

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**Valéria Christina de Rezende Féres**

**Epidemiologia molecular dos vírus dengue em Goiânia-GO, 1994-2006:  
vigilância laboratorial e caracterização dos sorotipos circulantes**

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Celina Maria Turchi Martelli**

**Tese de Doutorado**

**Goiânia-GO, 2008**

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

**Valéria Christina de Rezende Féres**

**Epidemiologia molecular dos vírus dengue em Goiânia-GO, 1994-2006:  
vigilância laboratorial e caracterização dos sorotipos circulantes.**

**Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Celina Maria Turchi Martelli**

**Tese submetida ao PPGMT/UFG como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Doutor em Medicina Tropical, na área de concentração de  
Epidemiologia**

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do  
PRONEX/SECTEC/CNPq, processo 23234156.

**Goiânia-GO, 2008**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(GPT/BC/UFG)**

F349e Féres, Valéria Christina de Rezende.  
Epidemiologia molecular dos vírus dengue em Goiânia-GO, 1994 - 2006 [manuscrito]: vigilância laboratorial e caracterização dos sorotipos circulares / Valéria Christina de Rezende Féres . – 2008. xii, 183 f.: il., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Bibliografia.

Inclui lista de abreviaturas e siglas.

Anexos.

1. Vírus (Dengue) – 1994-2006 – Goiânia (GO) 2. Genótipos  
3. Epidemiologia molecular 4. Seqüenciamento genômico I. Martelli, Celina Maria Turchi. II. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública III. Título.

CDU: 578.2:575.22(817.3 Goiânia)

*Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus,  
Há um tempo para plantar e um tempo para colher.  
Assim eu concluí que nada é melhor para o homem do que alegrar-se e  
procurar o bem estar durante sua vida; e o que comer, beber e gozar do fruto  
do seu trabalho é um dom de Deus.*

Eclesiastes 3: 1-2, 12

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais Edvar e Sônia,  
ao meu marido Sérgio e  
aos meus filhos Juliana e Victor*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por segurar na minha mão e me conduzir em todos os momentos.

À Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli, meu exemplo de profissionalismo e competência, e que com grande experiência, coordenou este trabalho, agradeço pelo estímulo, paciência e amizade, pelos ensinamentos que muito contribuíram para o meu crescimento profissional.

À Dra Rita Maria Ribeiro Nogueira, chefe do Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ a quem me inspiro profissionalmente, um grande exemplo de competência científica, pelo apoio técnico e incentivo e amizade, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos colegas da FIOCRUZ, Dra Flávia Barreto pela atenção e em especial ao Doutorando Josélio Araújo que com muita habilidade e competência transmitiu a mim seus conhecimentos técnicos imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Profa Dra Marília Turchi pela atenção e aconselhamentos pontuais para a conclusão desta tese.

À Profa Dra Mariane Stefani, por quem tenho grande admiração e simpatia, pelo carinho e aconselhamentos técnicos.

Ao Prof André Kipnis pelas sugestões na banca de qualificação.

Ao Prof Dr João Bosco Siqueira pela amizade e administração dos recursos que viabilizaram a realização deste trabalho.

À Coordenação de pós graduação do IPTSP, em nome da Profa. Fátima Alves pelo incentivo à realização deste trabalho.

À Dra. Maria Bárbara Helou Rodrigues, Diretora Geral do LACEN-GO, pela sensibilidade e sabedoria natas, pelo apoio e estímulo, os quais possibilitaram a realização dos experimentos e conclusão desta tese.

À Dra. Carmem Helena Ramos, chefe da Divisão de Biologia Médica do LACEN-GO, pelo apoio técnico e profissionalismo, essenciais para a realização deste trabalho, pela confiança e amizade cultivados nesses anos.

Ao Msc Benigno Rocha, pela amizade e presteza apoiando desde o início a realização dos procedimentos técnicos.

À Dra Adriana Guilarde por termos compartilhado este trabalho com amizade e dedicação.

À Dra Ana Cecília Cruz pela atenção e auxílio na elaboração da tese.

Aos colegas do LACEN-GO, Maysa, Andréa, Lucileis e Luis Augusto, pelo apoio técnico, estímulo e amizade.

À minha família, em especial à minha mãe Sônia, por cuidar de mim e dos meus filhos, e à minha sogra Regina que nas minhas ausências, dedicou-se aos netos com muito carinho.

Ao meu marido pelo incentivo a minha carreira profissional e aos meus filhos por superarem o meu “agora não posso”, a vocês todo o meu amor.

A todos que possibilitaram, direta ou indiretamente, a execução e a conclusão desta tese.

## ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
ADE	Intensificação da infecção dependente de anticorpo ( <i>Antibody-Dependent Enhancement</i> )
C6/36	Clone de células de mosquito <i>Aedes albopictus</i>
DC-SIGN	Receptor de ligação de células dendríticas imaturas
DENV	vírus dengue
ECP	Efeito Citopático
FD	febre por dengue ou dengue clássico
FHD	febre hemorrágica por dengue ou dengue hemorrágico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IH	Inibição da hemaglutinação
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IVCC	Innovative Vector Control Consortium
LACEN	Laboratório de Saúde Pública
mM	Milimolar
MAbs	Anticorpos monoclonais
MAC-ELISA	Anticorpos M – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
MS/SVS	Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde
ORF	Cadeia aberta para leitura (Open Reading Frame)
PAHO	Pan American Health Organization
pb	par de bases
PDVI	Pediatric Dengue Vaccine Initiative
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue

PCR	reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNase	Ribonuclease
RPdR	RNA polimerase dependente de RNA
RT-PCR	Transcrição reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase
RSS-PCR	Reação em cadeia da polimersase baseada em sítios de restrição específicos
SES-GO	Secretaria de Estado da Saúde de Goiás
TBEV	Vírus da encefalite do carrapato (Tick-Borne Encephalite virus)
TDR	Research and Training in Tropical Disease
TNRP	Teste de neutralização da redução da formação de placas de lise
UNICEF	Fundação das Nações Unidas para a Infância
UNDP	United Nations Developmen Program
WHO	World Health Organization

# SUMÁRIO

	Página
Agradecimentos.....	v
Abreviaturas e siglas.....	vii
Sