A sensibilidade deste teste pode variar consideravelmente de acordo com o sorotipo infectante assim como o tipo de infecção primária x secundária (HUNSPERGER, 2014; TANG & OOI, 2012; GUZMAN, 2010).

Deteção de anticorpos

Atualmente, os testes imunoenzimáticos para detecção de anticorpos IgM e IgG são os mais utilizados para análise sorológica da infecção por DENV. Características como simplicidade na execução, testagem simultânea de grande número de amostras e baixo investimento em equipamentos, garantem o amplo uso destas ferramentas em todo o mundo (GUZMAN, 2010).

De um modo geral, durante o curso de uma infecção primária por DENV, anticorpos do tipo IgM são detectados no soro ou plasma à partir do sexto dia após o início dos sintomas (INNIS, 1989; WAHALA, 2011). Entretanto, durante uma infecção secundária heterotípica, baixos títulos destes anticorpos são produzidos e, em muitos casos, indetectáveis (CHANAMA, 2004; GUZMAN & KOURI, 2004). Apesar dos anticorpos IgM produzirem resposta imunológica mais eficiente contra o sorotipo infectante, durante o teste laboratorial, podem promover uma reação cruzada entre outros anticorpos produzidos durante primo-infecção por DENV, assim como outros flavivírus o que dificulta o diagnóstico laboratorial da doença (KAO, 2005; GUZMAN, 2010).

Anticorpos antidengue IgG são geralmente detectáveis a partir do final da primeira semana do início dos sintomas de forma que sua detecção não se mostra como uma ferramenta útil no diagnóstico precoce da dengue durante primo-infecção. Contrariamente, infecções sequenciais ou secundárias por DENV podem ser caracterizadas pelo aumento rápido dos níveis de IgG ainda nos primeiros dias de doença. A soroconversão ou o aumento de quatro vezes dos títulos dos anticorpos IgG detectados em amostras pareadas (amostras do mesmo paciente coletadas em fase aguda e convalescente) testadas por IH, PRNT ou ELISA quantitativo, confirmam a infecção por DENV (GUZMAN, 2010) (**Figura 8**).

	Método	Interpretação	Característica das amostras
Confirma infecção por dengue	Isolamento viral	Vírus isolado	Soro (1-5 dias) ou
	Deteção de genoma	Positivo RT-PCR ou PCR tempo real	
	Deteção de antígeno	NS1 Positivo	fragmentos de tecidos post-mortem
		Imunohistoquímica positiva	fragmentos de tecidos post-mortem
	Soroconversão IgM	De IgM negativo para IgM positivo em soro pareado	Soros S1: fase aguda (1-5 dias) e S2: convalescente (15-21 dias)
	Soroconversão IgG	De IgM negativo para IgM positivo em soro pareado	
Provável infecção por dengue	IgM positivo	Igm positivo	Soro (>5 dias)
	Altos níveis de IgG	Altos níveis de IgG por ELISA ou IH (≥ 1280)	

Figura 8: Técnicas laboratoriais utilizadas para diagnóstico de dengue: interpretação de resultados e características das amostras para análise. **Fonte:** WHO, 2009b. **Nota:** adaptado e traduzido pela autora.

As maiores limitações dos testes sorológicos para diagnóstico laboratorial da dengue pela detecção de anticorpos estão relacionadas à perda de sensibilidade e especificidade particularmente acentuada durante infecções secundárias e em áreas com co-circulação de outros flavivírus (HUNSPERGER, 2009). Adicionalmente, a detecção de anticorpos IgM e IgG por ELISA não permite a diferenciação dos sorotipos virais. Para um diagnóstico sorológico específico a técnica recomendada pela OMS é o teste de soroneutralização por redução de placas (PRNT) para detecção de anticorpos neutralizantes sorotipo específico (DUTRA, 2009; ROEHRIG; HOMBACH & BARRETT, 2008; TIMIRYASOVA, 2013).

Anticorpos Neutralizantes

Os anticorpos neutralizantes sorotipo-específico são biomarcadores utilizados para avaliar a resposta imunológica à exposição natural aos DENV assim como para avaliar resposta vacinal para dengue em ensaios pré-clínicos e clínicos (ENDY, 2014; SABCHAREON, 2012, VILLAR, 2014).

O ensaio de soroneutralização por redução de placas (PRNT) *in vitro* foi desenvolvido por Russel e Nisalak na década de 60 (RUSSELL, 1967) e é até os dias atuais, considerado como o método sorológico de maior especificidade no qual é possível detectar anticorpos neutralizantes sorotipo específico dentre os quatro vírus dengue (WHO, 2007, 2009b).

Este ensaio baseia-se na capacidade dos vírus dengue infectarem células susceptíveis mantidas em cultura com consequente produção de uma área localizada de infecção chamada de placa. A partir dessa condição pesquisa-se a habilidade de neutralização dos anticorpos presentes no soro ou plasma do indivíduo os quais irão impedir a ação viral através da formação do complexo antígeno-anticorpo interrompendo a propagação da infecção e consequentemente inibindo a formação de placas. A atividade neutralizante do soro é determinada pela sua capacidade de reduzir o maior número de placas virais comparadas ao teste controle no qual os vírus infectam a cultura celular livremente (PUTNAK, 2008; ROEHRIG; HOMBACH & BARRETT, 2008; SHU, 2002).

Muitos protocolos de PRNT têm sido utilizados no mundo todo e a variabilidade dos ensaios relacionada principalmente ao uso de diferentes linhagens celulares (Vero, BHK21, LLCMK, PS), e entre outros reagentes (água, agarose, CMC), conferem alterações significativas na resposta do ensaio o que dificulta sua interpretação quanto à correlação à proteção sorológica contra infecção além da comparação dos dados entre diferentes instituições (SALJE, 2014; TIMIRYASOVA, 2013; RAINWATER-LOVETT, 2012; THOMAS, 2009; WHO, 2007). Para minimizar estas discrepâncias a Organização Mundial de Saúde publicou em 2007 um guia no intuito de promover maior harmonização entre os protocolos de PRNT (ROEHRIG; HOMBACH & BARRETT, 2008; WHO, 2007).

O PRNT é uma técnica laboriosa que exige expertise laboratorial e requer um tempo considerável para a liberação dos resultados. Dessa forma não é um método passível de alto rendimento o que limita o seu uso em larga escala nos estudos epidemiológicos e nos ensaios de avaliação de vacina. Atualmente novas técnicas estão em uso (ensaio por citometria de fluxo; micro neutralização baseado em ELISA, entre outros), entretanto, todas essas metodologias devem ser comparadas/validadas junto ao PRNT o qual continua sendo o método considerado “padrão ouro” para a detecção dos anticorpos neutralizantes segundo a OMS (ROEHRIG; HOMBACH; BARRETT, 2008).

Os anticorpos neutralizantes presentes no soro dos indivíduos estão correlacionados à proteção contra muitas infecções virais e, dessa forma, o estudo destes anticorpos contra DENV por PRNT torna-se a melhor correlação *in vitro* de uma efetiva proteção *in vivo* (ROEHRIG; HOMBACH & BARRETT, 2008; WHO, 2007).

Deste modo, a presente tese analisou a série temporal (1994-2013) da circulação dos DENV em Goiás, realizado no Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovani Cysneiros (LACEN-GO). Apresentou como objetivo principal avaliar a resposta imune sorotipo-específica em pacientes infectados por dengue recrutados durante a maior epidemia de dengue (2013) registrada na cidade de Goiânia-GO, macrorregião Centro-Oeste do Brasil.

JUSTIFICATIVA

No Brasil a dengue é considerada um importante problema de saúde pública. A atual circulação simultânea dos quatro sorotipos virais, o aumento de casos graves e de óbitos indicam a hiperendemicidade da doença na última década. No estado de Goiás observou-se um aumento expressivo do número de casos e hospitalizações por dengue em consonância com o perfil epidemiológico nacional da dengue no período de 2002 a 2013. Desde 2008, a macrorregião centro-oeste vem sendo considerada uma das mais afetadas pela dengue no país. Em 2013 estimou-se incidência de 2.233,6/100.000 habitantes em Goiás, a segunda maior ocorrência de casos de dengue no país (BRASIL, 2011, 2014; TEIXEIRA, 2013).

A imunopatogênese da dengue é complexa e envolve fatores relacionados ao hospedeiro humano, vetor e características virais. Entre os mecanismos propostos para o desenvolvimento de formas graves da doença está o da amplificação da infecção viral mediada por anticorpos (ADE) que são produzidos em primo-infecção frente a uma infecção secundária heteróloga. Este fenômeno pode ocasionar falha na atividade de neutralização viral durante a infecção por novo sorotipo, possibilitando uma resposta imunológica atípica e/ou deletéria (HALSTEAD, 1988; WAHALA, 2011). Em contrapartida anticorpos neutralizantes sorotipo-específico preexistentes podem estar correlacionados à função de proteção contra infecção por DENV. Dessa forma, a identificação dos níveis de anticorpos neutralizantes sorotipo específicos são considerados importantes marcadores *in vitro* da proteção *in vivo* (ROEHRIG; HOMBACH & BARRETT, 2008; WHO, 2007).

A técnica de soroneutralização por redução de placas (PRNT) é a metodologia recomendada pela OMS para detectar e quantificar anticorpos neutralizantes antidengue sorotipo específico (ROEHRIG; HOMBACH & BARRETT, 2008; WHO, 2007). O PRNT tem sido utilizado em inquéritos soroepidemiológicos para identificação de exposição prévia aos DENV em diferentes cenários epidemiológicos (WILDER-SMITH, 2005, CUNHA, 2008; CASTANHA, 2012; LESLIE, 2014). Esse ensaio vem sendo utilizado em coortes pediátricas para identificação do sorotipo infectante bem como o monitoramento da gravidade clínica de acordo com a resposta sorotipo-específica (ENDY, 2014). Os anticorpos neutralizantes sorotipo-específicos são também utilizados como biomarcadores

para avaliar a resposta da vacina para dengue em ensaios pré-clínicos e clínicos (SABCHAREON, 2012; ENDY, 2014; VILLAR, 2014). No Brasil existe uma lacuna de conhecimento sobre o perfil de resposta imune sorotipo-específica em pacientes com dengue com avaliação dos anticorpos neutralizantes preexistentes e sua relação com o desfecho clínico dos casos em nosso meio.

Em estudos anteriores, o grupo de pesquisa em dengue em Goiás, caracterizou a vigilância laboratorial da dengue em Goiás no período de 1994-2003 (FÉRES, 2006; FÉRES, 2003). A epidemiologia da dengue no Brasil (1981-2002) (SIQUEIRA, 2005) e em Goiás (1994-2008) (MACIEL, 2008) foi objeto de publicações anteriores. Estabeleceu-se também uma coorte clínica de dengue em adultos, no período epidêmico de 2005 durante co-circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 visando avaliar as características clínico-epidemiológicas dos pacientes no município de Goiânia (GUILARDE, 2008). Inquéritos soroepidemiológicos realizados nos anos de 2001 e 2002 evidenciaram a prevalência da infecção por dengue em Goiânia-GO (SIQUEIRA, 2004, 2008). Foram avaliados os sorotipos circulantes dos vírus dengue em subgrupo de indivíduos assintomáticos provenientes do inquérito sorológico de base populacional na cidade de Goiânia em 2002 (FINOTTI, 2005).

A presente tese caracterizou o perfil imunológico sorotipo-específico em pacientes de dengue com diferentes desfechos clínicos, em adultos e crianças, recrutados durante a epidemia de 2012-2013 em Goiânia. Ainda, analisamos os dados da série histórica da vigilância laboratorial da circulação dos DENV em Goiás, realizados no LACEN-GO, com o intuito de registrar o período de introdução dos quatro sorotipos e a sequência temporal de circulação dos DENV em Goiás.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar os dados da vigilância laboratorial referente à identificação dos vírus dengue para monitoramento viral, realizados no Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO), no período de 1994-2013 no estado de Goiás. Caracterizar o perfil de anticorpos neutralizantes sorotipo específico em pacientes com dengue durante o surto de dengue no ano de 2012-2013 em Goiânia-GO.

Objetivos Específicos

Analisar os dados da vigilância laboratorial da circulação dos vírus dengue realizados no LACEN-GO, no período de 1994 a 2013, no estado de Goiás.

Determinar os títulos de anticorpos neutralizantes antidengue sorotipo específico em amostras pareadas de fase aguda e convalescente de pacientes com dengue recrutados em 2012 e 2013. Determinar a frequência de resposta imune monotípica ou multítípica frente aos DENV-1 a 4.

Descrever as características clínico-epidemiológicas e da resposta imune antidengue sorotipo-específica entre pacientes com dengue segundo a gravidade clínica da doença;

Comparar os resultados da identificação do DENV infectante pela técnica de PRNT em amostras pareadas de pacientes com dengue com os resultados obtidos por RT-PCR.

RESULTADOS

Manuscrito 1

Vigilância laboratorial de dengue: série histórica da circulação dos DENV em Goiás, 1994-2013.

Angela F. L. de Teive e Argolo^{1,2}, Vinícius L. da Silva², Lucileis F.F. da Silva², Carmen H. Ramos², Valéria C. R. Féres³, Celina M. T. Martelli^{1,4}.

Autor correspondente: Angela F. L. de Teive e Argolo, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 74605-050, Goiânia-GO, Brasil (angelafarmaceutica@hotmail.com).

Instituições:

- 1- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 74605-050, Goiânia-GO, Brasil;
- 2- Laboratório Central de Saúde Pública de Goiás (LACEN-GO), Secretaria de Estado da Saúde de Goiás, 74.853-120, Goiânia-GO, Brasil;
- 3- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 74.605-220, Goiânia-GO, Brasil;
- 4- Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fundação Oswaldo Cruz, 50.740-465, Recife-PE, Brasil.

Resumo:

Dados da vigilância virológica da dengue no estado de Goiás foram analisados no período de 1994 a 2013. DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4 foram isolados em cultura celular clone C6/36 (*Aedes albopictus*) e identificados por imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais. Os testes foram realizados no Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovani Cysneiros (LACEN-GO), referência regional no diagnóstico de dengue. No período do estudo 21.684 testes de isolamento viral foram realizados. A positividade global do teste foi de 22,3% com variação de 0,3% no ano de 1997 e de 38,8% em 2010. Entre as 4.839 amostras positivas, o DENV-1 foi isolado em 3.023 (62,5%), seguido do DENV-3 em 1051 (21,7%), DENV-4 em 413(8,5%) e DENV-2 em 352(7,3%) amostras respectivamente. A introdução do DENV-1 em 1994 originou o primeiro surto de dengue na região com ~3.700 casos notificados. O sorotipo 1 foi predominante no período de 1994 a 2002 sendo identificado em 84% das amostras positivas. DENV-2 foi detectado em 1998 com baixa frequência de isolados no período do estudo. A partir da introdução deste novo sorotipo foram registrados os primeiros casos de febre hemorrágica de dengue (FHD) no estado, em consonância com os dados nacionais. O DENV-3 foi identificado em Goiás no ano 2002, sendo o sorotipo predominante entre 2003 a 2008. A partir de 2008 houve aumento significativo de casos de dengue na região em relação aos casos registrados no país. O DENV-4, identificado em 2011, foi o sorotipo

predominante em 2013 e co-circulou com o DENV-1 durante a maior epidemia de dengue em Goiás com ~145 mil casos notificados (10% do total de casos do país). A série histórica da vigilância virológica dos DENV em Goiás mostrou o período de introdução dos quatro sorotipos e a sequência temporal da circulação viral de dengue no Estado.

Palavras-chave: Goiás; vírus dengue; vigilância laboratorial; epidemiologia.

Introdução

Dengue é a arbovirose de maior capacidade de dispersão no globo e constitui-se um importante problema de saúde pública principalmente em países tropicais e subtropicais onde a doença é considerada endêmica. Os vírus dengue (DENV-1 a DENV-4) são membros da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e produzem infecção que pode levar ao desenvolvimento de doença febril aguda de amplo espectro clínico (1). A Organização Mundial de Saúde estima que mais de 50 milhões de infecções ocorra anualmente e, destas, aproximadamente 500 mil casos são considerados graves com mais de 20 mil óbitos (2,3). No Brasil, um aumento no número de casos de dengue e da gravidade da doença vem sendo registrado de forma marcante a partir da segunda década da história da dengue no país (2000-2013) (4,5). Em 2013 ocorreu o maior pico epidêmico de dengue com 1,47 milhões de casos notificados, 6.856 casos graves e 674 óbitos (5).

O estado de Goiás (~6,4 milhões de habitantes) (6), localizado na região Centro-Oeste do Brasil, apresenta um cenário epidemiológico da dengue marcado por períodos endêmicos e epidêmicos desde a introdução do DENV-1 em 1994. Nos últimos cinco anos, Goiás tem sido um dos estados mais afetados pela dengue no país (4) com um aumento expressivo do número de casos, hospitalizações e óbitos pela doença em consonância com o padrão epidemiológico nacional da dengue (5).

Rotineiramente o diagnóstico laboratorial de dengue é baseado na detecção direta dos vírus e/ou de seus componentes (genoma ou antígenos virais) em amostras de sangue coletadas durante a fase de viremia da doença (~5 dias do início dos sintomas). Técnicas sorológicas para a pesquisa de anticorpos são métodos indiretos amplamente utilizados para confirmação da dengue em amostras coletadas no fim da fase aguda (à partir do 6º dia de sintoma) (7). O componente laboratorial integra a vigilância epidemiológica da dengue e, deve incluir além da confirmação laboratorial de casos, o monitoramento dos sorotipos virais circulantes de forma a

alertar o sistema de vigilância para o aumento da atividade viral como fator preditivo de epidemia iminente (8,9).

O Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO) é a unidade de referência para o diagnóstico laboratorial de dengue e monitoramento da circulação viral no estado de Goiás. O LACEN-GO compõe a rede nacional de Laboratórios de Saúde Pública que apoia as ações de vigilância epidemiológica para controle da dengue no país.

Este estudo analisou os dados da vigilância virológica da dengue no estado de Goiás realizados no LACEN-GO, nos anos de 1994 a 2013.

Metodologia

Fluxo de amostras para diagnóstico da dengue e vigilância virológica dos DENV

Amostras de sangue coletadas de pacientes com suspeita de dengue atendidos nas unidades de saúde em todo o estado foram encaminhadas ao LACEN-GO para diagnóstico laboratorial, segundo demanda passiva do sistema de vigilância epidemiológica. O diagnóstico precoce da infecção por DENV foi realizado em amostras de sangue coletadas no período de viremia através da detecção do antígeno NS1 por ELISA e/ou detecção do RNA viral por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A pesquisa de anticorpos anti-dengue IgM por ELISA foi realizada em amostras coletadas a partir do 6º dia de sintomas.

Para a vigilância laboratorial da circulação dos DENV em Goiás, pacientes com suspeita de dengue, na fase de viremia da infecção (até cinco dias de sintomas), foram selecionados nas unidades de saúde, segundo capacidade laboratorial do LACEN-GO, para pesquisa de vírus.

Isolamento e identificação dos DENV

A técnica de isolamento viral é considerada padrão ouro para a identificação dos DENV. Brevemente, as amostras foram inoculadas em cultura celular clone C6/36, *Aedes albopictus* (10) mantidas em meio Leibovitz L-15, suplementado com solução de aminoácidos não essenciais 1%, triptose fosfato 10% e soro bovino fetal (SBF) 2% para o meio de crescimento. Estas amostras foram incubadas em estufa BOD a 25°C por 10 dias. Os DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4 foram identificados pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais (11).

Aspectos éticos

Os resultados analisados foram extraídos da base de dados do LACEN-GO a partir dos relatórios encaminhados ao sistema de vigilância epidemiológica do Estado. Os dados foram desvinculados da identificação dos pacientes com código numérico para garantir o anonimato e confidencialidade dos pacientes.

Análise de dados

A frequência de casos notificados, amostras testadas pelo isolamento viral e sorotipos identificados foram obtidas utilizando o programa Excel[®] 2010. As médias de incidência de dengue com seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram calculadas utilizando OpenEpi v.3.03.

Resultados

No período de 1994 a 2013 foram testadas 21.684 amostras pela técnica de isolamento viral no LACEN-GO com o objetivo de monitorar a circulação dos vírus dengue no estado de Goiás. 22,3% das amostras foram positivas e os quatro sorotipos virais (DENV-1 a DENV-4) foram identificados no período. A positividade global do teste foi de 17,5% com variação de 0,3% no ano de 1997 e de 38,8% em 2010. Entre as 4.839 amostras positivas, o DENV-1 foi isolado em 3.023 (62,5%), seguido do DENV-3 em 1051 (21,7%), DENV-4 em 413 (8,5%) e DENV-2 em 352 (7,3%) amostras respectivamente (Tabela 1).

No estado de Goiás, entre 1994 a 2000, a incidência média de dengue foi de 104,1/100.000 habitantes (IC95% 55,9-152,2%). Neste período o teste de isolamento viral foi realizado em 5,6% (1.830/32.282) do total de casos notificados com uma positividade de 6,5% (119/1.830). Entre os anos de 2001 a 2007 aproximadamente 130 mil casos de dengue foram notificados com uma incidência média de 261,1/100.000 habitantes (IC95% 140,1-382,2%). O teste de isolamento viral foi realizado em 7,5% (9.966) do total de casos notificados e apresentou uma positividade de 20% (1.993/9.966). No período 2008 e 2013 aproximadamente 450 mil casos de dengue foram notificados em Goiás com incidência média de 1.025,6/100.000 habitantes (IC95% 235,2-1.816%). O isolamento viral foi realizado em 2,2% do total de casos notificados e a positividade do teste foi de 27,6% (2.727/9.888) (Tabela 1) (Figura 1).

A Figura 2 mostra a circulação dos DENV identificados por isolamento viral no estado de Goiás entre 1994 a 2013. O DENV-1 foi o sorotipo predominante nos períodos de 1994-2002 e

2009-2012 com frequência de identificação de 88% e 26.5%, respectivamente. O DENV-2 foi detectado pela primeira vez em 1998 e permaneceu com baixa frequência de identificação ao longo do período (7,3%). Em 2009 o DENV-2 foi isolado em 24% das amostras positivas, mas não foi identificado como sorotipo predominante. A introdução do DENV-3 ocorreu no ano de 2002. Este sorotipo foi prevalente entre os anos de 2003 a 2008 sendo isolado em 92% das amostras positivas no período. O DENV-4 foi identificado na região em 2011. Em 2013 este sorotipo foi predominante entre os isolados (55%) com co-circulação do DENV-1 (45%) (Figura 2) (Tabela 1).

Discussão

Este estudo analisou 20 anos de vigilância laboratorial da circulação dos DENV em Goiás. Os dados mostraram um expressivo número de amostras (21.684) testadas para isolamento viral. A capacidade de testagem laboratorial aumentou gradativamente após o período de implantação da técnica no LACEN em Goiás. Em 2013, durante a maior epidemia de dengue registrada no país, 2,2% dos casos notificados no estado (~145 mil) foram submetidas ao teste de isolamento viral. No contexto epidemiológico torna-se necessário avaliar a representatividade de amostras enviadas para o monitoramento viral provenientes das regionais de saúde.

Os quatro sorotipos virais (DENV-1 a 4) foram identificados no período do estudo. A positividade de 22,3% observada no teste de isolamento viral corrobora com outros estudos que utilizaram esta técnica para identificação dos sorotipos circulantes (12,13).

Três períodos marcaram a epidemiologia da dengue em Goiás. Os anos de 1994 a 2000 representaram um período de ondas epidêmicas de dengue principalmente em centros urbanos com incidência média de 104,1 (IC95% 55,9-152,2%). Durante esse período, a primeira epidemia de dengue foi registrada clínica e laboratorialmente no ano de 1994 com a introdução do DENV-1 (14). Este sorotipo foi isolado no estado de Goiás oito anos após a re-emergência da dengue no Brasil (15). Nesta epidemia mais de três mil casos da doença foram notificados e quase todos ocorreram em Goiânia, capital do estado. Houve dispersão e interiorização da doença com mais de 20.000 casos registrados em todo o estado até o ano de 1997 (16) com identificação do DENV-1 como único sorotipo circulante. Em 1998, o país enfrentou a maior epidemia de dengue da década com o registro de mais de 500.000 casos. Neste mesmo ano o DENV-2 foi isolado em Goiás e, a partir da introdução deste novo sorotipo, foram registrados

os primeiros casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) no estado (17) à semelhança dos dados relatados em Pernambuco e outras regiões do país (18,19).

Entre 2001 e 2007, período de circulação endêmico/epidêmico dos DENV, mais de 130 mil casos de dengue foram notificados com um incremento de 2,5 vezes na incidência de dengue comparado ao primeiro período. Em 2002, mais de 28 mil casos de dengue foram notificados em Goiás com predominância do sorotipo 3 o qual foi isolado no estado pela primeira vez. Neste ano ocorreu a substituição do DENV-1 por DENV-3 e este, permaneceu como sorotipo predominante até 2008. Diferentemente do relato de outras regiões do país, a emergência do sorotipo 3 em Goiás não esteve associada ao aumento da gravidade da doença em adultos (14). Ainda, segundo um estudo de coorte realizado no estado, a presença de infecção secundária entre pacientes adultos infectados por DENV-3, no ano de 2005, não foi fator preditivo para gravidade da doença (20).

No período 2008 a 2013, mais de 450 mil casos de dengue foram notificados em Goiás com aumento de 3,9 vezes na incidência de dengue comparado ao período anterior. Segundo os dados da vigilância epidemiológica, neste período, Goiás foi o estado mais afetado pela dengue no país (5). Destaca-se ainda neste período o cenário de hiperendemicidade da dengue no estado caracterizado pela co-circulação dos quatro sorotipos virais a partir do ano de 2011 quando o DENV-4 foi identificado no estado.

Em 2008 foi observada uma importante modificação no padrão da epidemiologia de dengue no Brasil com um deslocamento da faixa etária de casos graves para menores de 15 anos de idade coincidindo com a intensa circulação do DENV-2 (21). Em Goiás esta mudança não foi observada e os adultos jovens continuaram como os mais afetados pela doença em meio à co-circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

Na segunda metade de 2009, o DENV-1 reemergiu como sorotipo predominante no país após uma década de baixa circulação. Em 2010, observou-se um cenário de alta transmissão da doença com quase um milhão de casos notificados e aproximadamente 100 mil internações dando início a um novo ciclo da doença no Brasil (21,22). Neste ano, mais de 10% do total de casos ocorridos no país foram notificados em Goiás e apesar da predominância do DENV-1, houve um aumento expressivo do isolamento do sorotipo 2 o qual foi positivo em 24% (102/424) das amostras isoladas pelo serviço de vigilância laboratorial.

A introdução do DENV-4 no Brasil foi detectada na região norte no segundo semestre de 2010. Este sorotipo se dispersou para todas as regiões do país e foi isolado em Goiás no final de 2011 (23,24). Mesmo frente à susceptibilidade da população em relação ao sorotipo 4, o DENV-1 continuou predominante dentre os isolados. Seguindo a tendência do país, nos dois anos subsequentes, houve uma importante redução do número de casos de dengue na região assim como houve queda no registro de casos graves (25). Uma nova mudança no perfil epidemiológico da circulação dos vírus dengue em Goiás foi observada no ano de 2013 quando os dados da vigilância laboratorial mostram pela primeira vez a predominância do DENV-4 seguida de uma expressiva circulação do DENV-1 no mesmo período.

Conclusão

No período do estudo, destaca-se a prevalência do DENV-1 isolado em 62% das amostras positivas processadas no LACEN-GO, assim como o longo período de predominância do DENV-3 entre 2003 a 2008. É importante ressaltar que apesar de uma circulação sustentada do DENV-2, desde sua introdução no final da década de 90, este sorotipo nunca se destacou como predominante dentre as amostras isolados no estado de Goiás. O DENV-4 detectado no final de 2011 promoveu junto ao DENV-1, a maior epidemia de dengue já registrada no país no ano de 2013.

Atualmente, os quatro sorotipos virais circulam simultaneamente no estado caracterizando uma situação de hiperendemicidade da doença evidenciada pelo incremento do número de casos, hospitalizações e óbitos por dengue.

A análise da série histórica da circulação dos DENV em Goiás mostrou a introdução dos quatro sorotipos virais, a sequência temporal de circulação dos DENV contribuindo para a melhor compreensão do padrão epidemiológico regional.

Agradecimentos:

A equipe técnica do Laboratório de Virologia e à diretoria do LACEN-GO em nome da Dra. Maria Bárbara Helou Rodrigues.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control**. New ed., TDR: World Health Organization, Geneva, x, 147 pp, 2009a
2. WHO. **Impact of Dengue**. World Health Organization, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>
3. WHO. Scientific Working Group Report on Dengue [Internet]. October. 2006. Disponível em: http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/swg-report-dengue/pdf/swg_dengue_2.pdf
4. TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, p. e2520, 2013.
5. Brasil. **Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013**. In Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2014. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Dengue-classica-at---2013.pdf>
6. IBGE. **Séries estatísticas** [homepage on the Internet]: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2014. Disponível em: <http://serieestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=CD90&t=populacao-recenseada-residente-e-presente>.
7. GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International journal of infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.
8. CORDEIRO, M. T. Laboratory diagnosis for dengue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 18, p. S10–S12, 2012.
9. VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York-NY: CAB International, 1997. p. 313–333.
10. IGARASHI, A. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **The Journal of general virology**, v. 40, p. 531–544, 1978.
11. GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984.

12. SANTOS, F.B. et al. A review on dengue diagnosis and epidemiology by a regional reference laboratory from 1986 to 2011, Rio de Janeiro, Brazil. **Dengue Bulletin**. World Health Organization, p. 61–76, 2013.
13. ENDY, T.P. et al. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American journal of epidemiology**, v. 156, n. 1, p. 52-59, 2002.
14. FÉRES, V. C. R. et al. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. **Journal of clinical virology**, v. 37, n. 3, p. 179-183, 2006.
15. SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.245-246, 1986.
16. MACIEL, I. J.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 111–130, 2008.
17. SIQUEIRA, J. B. et al. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, p. 646–651, 2004.
18. NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 297–304, 1999.
19. ZAGNE, S. M. O. et al. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 677-679, 1994.
20. GUILARDE, A.O. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes and antibody response. **Journal of infectious diseases**, v. 197, n.6, p. 817-824, 2008.
21. Brasil. **Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. In Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde, Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010, Editora MS, Brasília - DF, p. 157-171, 2010b.
22. Brasil. **Informe Epidemiológico da dengue: análise de Situação e Tendências, 2010**. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília-DF, Brasil, 2010a.
23. Brasil. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adultos e crianças**. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão, 4 ed., Editora MS, Brasília-DF, p.1-21, 2011b.

24. Brasil. **Nota técnica n.33/2011- Isolamento do sorotipo DENV4 em Manaus/AM.** In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília-DF, 2011.
25. GOIÁS. Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Vigilância em Saúde. Gerência de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmissíveis. **Boletim Semanal de Dengue - Goiás 2013.** Goiânia: SUVISA/SES, 2013. Disponível em: <www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_850_RelatorioABoletimASemanalA-ASEA21.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2014.

Tabela 1. Distribuição dos casos notificados de dengue em Goiás em relação ao percentual de positividade pelo isolamento viral e o sorotipo viral identificado, 1994 a 2013.

Anos	Casos	Amostras	Positivos		Sorotipos identificados			
	notificados	testadas	N	%	DV1	DV2	DV3	DV4
1994	3700	44	8	18,2	8	-	-	-
1995	7757	113	9	7,9	9	-	-	-
1996	5396	153	7	4,6	7	-	-	-
1997	3709	293	1	0,3	1	-	-	-
1998	6412	268	10	3,7	7	3	-	-
1999	2640	451	26	5,7	18	8	-	-
2000	2668	508	58	11,4	41	17	-	-
2001	13484	1440	260	18,0	217	43	-	-
2002	28278	4122	891	21,6	809	57	25	-
2003	12701	1000	110	11,0	21	3	86	-
2004	8973	816	97	11,1	3	3	91	-
2005	23412	1159	312	26,9	-	2	310	-
2006	30386	758	163	21,5	-	-	163	-
2007	15698	671	160	23,8	-	2	158	-
2008	46269	915	172	18,7	3	44	125	-
2009	50807	1531	424	27,7	251	102	71	-
2010	115079	2041	792	38,8	718	53	21	-
2011	44009	1625	378	23,3	362	11	1	4
2012	31952	2262	386	17,1	290	4	-	92
2013	160090	1514	575	37,9	258	-	-	317
Total	613.420	21.684	4.839	22,3	3023	352	1051	413

DV1: dengue vírus sorotipo 1; DV2: dengue vírus sorotipo 2; DV3: dengue vírus sorotipo 3; DV4: dengue vírus sorotipo 4.

Fontes: Ministério da Saúde; LACEN-GO/SES

Figura 1. Incidência de dengue no Brasil e em Goiás no período de 1994 a 2013.

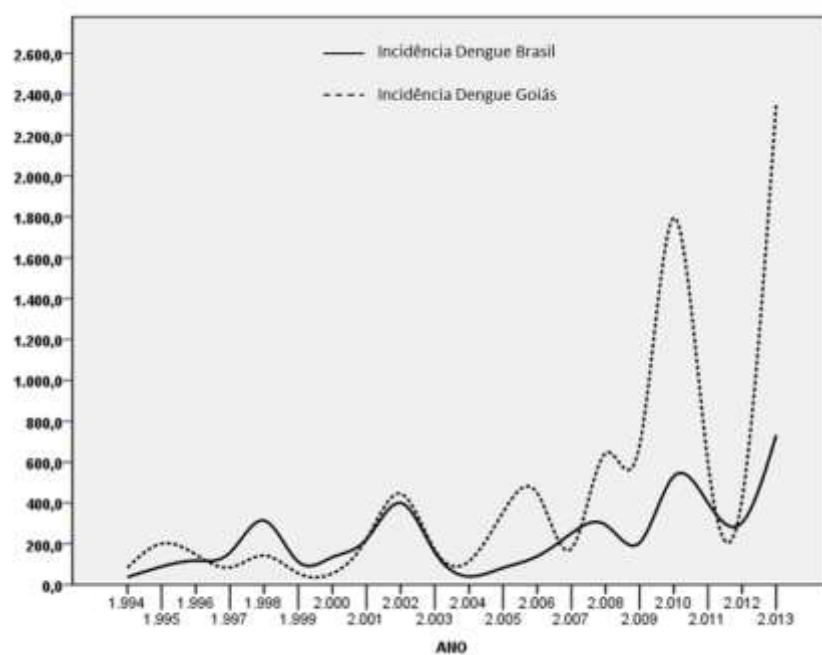
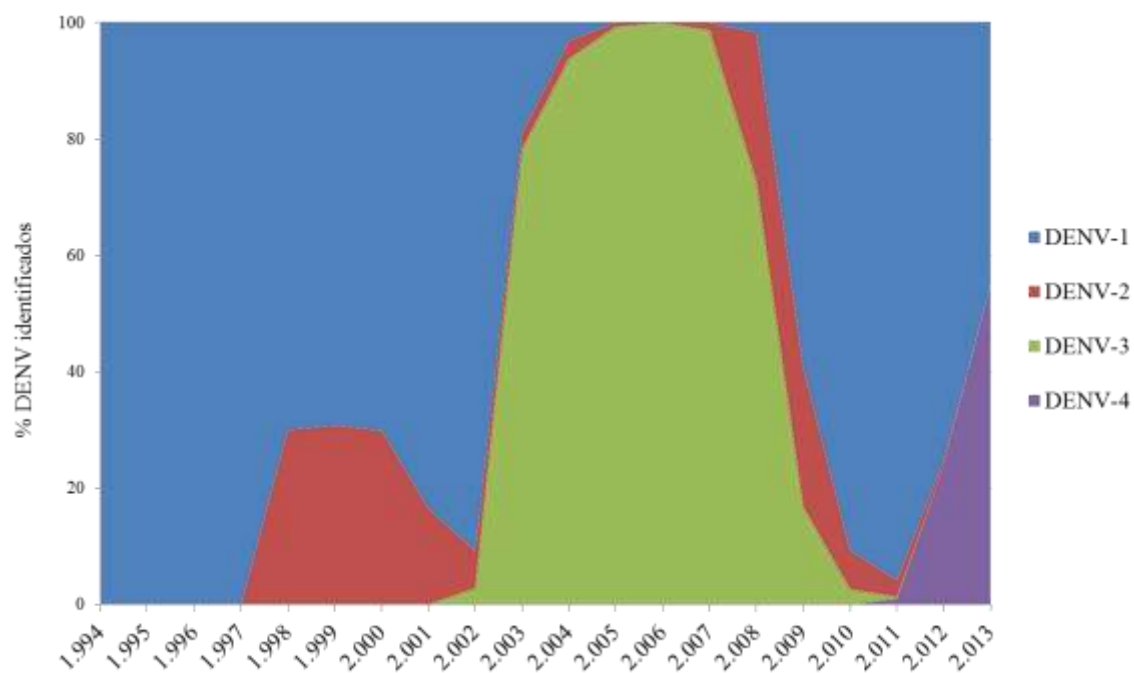


Figura 2. Circulação de sorotipos virais identificados por isolamento viral no estado de Goiás, 1994 a 2013.



High frequency of pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Central Brazil

Authors:

Angela Ferreira Lopes de Teive e Argolo^{1, 2*}, angelafarmaceutica@hotmail.com

Valéria Christina de Rezende Féres³, vcrisrezende@gmail.com

Marli Tenório Cordeiro⁴, marli.tenorio@gmail.com

Lucimeire Antonelli da Silveira¹, lucinelliufg@hotmail.com

Adriana Oliveira Guilarde¹, adrianaguilarde@gmail.com

Ernesto Torres de Azevedo Marques Jr.^{4,5}, marques@pitt.edu

Wayner Vieira de Souza⁴, waynervieira@gmail.com

Celina Maria Turchi Martelli⁴, celina@pq.cnpq.br

1-Institute of Tropical Pathology and Public Health of Federal University of Goiás, Rua 235, St Universitario, Goiania- GO, Brazil, 74.605-050.

2-Public Health Laboratory of Secretaria Estadual de Saúde de Goiás (LACEN-GO), Av. Contorno, 3.556, Jd. Bela Vista, Goiania-GO, Brazil, 74.853-120.

3-Pharmacy College of Federal University of Goias, Av. Universitaria, St. Universitario, Goiânia-GO, Brazil, 74.605-220.

4- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitaria, Recife-PE, Brazil, 50.670-901.

5- University of Pittsburgh, Center for Vaccine Research, Department of Infectious Diseases and Microbiology, Pittsburgh, PA, USA;

*Corresponding author: Angela F. L. T. Argolo, angelafarmaceutica@hotmail.com

Av. Contorno, 3.556, Jd. Bela Vista, Goiânia-GO, Brazil, 74.853-120.

High frequency of pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Central Brazil

Angela F. L. de Teive e Argolo^{1,2}, Valéria C. R. Féres³, Marli T. Cordeiro⁴, Lucimeire A. da Silveira¹, Adriana Guilarde¹, Ernesto T. A. Marques^{5,6}, Wayner V. Souza⁶, Celina M. T. Martelli⁶

Abstract

Background: This study aims to identify dengue neutralizing antibody response in patients with dengue from a well-characterized cohort during an outbreak in central Brazil, 2012-2013.

Methods: We analyzed paired samples from 40 patients with severe dengue and 20 patients with dengue. Eligibility criteria were: IgM, NS1Ag and/or RT-PCR positivity and positive IgG result. Plaque reduction neutralization test (PRNT₅₀) from DENV-1 to DENV-4 was performed to identify serotype-specific NAbs response. An infecting serotype was defined as ≥ 4 -fold increase in DENV NAbs in paired samples. Monotypic response was classified as PRNT₅₀ $\geq 1/20$ to only one DENV serotype, and multitypic response was considered to be PRNT₅₀ $\geq 1/20$ to two or more serotypes simultaneously.

Results: Patients were mainly adults. Virological dengue infection was confirmed by RT-PCR: DENV-4(n=14) and DENV-1(n=10). Forty-four out of 60(73.3%) patients had NAbs to DENV-4, DENV-1(68.3%), DENV-2(68.3%) and DENV-3(61.6%) respectively. Fifteen percent of the cases presented monotypic response, whereas 85% had multitypic response. DENV-4 infected-patients presented the greatest difference in PRNT₅₀ titers

compared with other serotypes. Pre-existing DENV NAbs was not correlated with disease severity. This was the first time that DENV-4 was implicated in an epidemic in the region.

Conclusion: Our data indicates high exposure of multiple DENV serotypes in all age groups in the pre-dengue vaccine era and also previous to Zika virus introduction in Brazil.

Keywords. Dengue virus; Neutralizing antibody; Dengue fever; Brazil.

Background

Dengue is one of the most relevant arboviruses in the world, endemic in more than 120 countries in tropical and subtropical areas [1]. Dengue virus is a mosquito-borne flavivirus with four characterized antigenically distinct serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). Approximately 390 million dengue infections occur every year with ~100 million symptomatic illnesses according to a recent modeling estimation [2]. In the American region, nearly 61% of the 2.38 million dengue cases were reported in Brazil in 2013[3]. Nationwide there was evidence of an upward trend in the number of reported dengue cases, hospitalization and deaths in the last decade [4–6]. In central Brazil the first dengue outbreak was registered in 1994 with the detection of DENV-1, followed by DENV-2 (1998), DENV-3 (2002) and DENV-4 (2011) [7, 8]. Over the last two decades the peak of dengue transmission occurred in 2013 with ~55 thousand cases registered with an incidence rate of 4,411 per 100,000 inhabitants [9].

Dengue may develop as an unapparent infection with the majority of cases presenting mild disease, but life-threatening conditions, death may occur [1]. Susceptible individuals mount a specific immune response when they are infected by one of the four DENV

serotypes. Sequential infections also occur after exposure to different serotypes [10,11]. DENV infection is believed to induce a long-lasting protective immunity to homologous serotypes. In addition, due to cross-protection, a transient immunity to heterologous serotypes may play a beneficial role in clinical outcomes [12]. By contrast, the viral infection mediated by antibodies (ADE) may be amplified during a secondary infection with a heterologous serotype, leading to deleterious immune response and disease severity [13–15].

The plaque reduction neutralization test (PRNT) is currently the gold standard to identify dengue serotype-specific neutralizing antibodies. This assay allows the detection of pre-existing and/or current DENV infection and seems to be correlated with protection [16]. In the current study, we aimed to identify the DENV neutralizing antibody response in paired samples collected from patients with dengue enrolled in hospital and ambulatory settings in central Brazil. The objective was also to assess the correlation of pre-existing DENV neutralizing antibodies by PRNT with dengue outcomes during the 2012-2013 outbreak. The study was conducted alongside the first DENV-4 outbreak, examining simultaneous co-circulation of the four serotypes in the region. The antibody profile is crucial to understanding the risk factors for disease severity and the protective role of the forthcoming dengue vaccines.

Material and methods

Study population

A clinical cohort of 452 laboratory-confirmed dengue cases was assembled in the city of Goiania in central Brazil (1.3 million inhabitants) [17] during the dengue outbreak of 2012-2013. The study area also has endemic yellow fever with high vaccination coverage (17DD

yellow fever) in the population [18]. We recruited cases in eight public health clinics and in one public and two private hospitals. Briefly, patients were clinically and epidemiologically evaluated at baseline alongside with collection of blood samples at acute phase of disease (≤ 7 days of onset of symptoms) (t0). The follow-up consisted of a clinical evaluation and blood collection during a recent convalescence at 8-15 days (t1) and late convalescence at 20-30 (t2) days after the onset of symptoms. The patients were clinically classified as dengue, dengue with warning signs (DWS) or severe dengue (SD) according to the World Health Organization criteria [1].

For the current study, dengue cases were defined by at least one of the following tests: IgM, NS1Ag and/or RT-PCR. At least one positive IgG result in paired sera was required to perform PRNT.

Out of the entire cohort, we selected the first 40 patients who were diagnosed with either DWS (dengue with warning signs) or SD (severe dengue), considering the previously defined eligibility criteria. As a comparison group, we also selected the first 20 enrolled dengue eligible patients.

Laboratory Procedures

Blood samples collected during the clinical evaluation (t0, t1 and t2) were processed, and sera were cryopreserved according to biosafety guidelines at the Laboratory of Molecular Biology and Immunology of Infectious Diseases of Federal University of Goiás in Goiania, Brazil.

We performed the following tests at baseline and follow-up: hematocrit, platelet, aspartate aminotransferase (16-50U/L), alanine aminotransferase (19-41 U/L) and albumin (3.5-5.0 g/dL); normal ranges reported in parentheses. For hematocrit 10% increase in paired samples was defined hemoconcentration. The platelet count nadir was defined as the lowest platelet value obtained.

Specific dengue tests. Acute (t0) and convalescent (t1 or t2) paired sera were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Dengue IgM-capture (PanBio, Ltd, Brisbane, Australia) and Dengue IgG Indirect (PanBio, Ltd, Brisbane, Australia) commercial kits. The NS1Ag test (Biorad Platelia™) and RT-PCR (Lanciotti et al., 1992) [19] were performed in acute serum samples. All of the tests were conducted according to the manufacturers' instructions.

Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Viral RNA was extracted from serum samples using a purification column from the PureLink™ Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). In one-step reverse transcription, cDNA was obtained and amplified using consensus primers to viral genome region (Capsid/prM). The nested PCR was performed to amplify the products of DNA using specific-serotypes primers to identify DENV-1 to 4 [19]. The amplicon were visualized on 1.2% agarose gel electrophoresis according molecular size specific to each of the serotypes and stained with Gel Red (Biotium, BRA).

Plaque reduction neutralization test (PRNT₅₀)

Dengue serotype-specific neutralizing antibodies (NAbs) were determined in paired samples by a PRNT₅₀ following a modified protocol by Morens et al. (1985) [20] and

according to WHO guidelines [16]. In brief, the PRNT₅₀ were conducted on Vero cells seeded at the density of 3×10^5 cells/mL in MEM (Invitrogen, USA) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO) in 24-well plates (0.5 mL/well) 24 hours before assay. Serum samples were heat inactivated at 56°C for 30 minutes then were diluted with MEM (1/20 to 1/2560) onto 96-well microtiter plates and incubation of 100 PFU of challenge virus. The assay was carried out using the DENV strains Brazil: DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016) isolated in the State of Pernambuco, and DENV-4 isolated in the State of Roraima in 1982. After incubation for 1h at 37°C, 5% CO₂, the medium was discharged and 50µl of each dilution of the mixture serum/virus was inoculated in triplicate. The plates were then incubated at the same conditions to allow virus adsorption. The cells were covered with 500µl of semi-solid medium and incubated for 7 days at 37°C, 5% CO₂. After discarding the semi-solid medium, the cell monolayer was fixed with formalin, stained with crystal violet and plaques counted. We considered a sample as positive when NAbs levels were $\geq 1:20$ against at least one serotype. The reciprocal of dilution of PRNT positivity was defined based on a 50% reduction in plaque counts (PRNT₅₀). To ensure accuracy and avoid inter-test variations, all of the procedures were performed by the same technician at a Public Health Laboratory Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO) in Goiás state with technical supervision at the LaViTE, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ in Recife, Pernambuco. The Brazilian institutions are part of the National Dengue Diagnosis Network.

Definitions:

The infecting serotype/current infection was defined as follows: a) ≥ 4 -fold increase in serotype-specific NAbs titers among paired sera, or b) positive serotype-specific NAbs

(PRNT₅₀ $\geq$ 1/20) in a convalescent sample but as a negative result in acute sample. Moreover, the infecting serotype was also defined by RT-PCR in acute samples.

A monotypic response was defined by the presence of NAbs against only one of the four DENV serotypes. A multitypic response was defined as a concomitant detection of NAbs against two (dual), three or more serotypes.

A primary infection was defined by detecting NAbs against the infecting serotype in the absence of pre-existing NAbs in paired sera. A secondary infection was defined by detecting the infecting serotype and the presence of preexistent heterologous NAbs.

A sequential DENV infection was identified when there was seroconversion of NAbs for the infecting serotype and a detection of similar titers of heterologous NAbs in paired sera. It was not possible to determine the sequence of infections in the presence of NAbs against three or more serotypes.

Statistical analyses

The main characteristics of the study population were described. The percentage of increase in hematocrit and the platelet count nadirs were stratified by severe and dengue cases. Albumin, AST and ALT values were categorized according to reference levels and compared among the dengue groups. The χ^2 test was applied for categorical variables, t-test to detect difference between means, 2-tailed $p < 0.05$ was considered statistically significant.

The reciprocal of dilution of PRNT₅₀ values were log-transformed (log base 10) after adding one (setting PRNT $< 1/20$ to a value of 1). The geometric mean titers (GMT) and

95% CIs were calculated. The median values of the PRNT titers (log base 10) difference among paired samples was compared using a non-parametric test of Friedman.

Statistical analyses was performed using SPSS v.18.0 (Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism v.6.04 (GraphPad Software, USA)

Ethical considerations

This study was approved by the Ethics Committee in Research of CPqAM/FIOCRUZ no. 24/2011. All patients signed informed consent forms and parental consent was obtained for all children and adolescents.

Results

Sixty subjects with paired samples of dengue confirmed cases were selected for the PRNT₅₀ to all four DENV serotypes. The age range of severe dengue and dengue patients varied from 3 to 81 years old and from 11 to 79 years old , respectively, with a statistical significant difference in the mean ages between the groups ($t\text{-test}=5.26$). There was a significant association between severity of dengue and hospitalization ($\chi^2=6.91$; $p=0.02$). Six patients had positive tourniquet test as the only hemorrhagic manifestation and were classified as dengue cases. Hemorrhagic manifestation was predominant among the severe dengue cases, a statistical significant association when compared to dengue cases ($\chi^2=22.85$; $p<0.01$). When considering the platelet count nadir, the severe dengue cases had a higher frequency of low platelets levels ($57.5\% \leq 100 \text{ platelets/mm}^3$) compared with 25% in the dengue group, yielding a statistically significant association between the groups. An increase of 10% or more in the hematocrit levels was not significantly different between the groups ($\chi^2=1.60$; $p=0.34$). Higher frequencies of low albumin levels (<3.5

g/dL) were detected among the severe dengue cases (47.5%) compared with the control group (20.0%) ($\chi^2=4.19$; $p=0.04$). Severe dengue cases presented higher values of AST compared with the control group ($\chi^2=4.07$; $p=0.04$) (Table 1).

In total all patients presented NAbs for one or more DENV serotypes. Overall, 44 out of the 60 dengue patients (73.3%) had NAbs to DENV-4, followed by DENV-1 (68.3%), DENV-2 (68.3%) and DENV-3 (61.6%), considering each serotype per se. The majority of dengue cases independent of severity had multitypic infection (85%). Nine out of the 40 severe dengue cases (22.5%) had NAbs against all four DENV serotypes while seven out of 20 dengue cases (35.0%) also had this multitypic response. There is no association between antibody response (monotypic, dual or multitypic) and severity of disease ($\chi^2=0.43$; $p=0.81$) (Table 2).

All of the patients had positive IgG results in acute or in convalescent serum samples according to inclusion criteria. 43 out of 60 subjects were IgM positive (71.6%); 34 were NS1Ag positive (56.6%). Twenty-four out of the 60 patients had a virological dengue infection confirmed by RT-PCR with the following results: DENV-4 (n=14) and DENV-1 (n=10) with negative virological results in 36 patients. At baseline, all of the patients had serum collected within 1-7 days, except one patient whose serum was collected at 9 days (median=4.5 days). The range in the number of days for the serum collection in the follow-up period varied from 8-30 days with extreme values (7 days in 1 patient and 7 patients with a range of 31-44 days) (median=21 days). The difference of the collection dates between convalescent and acute sera varied from 2-42 days (median=16 days). Fifty-two out of 60 patients (86.6%) had at least a four-fold increase in neutralizing antibodies in paired samples. Seroconversion by PRNT₅₀ was not detected in the following eight patients: two DENV-1 infected cases (subjects 5 and 7) by RT-PCR and six (subjects 4, 30,

36, 39, 42, and 56) serologically-confirmed dengue cases (IgM and/or NS1Ag) presented with NAbs titers compatible with previous exposure without recognizing the infecting serotype. One patient who was 43 years old (subject 34) had DENV-1 and DENV-2 concurrent infections by NAbs seroconversion with type 1 confirmed by RT-PCR (Supplementary table).

Older age groups presented with higher frequencies of NAbs to three or more dengue serotypes compared with patients who were ≤ 15 years old. Serological evidence for exposure to all four dengue serotypes occurred in 16 out of 60 (26.6%) participants. All of them were sixteen years old or more. The youngest patient (3 years old) presented with a monotypic response with a seroconversion to serotype 4 by PRNT₅₀ and had a confirmed DENV-4 infection by RT-PCR. A nine year old patient presenting with a DENV-4 infection by seroconversion had also pre-existing NAbs against serotype 3. Five dengue patients aged 10-15 years old had the following: monotypic response to DENV-4 (10 years old, subject 3); to DENV-2 (11 years old, subject 5); multitypic response to DENV-3/DENV-4 (11 years old, subject 4); DENV-2/DENV-4 (15 years old, subject 7) and response to DENV-2/DENV-3/DENV-4 (13 years old, subject 6) (Supplementary table).

The geometric mean titers (GMT) values varied slightly from acute to convalescent sera with overlapping confidence intervals for DENV-1, 2 and 3. Neutralizing Abs titers to DENV-4 were higher in the convalescent sera (GMT=281.83; IC95% 154.88-512.86) compared with the acute sera (GMT=60.63; IC95% 36.30-97.72) ($p<0.001$) (Figure 2). We presented the box-plot distribution of the difference between the NAbs titers ($\log_{10}$) measured in convalescent and acute samples for all DENV serotypes (Friedman Test $\chi^2=31.76$; $p<0.001$). The difference in the DENV-4 NAbs titers ($\log_{10}$) in paired samples

varied from zero to 2.41; IQR (0.0-1.2) and median value of 0.60. Our results showed that the DENV-4 infected patients presented with the highest difference in PRNT₅₀ titers compared with the other serotypes (Supplementary figure).

Figure 3 presents with individual NAbs titers stratified by DENV-1 or DENV-4 infected cases confirmed by RT-PCR. Seroconversion to serotype 4 by PRNT₅₀ was detected among all DENV-4 virologically-confirmed patients. Among the 10 DENV-1 infected patients, eight also showed seroconversion to serotype 1. Two patients did not present with seroconversion in NAbs titers to serotype 1 probably due to the small lag time (≤ 7 days) between sample collections.

Discussion

Our study showed evidence of the simultaneous circulation of all four DENV serotypes during the major outbreak in the year 2013 in central Brazil. The dengue patients presented with a high seroprevalence of neutralizing antibodies against DENV-1, DENV-2, DENV-3 and/or DENV-4 detected by PRNT₅₀ mainly as a multitypic response. These results may reflect cumulative exposure to the circulating dengue virus in the study setting. In our study, DENV-4 was the predominant serotype during the outbreak in consonance with the main dengue virus isolated in the same period by surveillance data [8].

Most dengue patients presented with pre-existing NAbs levels for at least two DENV serotypes simultaneously. A multitypic response was predominant among children and adults suggesting early and continuous transmission of DENV serotypes in the study setting. Our results of a high frequency of multitypic response are in line with a previous population-based study in the northeast area of Brazil (2005-2006) [21].

In the present study, there was a high frequency of multitypic responses independently of the severity of the dengue cases. Tertiary or quaternary immune responses were similarly distributed between the severe dengue and control group.

One female adult (43 years old) recruited in the hospital was classified as a severe dengue case and had concurrent infections by DENV-1 and DENV-2 according to the PRNT₅₀ results. DENV-1 was detected by RT-PCR, but DENV-2 was not, probably due to lower viral load of this serotype. The regional epidemiological scenario seems to be compatible with other studies that have also described the occurrence of concurrent dengue infections mainly during dengue outbreaks in hyperendemic areas with co-circulation of all four DENV serotypes in Asia [22-25] and in the Americas [26-28]. To our knowledge, this is the first concurrent dengue infection reported in Goias state, central Brazil.

Several recent studies have noted potential variations in PRNT₅₀ assay such as virus strains, cell lineage and other test components that may influence detection, quantification of NAbs titers with possible effects in PRNT₅₀ results and comparability among studies [29-31]. In our study, we analyzed serotype-specific NAbs titers for the subset of patients with virological confirmation (RT-PCR). Subjects with the infecting DENV-1 or DENV-4 serotypes defined by PRNT₅₀ had the same virological marker (DENV-1 or DENV-4) by RT-PCR suggesting the consistency of the assays performed. Our data also suggested a booster of pre-existing NAbs during a heterologous DENV infection as described in other studies [32,33]. The need of paired samples to diagnose dengue infections by PRNT₅₀ limits its application in clinical settings [1,34,35].

One of the constraints of the present study is the small sample size. PRNT consists of a laborious technique that requires a long time to run and technical skilled personnel, which

limits its use in large-scale studies [16]. Our results represent a NAbs response in symptomatic dengue patients recruited in ambulatory and hospital settings, showing a point-of care situation. We are aware that our results should be interpreted with caution and may not be extrapolated to other Brazilian regions. However, this is a timely study that characterized the dengue specific-serotype immune response during a large dengue outbreak. It highlights the high frequency of multitypic response pattern in all age groups.

This paper adds knowledge about serotype-specific antibody profile in dengue patients during a DENV-4 outbreak in central Brazil. To our knowledge this is the first evidence of multiple dengue infections in a clinical cohort of severe and non-severe dengue cases in this setting. Our data indicates high exposure of multiple DENV serotypes in all age groups in the pre-dengue vaccine era and also previous to Zika virus introduction in Brazil. This is essential information for future dengue vaccines programs.

Declarations

Acknowledgments

We thank all of the staff of virology laboratory of LACEN-GO, State Secretariat of Health, Goias, Brazil, including Carmen Ramos, Vinícius Lemes, Lucileis Fernandes e Marlene Camargo. We also thank all of the members of dengue study group from the Institute of Tropical Pathology and Public Health-UFG, Brazil: Mônica da Guarda, Isabela Cinquini, Priscila Teixeira, We are thankful to all of the research staff of the Laboratory of Virology and Experimental Therapy (LaViTE), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ in Recife, Pernambuco particularly Dr. Ernesto Marques, Dr. Laura Gil and Msc. Priscila Castanha. Martelli CMT and Souza WV received research scholarship [CNPq #306489/2010-4] and [307484/2007-6], respectively.

We thank Prof. João Bosco Siqueira for helpful comments.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa em Goiás [FAPEG] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq] [PRONEX-REDE DENGUE 73/2009 # 201210267000729]. C.M.T.M. and W.V.S. received research scholarships [CNPq numbers 306489/2010-4, 305281/2010-0].

Availability of data

Aggregated data is entirely presented in this publication. Individual data will not be shared following the ethical principle of confidentiality in the use of patient data.

Authors' contributions

AFLTA, VCRF, LAS, MTC and CMTM were in charge for the study design, data analyses, interpretation of the results and writing the manuscript. AFLTA carried out the immunoassays. AOG was in charge of clinical evaluation. WVS participated in the design of the study and performed the statistical analysis. ETMJ have been involved in drafting the manuscript and revising it critically. All authors have read and approved the final manuscript.

Authors' information

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not Applicable.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics Committee in Research of CPqAM/FIOCRUZ no. 24/2011. All patients signed informed consent forms and parental consent was obtained for all children and adolescents.

References

1. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control, new ed. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2009.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496:504–7.
3. Pan American Health Organization. World Health Organization. Communicable Diseases and Health Analysis. Health Information and Analysis. Health Situation in the Americas: Basic Indicators 2014. Washington, D.C., United States of America, 2014.
4. Siqueira JB, Martelli CMT, Coelho GE, Simplicio ACR, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:48–53.
5. Teixeira MG, Siqueira JB, Ferreira GLC, Bricks L, Joint G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7:e2520.

6. Brazilian Ministry of Health. Health Brazil 2010: Health analysis and selected evidences on impact of health surveillance actions. [in portuguese]. 2011;157–171. Available at: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2010.pdf. Accessed 23 October 2014.
7. Feres VCR, Martelli CMT, Turchi MD, Junior JBS, Nogueira RMR, Rocha BAM, et al. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. *J Clin Virol* 2006; 37:179–183.
8. Secretariat of Health of Goias. Dengue buletin - Goiás 2013 [in portuguese]. 2013. Available at: www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_850_RelatorioABoletimASemanalA-ASEA21.pdf. Accessed 19 December 2014.
9. Brazilian Ministry of Health. Dengue cases. Brazil, major regions and federative units, 1990-2013.[in portuguese]. 2014. Available at: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Dengue-classica-at---2013.pdf>. Accessed 05 January 2015.
10. Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunol* 2008; 21:123–132.
11. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen van VC, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* 2012; 366:1423–32.
12. Wahala MPB, Aravinda M de S. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses* 2011; 3:2374–2395.
13. Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32:154–156.

14. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch. Virol* 2013; 158:1445–1459.
15. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:532–543.
16. World Health Organization. Guidelines for plaque reduction neutralizing testing of human antibodies to dengue viruses. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2007. Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/who_ivb_07.07_eng.pdf. Accessed 12 October 2014.
17. Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE): Statistical series [in portuguese]. Available at: <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=CD90&t=populacao-recenseada-residente-e-presente>. Accessed 07 January 2015.
18. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud av* 2008; 22(64):53–72.
19. Lanciotti RS, Calisher CH, GUBLER DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.*, 1992; 30(3):545–551.
20. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985; 22:250–254.

21. Castanha PMS, Cordeiro MT, Martelli CMT, Souza WV, Marques ETA, Braga C. Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. *Epidemiol Infect* 2012; 141:1080-1088.
22. Laille M, Deubel V, Sainte-Marie FF. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1991; 34:51–54.
23. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Waterman SH. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34:170–173.
24. Loroño-Pino MA, Cropp CB, Farfán JA, Vorndam AV, Rodríguez-Angulo EM, Rosado-Paredes EP, et al. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:725–730.
25. VinodKumar CS, Kalapannavar NK, Basavarajappa KG, Sanjay D, Gowli C, Nadig NG, et al. Episode of coexisting infections with multiple dengue virus serotypes in central Karnataka, India. *J Infect Public Health* 2013; 6:302–306.
26. Santos CSL, Bastos MAA, Sallum MAM, Rocco IM. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45:11–16.
27. Araújo FMDC, Nogueira RMR, Araújo JMG, Ramalho ILC, Roriz MLFDS, Melo MEL De, et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:925–928.

28. Figueiredo RMP de, Naveca FG, Oliveira CM, Bastos M de S, Mourão MPG, Viana S de S, et al. Co-infection of Dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011; 53:321–323.
29. Salje H, Rodríguez-Barraquer I, Rainwater-Lovett K, Nisalak A, Thaisomboonsuk B, Thomas SJ, et al. Variability in dengue titer estimates from plaque reduction neutralization tests poses a challenge to epidemiological studies and vaccine development. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8:e2952.
30. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81:825–833.
31. Rainwater Lovett K, Rodriguez-Barraquer I, Cummings DA, Lessler J. Variation in dengue virus plaque reduction neutralization testing: systematic review and pooled analysis. *BMC Infect Dis* 2012;12:233.
32. Corbett KS, Katzelnick L, Tissera H, Amerasinghe A, Silva AD, Silva AM. Preexisting neutralizing antibody responses distinguish clinically inapparent and apparent dengue virus infections in a Sri Lankan pediatric cohort. *J Infect Dis* 2015; 211:590-599
33. van Panhuis WG, Gibbons RV, Endy TP, Rothman AL, Srikiatkachorn A, Nisalak A, et al. Inferring the serotype associated with dengue virus infections on the basis of pre- and postinfection neutralizing antibody titers. *J Infect Dis* 2010; 202:1002–1010.
34. Guzmán MG, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004;8:69–80.

35. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control 2nd ed. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 1997 :1–58. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>. Accessed 15 November 2014.

Figures

Figure 1. Neutralizing antibody response defined by PRNT₅₀ to DENV-1 to 4 by age groups.

Figure 2: Representation of reciprocal PRNT₅₀ titers in acute (A) and convalescent (C) sera. Neutralizing Abs titers to DENV-4 among paired samples (*t test* $p < 0,001$).

Figure 3. Graphical representation PRNT₅₀ titers paired sera among patients infected by DENV-1 or DENV-4. **Legend:** PRNT₅₀ titers (log10) in paired sera stratified for acute (A) or convalescent (C) phase of disease among patients infected by DENV-1 or DENV-4 determined by RT-PCR. (A) 10 patients infected by DENV-1; (B) 14 patients infected by DENV-4. Line represents mean.

Tables

Table 1. Characteristics of dengue patients by disease severity during outbreak in central Brazil.

Characteristics	Severe dengue ^a n=40	Dengue n=20	<i>p</i> ^b
Age, mean SD, years	33.6 ±18.5	47.05 ± 20.5	<0.001
Sex, ratio of females to males	2.1:1.0	0.8:1.0	
Educational level, years ^c (%)			
≤8	17 (51.5)	7 (41.2)	0.49
> 8	16 (48.5)	10 (58.8)	
Race ^d , (%)			
White	18 (48.7)	7 (36.8)	0.46
Mixed/Black	19 (51.3)	12 (63.2)	
Hospitalization, (%)	20 (50.0)	3 (15.0)	<0.01
Hemorrhagic manifestation, (%)	36 (90.0)	6 ^e (30.0)	<0.01
Platelet count nadir, platelets/mm ^{3f}			
> 100	16 (40.0)	15 (75.0)	0.02
> 50 to ≤ 100	18 (45.0)	5 (25.0)	
≤ 50	6 (15.0)	-	
Hematocrit increase, (%)			
< 10	32 (80.0)	13 (65.0)	0.35
≥ 10	8 (20.0)	7 (35.0)	
Albumin, (%)			
< 3.5 – low values	19 (47.5)	4 (20.0)	0.04
3.5-5.5 – normal values	21 (52.5)	16 (80.0)	
AST, (%)			
< 50 – normal values	13 (32.5)	12 (60.0)	0.04
≥ 50 – high values	27 (67.5)	8 (40.0)	
ALT, (%)			
< 41 – normal values	18 (45.0)	11 (55.0)	0.46
≥ 41 – high values	22 (55.0)	9 (45.0)	

NOTE. - Data are the no. (%) of subjects, unless otherwise indicated; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Platelet count nadir was defined as the lowest platelet value obtained.

^aClinically classified as dengue with warning signs or severe dengue.

^b χ^2 test was used for categorical variables.

^cData were missing for seven severe dengue cases and three dengue cases.

^dData were missing for three severe dengue cases and one dengue case.

^ePositive tourniquet test as the only hemorrhagic manifestation.

^fThe platelet count nadir was defined as the lowest platelet value obtained.

Table 2. Characteristics of serotype-specific neutralizing antibody response by PRNT₅₀ of the dengue patients stratified by dengue severity.

Characteristics	Severe dengue ^a n=40	Dengue n=20
Antibody response		
Monotypic, (%)	6 (15.0)	3 (15.0)
DENV-1	2	1
DENV-2	-	2
DENV-3	-	-
DENV-4	4	-
Multitypic dual, (%)	11 (27.5)	4 (20.0)
DENV-1/DENV-2	4	-
DENV-1/DENV-3	-	1
DENV-1/DENV-4	1	-
DENV-2/DENV-4	1	3
DENV-3/DENV-4	5	-
Multitypic three or more, (%)	23 (57.5)	13 (65.0)
DENV-1/DENV-2/DENV-3	3	3
DENV-1/DENV-2/DENV-4	4	1
DENV-1/DENV-3/DENV-4	5	-
DENV-2/DENV-3/DENV-4	2	2
DENV-1/DENV-2/DENV-3/DENV-4	9	7

Additional files:

*Supplementary_table_PRNT_DENGUE_25.08.16, *Individual data of patients according to specific dengue tests, serotype-specific reciprocal PRNT₅₀ titers and clinical classification, during 2012-2013 outbreak in central Brazil, *Individual data of 60 patients according to PRNT₅₀ titers and clinical classification, during 2012-2013 outbreak in central Brazil.

*Supplementary_figure_PRNT_DENGUE_25.08.16, *Difference between PRNT₅₀ titers paired samples. Boxes encompass 50% of the distribution; line represents median, * Difference between PRNT₅₀ titers among paired samples related to DENV-1 to 4.

Supplementary table. Individual data of patients according to specific dengue tests, serotype-specific reciprocal PRNT₅₀ titers and clinical classification, during 2012-2013 outbreak in central Brazil.

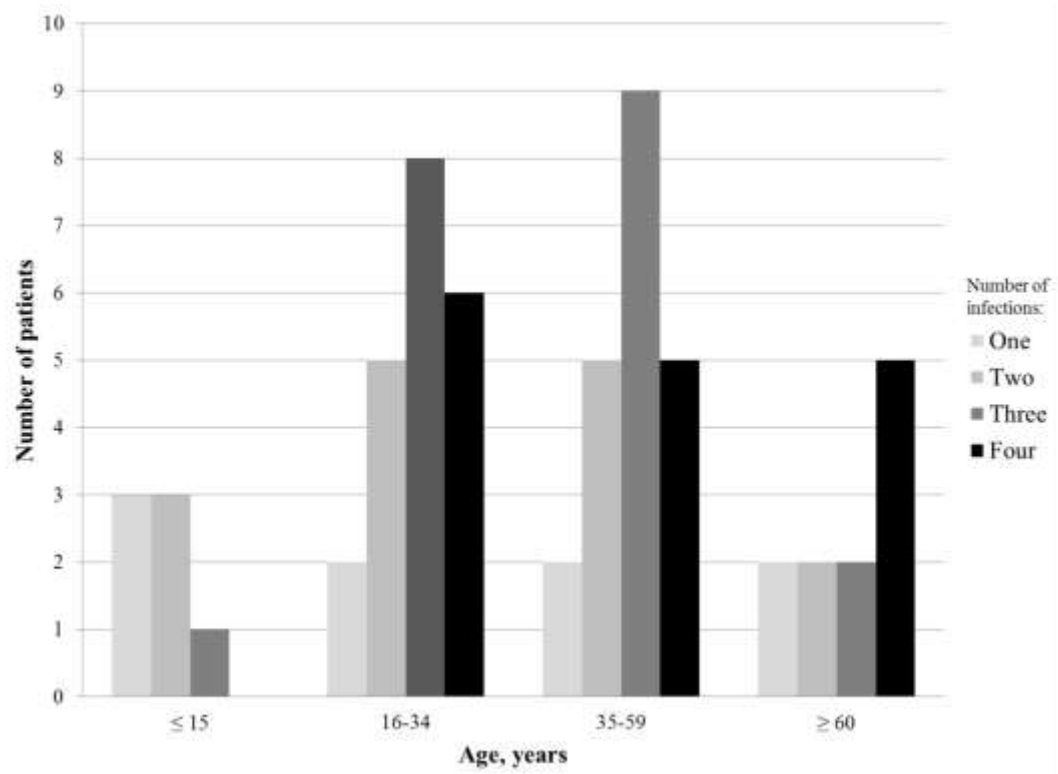
No.	Age (years)	Sample (days) ^a	RT-PCR	NS1 Ag	IgM	IgG	Reciprocal PRNT ₅₀ titers ^b				Clinical Type
							DV-1	DV-2	DV-3	DV-4	
1	3	S1 (5)	ND	-	+	+	10	10	10	320	Severe
		S2 (17)					10	10	10	2560	
2	9	S1 (6)	ND	-	+	+	10	10	80	320	Severe
		S3 (19)					10	10	160	2560	
3	10	S1 (3)	ND	+	-	-	10	10	10	10	Severe
		S2 (37)				+	10	10	10	160	
4	11	S1 (5)	ND	-	+	+	10	10	320	80	Severe
		S2 (10)					10	10	320	80	
5	11	S1 (2)	DV-1	+	-	-	10	10	10	10	Dengue
		S2 (9)				+	10 ^c	20	10	10	
6	13	S1 (7)	ND	-	+	+	10	320	1280	1280	Severe
		S2 (13)					10	320	1280	≥2560	
7	15	S1 (1)	DV-1	+	I	+	10	80	10	80	Dengue
		S2 (9)					10 ^d	160	10	160	
8	16	S1 (7)	ND	-	+	+	320	320	1280	1280	Severe
		S2 (25)					2560	320	1280	1280	
9	16	S1 (4)	ND	+	+	+	10	80	320	80	Severe
		S2 (13)					10	160	640	2560	
10	16	S1 (5)	DV-1	+	+	+	20	320	10	10	Severe
		S2 (39)					160	640	10	10	
11	19	S1 (4)	ND	-	+	+	80	20	10	320	Severe
		S2 (14)					160	160	10	640	
12	19	S1 (6)	DV-4	+	+	+	320	320	160	80	Dengue
		S2 (10)					320	640	320	640	
13	20	S1 (6)	ND	-	+	+	320	160	320	1280	Severe
		S2 (18)					320	160	2560	1280	
14	20	S1 (6)	ND	+	+	+	1280	1280	20	80	Severe
		S2 (8)					2560	2560	40	640	
15	20	S1 (2)	ND	+	-	-	10	10	10	10	Severe
		S2 (44)				+	10	10	10	40	
16	21	S1 (4)	ND	+	-	+	80	640	80	10	Severe
		S2 (14)					320	640	160	10	
17	23	S1 (6)	ND	+	+	+	10	10	320	10	Severe
		S2 (24)					10	10	320	160	
18	23	S1 (4)	DV-1	-	I	+	80	80	320	10	Severe
		S2 (19)					640	80	640	10	
19	23	S1 (2)	DV-4	-	-	-	10	10	10	10	Severe
		S2 (21)				+	10	10	10	160	

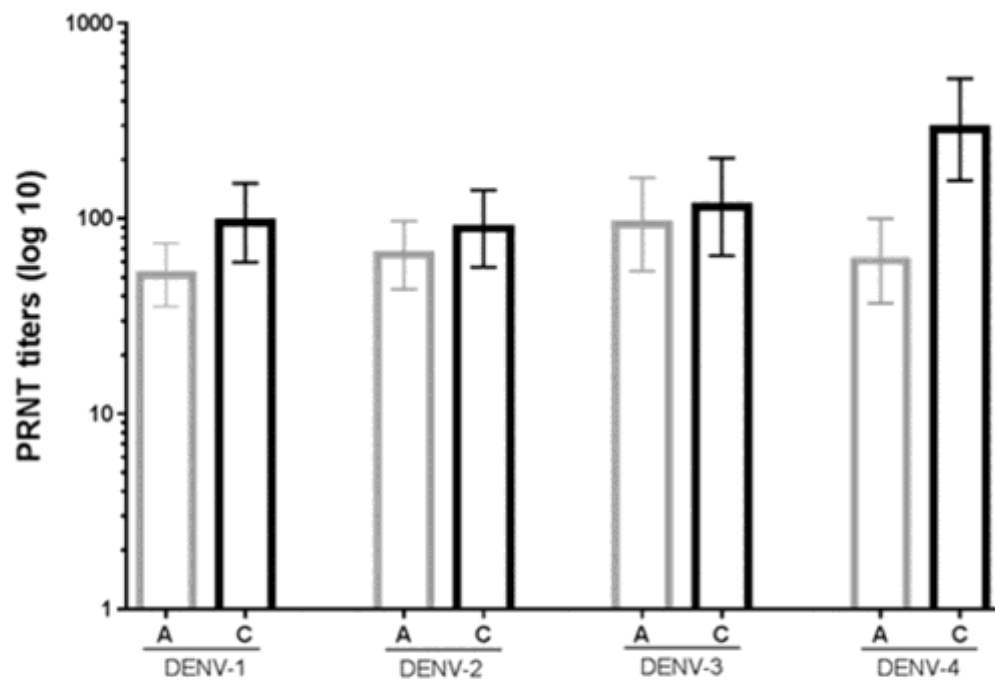
20	23	S1 (3)	ND	+	+	+	20	10	1280	320	Severe
		S2 (10)					40	10	1280	2560	
21	23	S1 (3)	DV-4	-	+	+	10	80	1280	320	Dengue
		S2 (28)					10	160	1280	2560	
22	26	S1 (2)	DV-1	+	-	+	80	80	20	20	Dengue
		S2 (21)					640	80	20	40	
23	28	S1 (5)	ND	+	+	+	80	320	10	10	Severe
		S2 (28)					640	640	10	10	
24	28	S1 (5)	DV-4	+	+	+	80	80	10	10	Severe
		S2 (31)					80	80	10	640	
25	32	S1 (4)	ND	+	+	+	80	10	10	80	Severe
		S2 (19)					160	10	10	2560	
26	32	S1 (5)	ND	+	+	+	320	10	320	20	Severe
		S2 (26)					640	10	640	640	
27	33	S1 (5)	ND	+	+	+	80	320	10	10	Severe
		S2 (21)					320	640	10	10	
28	33	S1 (3)	DV-4	+	+	+	10	80	10	10	Dengue
		S2 (20)					10	80	10	160	
29	34	S1 (4)	DV-4	+	+	+	80	320	1280	1280	Severe
		S2 (23)					160	320	1280	≥2560	
30	37	S1 (4)	ND	+	I	+	20	10	10	10	Severe
		S2 (7)					20	10	10	10	
31	39	S1 (4)	ND	+	+	+	80	80	1280	1280	Dengue
		S2 (31)					80	640	1280	1280	
32	41	S1 (4)	ND	+	-	+	40	80	320	10	Dengue
		S2 (23)					160	160	640	10	
33	42	S1 (9)	ND	-	+	+	80	10	1280	160	Severe
		S2(23)					80	10	1280	2560	
34	43	S1 (4)	DV-1	+	+	+	80	80^e	10	10	Severe
		S2 (12)					2560	2560	10	10	
35	43	S1 (2)	DV-4	+	-	-	10	80	10	10	Severe
		S2 (29)				+	10	80	10	640	
36	44	S1 (2)	ND	-	+	+	160	80	20	10	Dengue
		S2 (21)					160	80	40	10	
37	45	S1 (5)	DV-4	-	+	+	10	80	1280	320	Dengue
		S2 (30)					10	160	2560	1280	
38	47	S1 (1)	ND	-	I	+	20	20	1280	10	Dengue
		S2 (12)			+		80	40	1280	10	
39	47	S1 (7)	ND	+	+	+	640	640	1280	10	Severe
		S2 (9)					640	640	1280	10	
40	48	S1 (3)	DV-1	+	+	+	160	10	40	160	Severe
		S2 (10)					640	10	40	160	
41	48	S1 (6)	DV-4	-	+	+	320	320	1280	1280	Severe
		S2 (23)					640	320	1280	≥2560	
42	49	S1 (5)	ND	-	I	+	320	10	10	10	Severe
		S2 (21)			+		640	10	10	10	

43	50	S1 (5)	ND	-	+	+	80	320	1280	2560	Severe
		S2 (22)					320	640	1280	2560	
44	54	S1 (7)	ND	-	+	+	640	80	1280	20	Severe
		S2 (22)					640	80	1280	640	
45	55	S1 (4)	DV-4	+	+	+	10	80	10	80	Dengue
		S2 (31)					10	80	10	2560	
46	56	S1 (4)	ND	-	+	+	80	320	10	80	Severe
		S2 (25)					160	320	10	2560	
47	56	S1 (2)	DV-4	+	-	+	20	10	20	10	Severe
		S2 (23)					40	10	40	2560	
48	57	S1 (6)	DV-1	+	+	+	20	10	20	10	Dengue
		S2 (19)					160	10	40	10	
49	57	S1 (9)	ND	-	+	+	320	640	1280	1280	Dengue
		S2 (37)					320	640	1280	≥2560	
50	60	S1 (3)	DV-4	+	-	+	10	10	1280	10	Severe
		S2 (13)					10	10	1280	640	
51	62	S1 (3)	DV-1	+	-	-	20	10	10	10	Dengue
		S2 (13)				+	160	10	10	10	
52	63	S1 (5)	DV-1	-	+	+	80	320	10	1280	Dengue
		S2 (9)					640	640	10	1280	
53	65	S1 (2)	DV-4	+	I	+	10	10	640	10	Severe
		S2 (27)					10	10	640	640	
54	66	S1 (5)	ND	-	+	+	320	320	10	640	Severe
		S2 (21)					640	640	10	≥2560	
55	71	S1 (7)	ND	-	+	+	320	320	160	160	Severe
		S2 (28)					320	320	160	2560	
56	71	S1 (9)	ND	+	-	+	10	80	10	10	Dengue
		S2 (23)					10	80	10	10	
57	76	S1 (3)	DV-4	+	I	+	80	320	320	10	Dengue
		S2 (25)					80	320	640	640	
58	78	S1 (5)	ND	-	+	+	80	40	1280	320	Dengue
		S2 (28)					80	40	1280	2560	
59	79	S1 (7)	ND	-	+	+	320	320	1280	640	Dengue
		S2 (27)					640	640	1280	≥2560	
60	81	S1 (5)	ND	-	+	+	320	640	1280	640	Severe
		S2 (21)					320	640	1280	2560	

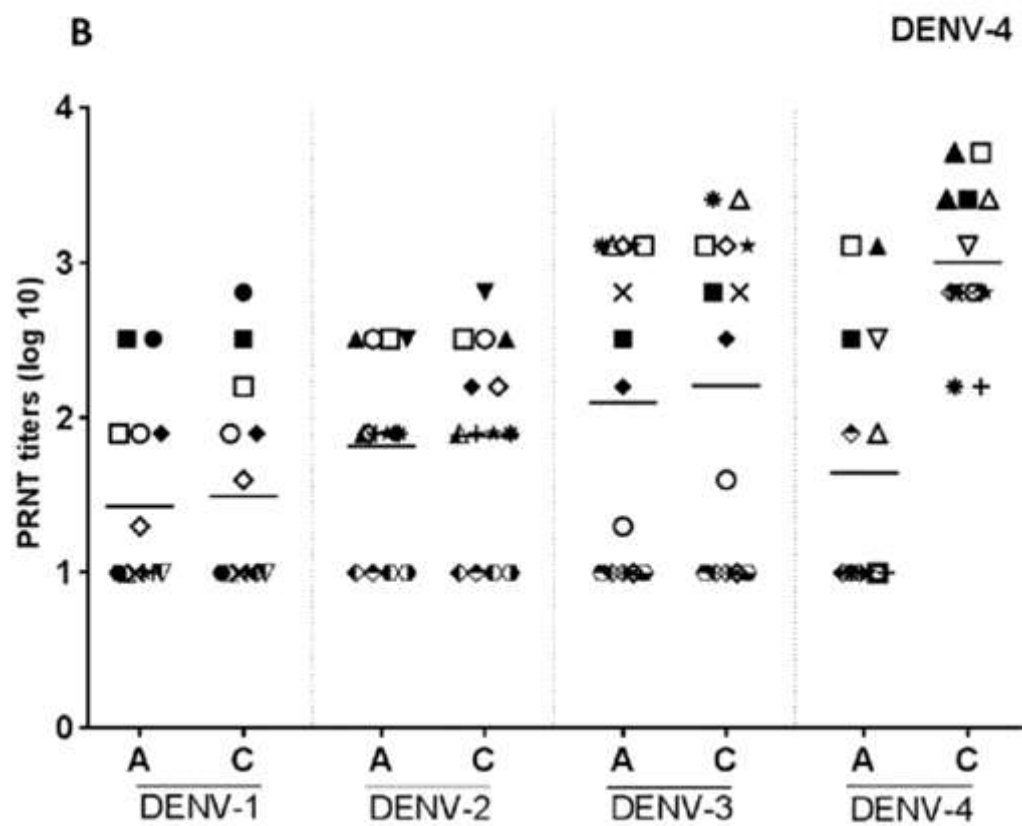
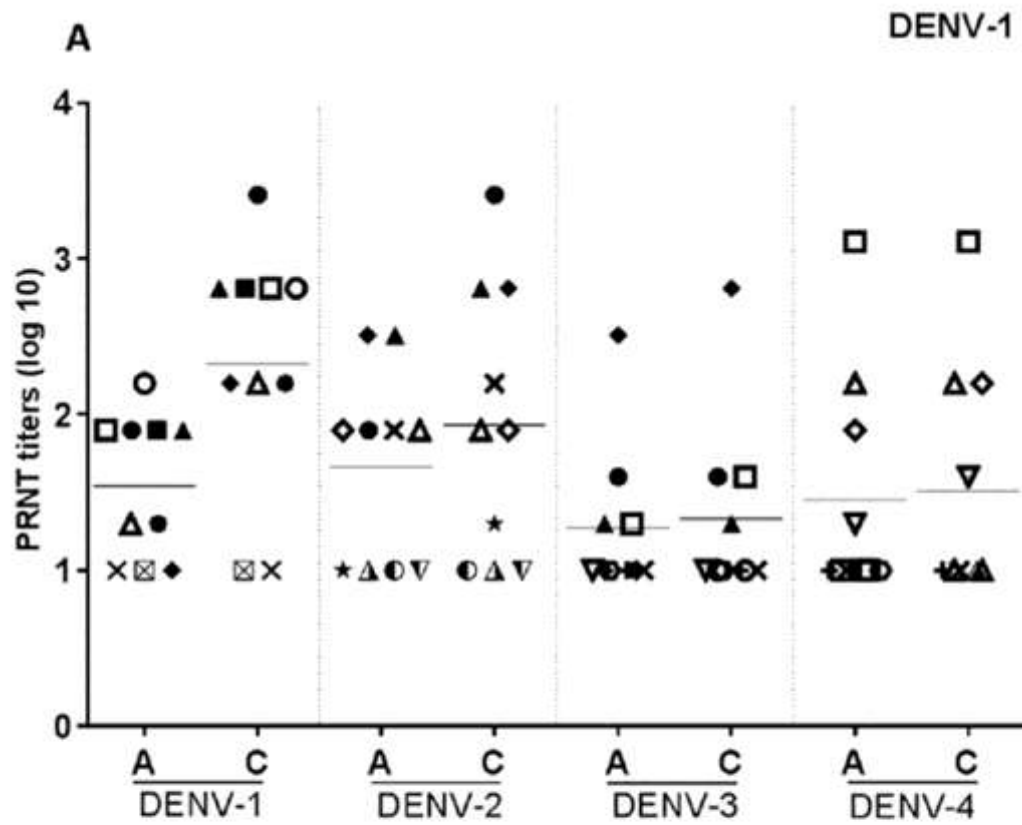
No: number of patient; S1: acute sample; S2: convalescent sample; DV-1: dengue virus 1; DV-2: dengue virus 2; DV-3: dengue virus 3; DV-4: dengue virus 4; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction; NS1Ag: nonstructural 1 antigen; IgM: Immunoglobulin M; IgG: Immunoglobulin G; ND: non detectable. I: inconclusive; Severe includes dengue with warning signs and severe dengue cases; Dengue: dengue fever.

^aNumbers in brackets indicate days of onset of symptoms. ^bNumbers in bold indicate seroconversion determined by at least fourfold increase in titer of neutralizing antibody.





Sample collection	DENV-1(n=41) GMT (95%C.I.)	DENV-2 (n=41) GMT (95%C.I.)	DENV-3(n=37) GMT (95%C.I.)	DENV-4(n=44) GMT (95%C.I.)
Acute	51.57 (35.48-74.13)	64.98 (42.65-95.49)	92.96 (52.48-158.48)	60.63 (36.30-97.72)
Convalescent	95.12 (58.88-151.35)	87.09 (56.23-138.03)	112.20 (63.09-199.52)	281.83 (154.88-512.86)



REFERÊNCIAS

- ABBAS A. K., LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Citocinas. In: **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro-RJ: ELSEVIER, 2012. p. 251-282.
- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Propriedades gerais das respostas imunes. In: **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro-RJ: ELSEVIER, 2012. p. 1–14.
- ABUBAKAR, S., WONG, P., CHANG, Y. Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia. **Journal of general virology**, v.83, n. 10, p. 2437-2442, 2002.
- ACIOLI-SANTOS, B. et al. Gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Human immunology**, v. 69, n. 2, p. 122–128, 2008.
- AKKINA, R. New generation humanized mice for virus research: comparative aspects and future prospects. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 14-28, 2013.
- ALVES, M. J. et al. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. **Euro surveill**, v. 18, n. 6, 2013.
- AÑEZ, G.; MORALES-BETOULLE, M.E.; RIOS, M. Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27459, 2011.
- ARAUJO, J. M.G. et al. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 9, p. e1784, 2012.
- AVIRUTNAN, P. et al. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. **The journal of immunology**, v. 161, n. 11, p. 6338-6346, 1998.
- BARRETO, M.L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **The Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, 2011.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.
- BARTENSCHLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future microbiology**, v. 3, p. 155–165, 2008.
- BHARAJ, P. et al. Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. **Virology Journal**, v. 5, p.1-5, 2008.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504–7, 2013.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, p. 279–293, 2007.

BRASIL. **Manual de dengue: Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente**. In: Ministério da Saúde. Fundação nacional de saúde. 2ed., Brasília-DF, 1996.

_____. **Dengue: boletim da semana 51/2003**. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília-DF, Brasil, 2003.

_____. **Informe epidemiológico da Dengue: Janeiro a Dezembro de 2007**. In: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília-DF, Brasil, 2008. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf

_____. **Informe epidemiológico da Dengue: Janeiro a Novembro de 2008**. In: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília-DF, Brasil, 2008.

_____. **Informe Epidemiológico da dengue: análise de Situação e Tendências, 2010**. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília-DF, Brasil, 2010a.

_____. **Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde, Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010, Editora MS, Brasília - DF, p. 157-171, 2010b.

_____. **Nota técnica n.33/2011- Isolamento do sorotipo DENV4 em Manaus/AM**. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília-DF, 2011a.

_____. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adultos e crianças**. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão, 4 ed., Editora MS, Brasília-DF, p.1-21, 2011b.

_____. **Saúde Brasil 2013: uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza**. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da saúde, 2014

BOZZA, F.A. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-I beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 86, 2008.

BRITO, C.; BRITO, R. M.; GOMES, R. F. Dengue e febre hemorrágica da dengue. In: FILGUEIRA, N. A. et al. *Condutas em clínica médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2004. p. 610-614.

BRITO, C.A.A; ALBUQUERQUE, M.F.M.P.; LUCENA-SILVA, N. Evidência de alterações de permeabilidade vascular na dengue: quando a dosagem de albumina sérica define o quadro. **Rev Soc Bras Med Tropical**, v. 40, n. 2, p. 22, 2007.

BURKE, D.S.; NISALAK, A.; USSERY, M.A. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. **Journal of clinical microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1034-1042, 1982.

BURKE, D. S.; MONATH, T. . Flavivirus: The viruses and their replication. In: FIELDS, B.; KNIPE, D.; HOWLEY, P. (Eds.). **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2002.

BUSTOS, J. et al. Serologically proven acute rubella infection in patients with clinical diagnosis of dengue. **Epidemiology and infection**, v. 104, n. 02, p. 297-302, 1990.

BUTTHEP, P. et al. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 31, n. 12, p. e232–8, 2012.

CAPEDING, M.R., et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1358-1365, 2014.

CASTANHA, P. M. S. **Anticorpos antidengue sorotipo específico em um estudo de base populacional realizado em Recife, Pernambuco**. 2011. 73f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

CASTANHA, P. M. S et al. Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. **Epidemiology and infection**, v. 141, n. 05, p. 1080-1088, 2012.

CEDILLO-BARRON, L. et al. Antibody response to dengue virus. **Microbes and infection**, v.16, p. 711-720, 2014.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual review of microbiology**, v. 44, p. 649–688, 1990.

CHANAMA, S. et al. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, n. 3, p. 185-189, 2004.

CHANG, G. Molecular biology of dengue virus. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York-NY: CAB International, 1997. p. 175–197.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

COFFEY, L. L. et al. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and infection**, v. 11, n. 2, p. 143-156, 2009.

CORBETT, K.S. et al. Preexisting neutralizing antibody responses distinguish clinically inapparent and apparent dengue virus infections in a sri lankan pediatric cohort. **The Journal of infectious diseases**, p. jiu481, 2014.

CORDEIRO, M.T. et al. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 6, p. 1128-1134, 2007.

CORDEIRO, M. T. Laboratory diagnosis for dengue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 18, p. S10–S12, 2012.

CUNHA, M. D. C. M. et al. Fatores associados à infecção pelo vírus dengue no município de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, Brasil: características individuais e diferenças intra-urbanas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 3, p. 217–230, 2008.

DEPARIS, X., et al. Changing clinical and biological manifestations of dengue during the dengue-2 epidemic in French Polynesia in 1996/97- description and analysis in a prospective study. **Tropical Medicine International Health**, v. 3, n. 11, p. 859-865, 1998.

DUTRA, N. R. et al. The laboratorial diagnosis of dengue: applications and implications. **Journal of global infectious diseases**, v. 1, n. 1, p. 38–44, 2009.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. **Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe**. Stockholm: ECDC; 2012. Disponível em: www.ecdc.europa.eu

ENDY, T.P. et al. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American journal of epidemiology**, v. 156, n. 1, p. 52-59, 2002.

ENDY, T.P. et al. Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **PLoS neglected tropical diseases**, v.5, n. 3, p. e975, 2011.

ENDY, T.P. et al. Human immune responses to dengue virus infection: lessons learned from prospective cohort studies. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.

FALCONAR, A. K. I. 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. **Archives of virology**, v. 142, n. 5, p. 897–916, 1997.

FALGOUT, B.; MILLER, R. H.; LAI, C. J. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. **Journal of virology**, v. 67, n. 4, p. 2034-2042, 1993.

FÉRES, V. C. R. **Vigilância laboratorial da infecção pelos vírus dengue em Goiânia, 2002-2003: caracterização molecular de amostras virais positivas**. 2004 82f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 2004.

FÉRES, V. C. R. et al. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. **Journal of clinical virology**, v. 37, n. 3, p. 179-183, 2006.

FIGUEIREDO, R. M. P. DE et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 4, p. 667, 2008.

FIGUEIREDO, L. T. M. The brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.

FINOTTI, A. **Sorotipos circulantes dos vírus dengue em inquérito sorológico de base populacional na cidade de Goiânia-Goiás em 2002**. 2002. 75f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 2005.

FLIPSE, J., WILSCHUT, J., SMIT, J.M. Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. **Traffic**, v. 14, p.25-35, 2013.

GIBBONS, R.V., et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, p. 910-913, 2007.

GOIÂNIA. Secretaria Municipal de Saúde. Diretoria de Vigilância em Saúde. Departamento de Epidemiologia de Doenças Transmissíveis. **Informe Técnico Semanal de Dengue**. Ed n. 226. Goiânia: SMS 2013. Disponível em: <www.saude.goiania.go.gov.br/docs.divulgacao/Informedengue02012014SE52.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2014.

GOIÁS. Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Vigilância em Saúde. Gerência de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmissíveis. **Boletim Semanal de Dengue - Goiás 2013**. Goiânia: SUVISA/SES, 2013. Disponível em: <www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_850_RelatorioABoletimASemanalA-ASEA21.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2014.

GONÇALVEZ, A.P. et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Virology**, v.303, n. 1, p. 110-119, 2002.

GRAHAM, R.R., et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, p. 412-419, 1999.

GREGORY, C.J., et al. Clinical and laboratory features that differentiate dengue from other febrile illnesses in an endemic area - Puerto Rico, 2007-2008. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 5, p. 922-929, 2010.

GUBLER, D. J. et al. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 1, p. 170-173, 1985.

GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984.

_____. Dengue. In: MONATH, T. P. (Ed.). **Epidemiology of Arthropod-Borne Viral Diseases**. Boca Raton-FL: CRC Press Inc., p.223-260, 1988.

_____. Epidemic Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever : a global public health problem in the 21st Century. **Dengue Bulletin**, v. 21, p. 1–14, 1997a.

_____. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York-NY: CAB International, p. 1–22, 1997b.

_____. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

_____. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002a.

_____. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002b.

_____. Dengue and dengue hemorrhagic fever. : its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York-NY: CAB International, p. 1–22, 2014.

GUILARDE, A.O. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes and antibody response. **Journal of infectious diseases**, v. 197, n.6, p. 817-824, 2008.

GUNTHER, V.J. et al. A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. **Vaccine**, v. 29, n.22, p. 3895-3904, 2011.

GUZMAN, M. G. et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 130-135, 1999.

GUZMAN, M. G. et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 8, p. e811, 2010.

GUZMAN, M.G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S7-S16, 2010.

GUZMÁN, M. G.; GARCÍA, G.; KOURÍ, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 19, p. 204–215, 2006.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2003.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International journal of infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

GUZMAN, M.G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S.B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Archives of virology**, v. 158, n. 7, p. 1445-1459, 2013.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 119-130, 2006.

HALSTEAD, S. B.; ROJANASUPHOT, S.; SANGKAWIBHA, N. Original antigenic sin in dengue. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 32, n. 1, p. 154-156, 1983.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S.B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ?. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 20, n. 6, p. 407-415, 2006.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **The Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 3407, p. 1102-1103, 1960.

HARRIS, E. et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 63, n. 1, p. 5-11, 2000.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 450-455, 2001.

HENCHAL, E. A. et al. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 31, n. 4, p. 830–836, 1982.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HUNSPERGER, E.A. et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. 436, 2009.

HUNSPERGER, E.A. et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus ns1 antigen and anti-dengue virus igm antibody. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3171, 2014.

INNIS, B. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 418-427, 1989.

IBGE. **Séries estatísticas** [homepage on the Internet]: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2014. Disponível em:
<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=CD90&t=populacao-recenseada-residente-e-presente>.

ICTVdB. **The Universal Virus Database**, version 4. The international Committee on the Taxonomy of Viruses, 2013. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **The Journal of general virology**, v. 40, p. 531-544, 1978.

JAIN, A.; CHATURVEDI, U. C. Dengue in infants: an overview. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 59, p. 119-130, 2010.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, p. 4977-4983, 2005.

KAO, C.-L. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of microbiology, immunology and infection**, v. 38, p. 5-16, 2005.

KURANE, E. F. A. Immunopathogenesis of dengue virus infections. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York-NY: CAB International, 1997. p. 273-290.

KURANE, I. et al. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. **Archives of virology**, v. 9, p. 59-64, 1994.

KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in medical virology**, v. 11, n. 5, p. 301-11, 2001.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, p. 329-340, 2007.

LAILLE, M; DEUBEL, V.; SINTE-MARIE, F.F. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction. **Journal of medical virology**, v. 34, n.1, p. 51-54, 1991.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, p. 545–551, 1992.

LANCIOTTI, R. S. et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 65-76, 1994.

LANCIOTTI, R. S., GUBLER, D.J., TRENT, D.W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, v.78, p.2279-2284, 1997.

LEI, H. Y. et al. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **Journal of biomedical science**, v. 8, p. 377–388, 2001.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73, p. 4738–4747, 1999.

LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, p. 1165–1168, 2002.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 7th. ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2007. p. 1101–1152.

LOROÑO-PINO, M.A. et al.: Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n.5, p. 725-730, 1999.

MACIEL, I. J.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 111–130, 2008.

MAKINO, Y. et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. **Microbiology and immunology**, v. 38, p. 951-955, 1994

MALAVIGE, G. N. et al. Dengue viral infections. **Postgraduate medical journal**, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4⁺ T cells to heterologous serotypes. **Journal of immunology**, v. 175, p. 2676–2683, 2005.

MANEEKARN, N. et al. Applications of polymerase chain reaction for identification of dengue viruses isolated from patient sera. **Microbiology and immunology**, v. 37, n.1, p. 41-47, 1993.

MAZZON, M. et al. Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, p. 1261–1270, 2009.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, p. 921–927, 2003.

MONTOYA, M., et al. Symptomatic versus inapparent outcome in repeat dengue virus infections is influenced by the time interval between infections and study year. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, p. e2357, 2013.

MORENS, D. M. et al. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. **Journal of clinical microbiology**, v. 22, p. 250–254, 1985.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 13–22, 2005.

NAVARRETE-ESPINOSA, J. et al. Clinical profile of dengue hemorrhagic fever cases in Mexico. **Salud pública de México**, v. 47, n. 3, p. 193–200, 2005.

NOBLE, C. G. et al. Strategies for development of dengue virus inhibitors. **Antiviral Research**, v.85, n.3, p. 450-462, 2010.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, 1990.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue Haemorrhagic Fever / Dengue Shock Syndrome (DHF / DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 269–269, 1991.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 297–304, 1999a.

NOGUEIRA, R. M. . et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 925–926, 2001.

NOGUEIRA, R.M. et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infect Disease**, v. 11, p. 1376-1381, 2005.

NOISAKRAN, S.; PERNG, G. C. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. **Experimental biology and medicine**, v. 233, p. 401–408, 2008.

OLKOWSKI, S., et al. Reduced risk of disease during postsecondary dengue virus infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, p.1026–1033, 2013

OSANAI, C. H. et al. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 25, p. 53–54, 1983.

PAHO. **Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control.** In: World Health Organization, Pan American Health Organization, (Scientific publication; n.548), 1994.

_____. **Number of reported cases of dengue and severe dengue SD in the Americas, by country: figures for 2013 (to week noted by each country).** Pan American Health Organization, 2013. Disponível em:
<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>

PASTOR, A.F. et al. Complement factor H gene (CFH) polymorphisms C-257T, G257A and haplotypes are associated with protection against severe dengue phenotype, possible related with high CFH expression. **Human Immunology**, n.74, p. 1225–1230, 2013.

PÉREZ, A. B. et al. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. **Journal of medical virology**, v. 73, p. 230–234, 2004.

PÉREZ, A. B. et al. Tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human immunology**, v. 71, n. 11, p. 1135–40, nov. 2010.

PESSANHA, J.E.M., CAIAFFA, W.T., KROON, E.G., PROIETTI, F.A. Dengue fever in three sanitary districts in the city of Belo Horizonte, Brazil: a population-based seroepidemiological survey, 2006 to 2007. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 27, p. 252-258, 2010.

PINHEIRO, F.P., CORBER, S.J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. **World Health Stat Q**, v.50, p.161-169, 1997

PUTNAK, J. R. et al. Comparative evaluation of three assays for measurement of dengue virus neutralizing antibodies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, p. 115–122, 2008.

RAINWATER LOVETT, K. et al. Variation in dengue virus plaque reduction neutralization testing: systematic review and pooled analysis. **BMC Infectious Diseases**, v.12, p.1-15, 2012.

RATHAKRISHNAN, A. et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52215, jan. 2012.

REICH, N.G., et al. Interactions between serotypes of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. **Journal of the Royal Society Interface** 2013; 10.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, p. 479-493, 1990.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, p. 244-251, 1997.

- RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 315–341, 2003.
- RICO-HESSE, R. Dengue virus evolution and virulence models. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1462–1466, 2007.
- RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria-RS: UFSM, 2007. p. 565–591.
- ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B.; SANTOS, C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 55–57, 2001.
- RODRIGO, W. W. S. I. et al. Dengue virus neutralization is modulated by IgG antibody subclass and Fcγ receptor subtype. **Virology**, v. 394, p. 175–182, 2009.
- ROEHIG, J. Imunochemistry of dengue viruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York-NY: CAB International, 1997. p. 199–214.
- ROEHRIG, John T. Antigenic structure of flavivirus proteins. **Advances in virus research**, v. 59, p. 141-175, 2003.
- ROEHRIG, J. T.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. D. T. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. **Viral immunology**, v. 21, p. 123–132, 2008.
- ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 26, p. 337–343, 1977.
- ROTHMAN A. L., ENNIS F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 257, n.1, p:1-6, 1999.
- ROTHMAN, A.L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 946–951, 2004.
- RUSSELL, P. K. et al. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. **Journal of immunology**, v. 99, p. 285–290, 1967.
- RUSSELL, P. K.; UDOMSAKDI, S.; HALSTEAD, S. B. Antibody response in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Japanese journal of medical science & biology**, v. 20, p. 103–108, 1967.
- SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1, p. 30–50, 1952.
- SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. PRODUCTION OF IMMUNITY TO DENGUE WITH VIRUS MODIFIED BY PROPAGATION IN MICE. **Science**, v. 101, p. 640–642, 1945.

SALJE, H. et al. Variability in dengue titer estimates from plaque reduction neutralization tests poses a challenge to epidemiological studies and vaccine development. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, p. e2952, 2014.

SÁNCHEZ-BURGOS, G. G. et al. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra los serotipos del virus dengue en universitarios de Tabasco, México. **Salud Pública de México**, v.50, p.362-366, 2008.

SANTOS, F.B. et al. A review on dengue diagnosis and epidemiology by a regional reference laboratory from 1986 to 2011, Rio de Janeiro, Brazil. **Dengue Bulletin**. World Health Organization, p. 61–76, 2013.

SCHATZMAYR, H. G. Emerging and reemerging viral diseases. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 209–213, 2001.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. DA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.245-246, 1986.

SHEPARD, D. S. et al. Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine. **Vaccine**, v. 22, n. 9-10, p. 1275–80, 12 mar. 2004.

SHU, P. ET AL. Potential Application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G Enzyme-linked Immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of plaque reduction neutralization test. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1840–1844, 2002.

SIERRA, B. et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: Advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. **Human Immunology**, v. 68, p. 531–540, 2007.

SIERRA, B. et al. Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? **Cellular Immunology**, v. 262, p. 134–140, 2010.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1423–32, 2012.

SIQUEIRA, J. B. et al. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, p. 646–651, 2004.

SIQUEIRA, J.B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 48, 2005.

SIQUEIRA-JUNIOR, J. B. et al. Spatial point analysis based on dengue surveys at household level in central Brazil. **BMC public health**, v. 8, p. 361, 2008.

SONG, K. Y. et al. A novel reporter system for neutralizing and enhancing antibody assay against dengue virus. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 44, p. 1–8, 2014.

SRIKIATKHACHORN, A. et al. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever. **Journal of virology**, v. 81, n. 4, p. 1592–600, fev. 2007.

SUAYA, J. A. et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, p. 846–855, 2009.

TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, p. 895-907, 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. S7–S18, 2009.

TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, p. e2520, 2013.

TELES, F. R. R.; PRAZERES, D. M. F.; LIMA-FILHO, J. L. Trends in dengue diagnosis. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, p. 287–302, 2005.

THOMAS, L. et al. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.78, p. 990-98, 2008.

THOMAS, S. J. et al. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, p. 825–833, 2009.

TIMIRYASOVA, T. M. et al. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 88, p. 962–70, 2013.

UBOL, S. et al. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, p. 923–935, 2010.

VAN PANHUIS, W. G. et al. Inferring the serotype associated with dengue virus infections on the basis of pre- and postinfection neutralizing antibody titers. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, p. 1002–1010, 2010.

VAZQUEZ, S. et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. **Journal of Virology Methods**, v.110, p.179-184, 2003.

VINODKUMAR, C. S. et al. Episode of coexisting infections with multiple dengue virus serotypes in central Karnataka, India. **Journal of infection and public health**, v. 6, n. 4, p. 302-306, 2013.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York-NY: CAB International, 1997. p. 313–333.

WAGGONER, J. J. et al. Single-reaction, multiplex, real-time rt-PCR for the detection, quantitation, and serotyping of dengue viruses. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, p. e2116, 2013a.

WAGGONER, J. J. et al. Comparison of the FDA-Approved CDC DENV-1-4 Real-Time Reverse Transcription-PCR with a Laboratory-Developed Assay for Dengue Virus Detection and Serotyping. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, p. 3418–20, 2013b.

WAHALA, W. M. P. B.; DE SILVA, A. M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, v.3, p.2374-2395, 2011.

WANG, Wei-Kung et al. Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. **Journal of microbiology immunology and infection**, v. 36, n. 2, p. 89-95, 2003.

WATANAVEERADEJ, V. et al. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, p. 123–128, 2003.

WEAVER, S.C., VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, n.4, p.523–540, 2009.

WEBSTER, D.P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 11, p. 678-687, 2009.

WHO. **Dengue Diagnostics: proceedings of an international workshop**. World Health Organization, Geneva, p. 89pp, 2004.

_____. **Report on Dengue**. World Health Organization, Geneva, p1-168, 2006. Disponível em: http://www.who.int/topics/yellow_fever/es/

_____. **Guidelines for plaque reduction neutralizing testing of human antibodies to dengue viruses**. World Health Organization, Geneva, 2007. p. 26pp. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/>

_____. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control**. New ed., TDR: World Health Organization, Geneva, x, 147 pp, 2009a

_____. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Fact sheet, n. 117. World Health Organization, Geneva, 2009b. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

_____. **Impact of Dengue**. World Health Organization, 2013. Disponível em:
<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>

WIKRAMARATMA, P.S. et al. The effects of tertiary and quaternary infections on the epidemiology of dengue. **PLoS One**, v. 5, p. e12347, 2010.

WILDER-SMITH, A. et al. Serological evidence for the co-circulation of multiple dengue virus serotypes in Singapore. **Epidemiology and infection**, v. 133, p. 667–671, 2005.

WITTKE, V. et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. **Virology**, v. 301, p. 148-156, 2002.

YAMASHITA, A. et al. Origin and distribution of divergent dengue virus: novel database construction and phylogenetic analyses. **Future Virology**, v. 8, p. 1061–1083, 2013.

YOKSAN, S. et al. Laboratory assays and field dengue vaccine evaluation at Ratchaburi province, Thailand: a preliminary result. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, 2009.

ZELLWEGER, R.M. et al. Role of humoral versus cellular responses induced by a protective dengue vaccine candidate. **PLoS pathogens**, v.9, n. 10, p. e1003723, 2013.

DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo que determinou a frequência de resposta imune sorotipo-específica contra os DENV-1 a 4 em pacientes com dengue, recrutados em Goiânia-Goiás, macrorregião centro-oeste do Brasil. O período de investigação, 2012-2013, foi oportuno, visto que a coorte foi conduzida durante o maior pico epidêmico de dengue registrado no Brasil (2013). Neste contexto, nosso estudo evidenciou pela primeira vez a co-circulação dos quatro sorotipos virais, assim como a predominância do DENV-4 entre os sorotipos circulantes na epidemia de 2013 na cidade de Goiânia-GO. Estes achados corroboram os dados do serviço de vigilância virológica da dengue realizados no LACEN-GO, que demonstraram a predominância do DENV-4 entre os isolados no estado de Goiás (26).

Nosso estudo evidenciou uma alta prevalência de anticorpos neutralizantes contra DENV-1, DENV-2, DENV-3 e/ou DENV-4 em pacientes adultos e crianças. Em sua maioria, os pacientes apresentaram resposta imune antidengue do tipo multítipica independente da idade. Estes resultados podem refletir a exposição cumulativa aos vírus dengue circulantes na região assim como sugere uma transmissão precoce e contínua dos DENV no local de estudo. Ainda sobre a resposta imune multítipica, a maioria dos pacientes apresentou títulos de anticorpos neutralizantes para pelo menos dois sorotipos de DENV simultaneamente. Esses resultados evidenciam alta transmissão viral na região de estudo. A alta frequência de resposta multítipica descrita nesta pesquisa está em consonância com estudo prévio de base populacional conduzido no nordeste do Brasil (2005-2006). Em ambos locais de estudo, foi evidenciada a preexistência de anticorpos neutralizantes antidengue em crianças e adultos, independente da idade, o que pode ter potenciais implicações na evolução da doença e na resposta vacinal contra dengue [15].

Em nosso estudo a testagem por PRNT de amostras pareadas coletadas durante fase aguda e convalescente da doença possibilitou identificar anticorpos neutralizantes preexistentes para caracterizar o tipo de resposta imune. Foi possível também estabelecer, através da soroconversão dos anticorpos sorotipo-específicos, o sorotipo viral infectante em 80% dos pacientes com dengue envolvidos neste estudo. Esse percentual de identificação viral por PRNT foi duas vezes maior que o percentual de 40% de confirmação virológica da infecção por RT-PCR. Dessa forma, em nosso estudo, o teste de soroneutralização (PRNT)

foi relativamente mais sensível para identificar o sorotipo infectante em comparação com o teste molecular (RT-PCR). No entanto, a necessidade de análise de amostras pareadas por PRNT para diagnóstico de infecção aguda por dengue limita a aplicação deste teste na prática clínica [1,48,49].

Diversos estudos mostraram evidências de que a infecção por DENV heterotípico é um fator de risco para doença grave por dengue, principalmente durante a infecção secundária em crianças [11,14,30-33] e também na população em geral [34]. No presente estudo, houve uma alta frequência de resposta multitípica independente da gravidade dos casos de dengue e não foi observada diferença estatisticamente significativa no desfecho clínico dos pacientes que apresentaram infecção primária ou secundária por DENV. Houve ainda uma distribuição semelhante de resposta imune do tipo terciária ou quaternária entre os grupos de pacientes com dengue grave e o grupo controle. A relação entre infecções sequenciais por DENV e a gravidade da doença ainda não está bem estabelecida e poucos estudos estão disponíveis na literatura [35,36].

Em nosso estudo, uma paciente do sexo feminino (43 anos) recrutada em hospital e classificada como dengue grave, apresentou infecção simultânea por DENV-1 e por DENV-2 segundo os resultados do PRNT. Os testes de RT-PCR detectaram o DENV-1, mas não o DENV-2, provavelmente devido a uma carga viral mais baixa do sorotipo 2. Estudos realizados na Ásia [37-40] e nas Américas [41 -43] descrevem a ocorrência de infecções concorrentes por DENV em áreas hiperendêmicas com co-circulação dos quatro sorotipos virais, o que parece compatível com o cenário epidemiológico do nosso estudo. Acreditamos que este é o primeiro relato de infecção concorrente pelos vírus dengue no centro-oeste do Brasil.

O PRNT é considerado ensaio padrão ouro para detectar anticorpos neutralizantes antidengue sorotipo-específico, entretanto há controvérsias na literatura quanto ao desempenho e reprodutibilidade desse método bem como sobre a interpretação dos resultados. Vários estudos recentes apontam para possíveis variações no ensaio, como as cepas virais, linhagem de células e outros componentes do teste que podem influenciar na detecção e quantificação dos títulos de anticorpos neutralizantes, com possíveis efeitos nos resultados do PRNT o que compromete a comparabilidade dos estudos [44-46]. Para minimizar estes vieses, utilizamos um protocolo modificado por Morens et al. [29] e as

diretrizes da Organização Mundial da Saúde [13]. Ainda, a fim de melhorar a especificidade do PRNT utilizamos vírus isolados a partir de pacientes brasileiros infectados por DENV. Adicionalmente, analisamos a resposta de anticorpos neutralizantes sorotipo-específico em subgrupo de pacientes com confirmação virológica da infecção por RT-PCR: indivíduos que apresentaram soroconversão de anticorpos neutralizantes para DENV-1 ou DENV-4 através da análise de amostras pareadas por PRNT, apresentaram o mesmo marcador virológico (DENV-1 ou DENV-4) confirmados por RT-PCR, o que sugere consistência dos ensaios realizados.

Foram analisados também os dados secundários da série temporal da circulação dos DENV no estado de Goiás (1994 a 2013) da vigilância laboratorial, no intuito de estabelecer um paralelo com os resultados de infecção prévia dos casos de dengue atuais por PRNT. A análise dessa série história possibilitou estabelecer a sequência temporal da introdução dos sorotipos virais bem como a predominância dos sorotipos circulantes em cada situação epidemiológica. No período do estudo mais de 21 mil testes de isolamento viral foram realizados. Neste contexto foi possível detectar a introdução dos quatro sorotipos virais: DENV-1 em 1994 seguido por DENV-2 (1998), DENV-3 (2002) e DENV-4 em 2011, assim como a sequência de circulação dos DENV e sua predominância temporal. Estas informações são consideradas cruciais para monitorar a circulação dos diferentes sorotipos bem como para desencadear ações do sistema de vigilância epidemiológica da dengue.

Quatro importantes picos epidêmicos de dengue foram registrados nas duas últimas décadas no estado de Goiás, em 2002 com predominância do DENV-1, 2008 (DENV-3), 2010 (DENV-1) e 2013 (DENV-4). Esse padrão de predominância dos sorotipos virais no estado de Goiás se difere do cenário nacional que aponta predominância de DENV-3 em 2002 e de DENV-2 em 2008 (Guia VE 2014). Ainda nesse contexto de diferenças epidemiológicas regionais, o DENV-2 nunca assumiu a predominância entre os isolados pelo serviço de vigilância laboratorial de Goiás desde sua introdução em 1998. Adicionalmente, em 2008 foi observada uma importante modificação no padrão da epidemiologia de dengue no Brasil com um deslocamento da faixa etária de casos graves para menores de 15 anos de idade coincidindo com a intensa circulação do DENV-2 (21, BRASIL 2008). Em Goiás esta mudança não foi observada e os adultos jovens continuaram como os mais afetados pela doença em meio à co-circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (BRASIL, 2008 - boletim 2008 Jan-Nov).

Em 2013, 1,47 milhões de casos de dengue foram registrados no Brasil, destes 145 mil ocorreram em Goiás. Neste ano, o teste de isolamento viral foi realizado em ~2,2% do total de casos registrados em Goiás com identificação dos DENV-1 e DENV-4. Durante esta epidemia, o serviço de vigilância virológica detectou a predominância do DENV-4 (55,5%), pela primeira vez, entre os isolados do estado.

Uma das limitações do presente estudo é o pequeno tamanho da amostra testada para o PRNT. Esta técnica é laboriosa e requer tempo para ser executado além de profissionais qualificados, o que limita sua utilização em estudos de larga escala [13]. Nosso estudo demonstrou resposta imune sorotipo-específica em pacientes sintomáticos com dengue, recrutados em ambulatório e hospitais, mostrando uma situação no local de atendimento dos pacientes (*point of care situation*). Estamos cientes de que nossos resultados devem ser interpretados com cautela e não podem ser extrapolados para outras regiões brasileiras. No entanto, nosso estudo destaca a elevada frequência de resposta antidengue multítípica em todos os grupos etários. Acreditamos que nossos resultados possuem potenciais implicações na evolução da doença e vigilância da dengue em Goiás.

Nosso grupo de pesquisadores integra uma rede multidisciplinar - Pronex Rede-Dengue – financiado pelo CNPq/FAPEG, o qual congrega centros de excelência em pesquisa em dengue no Brasil com o intuito de desenvolver pesquisas para melhor compreender os mecanismos relacionados à imunopatogênese da dengue. O desenvolvimento deste estudo promoveu a continuidade e expansão da rede de pesquisa em dengue entre as instituições de ensino, pesquisa e de serviços de saúde o que contribui para melhor compreensão do cenário epidemiológico da dengue em Goiás com possíveis implicações nas ações de vigilância epidemiológica da dengue no estado.

CONCLUSÕES

- A maioria dos pacientes do estudo, adultos e crianças, apresentaram resposta imune antidengue do tipo multítípica caracterizada pela presença de anticorpos neutralizantes sorotipo-específico para dois ou mais DENV simultaneamente.
- Não foi observada associação entre a preexistência de anticorpos neutralizantes e o desfecho clínico de gravidade entre pacientes classificados como dengue grave comparados aos pacientes com dengue.
- A análise de PRNT em amostras pareadas permitiu a identificação do sorotipo viral infectante na maioria dos pacientes (86,6%).
- A implantação e desenvolvimento do ensaio PRNT no LACEN-GO e UFG permite o desenvolvimento de estudos para avaliação da resposta imune sorotipo-específica em período pré e pós vacinal;
- A análise da série histórica da vigilância laboratorial dos vírus dengue em Goiás no período de 1994-2013 demonstrou a introdução dos quatro sorotipos virais na região, assim como a sequência temporal de circulação dos DENV.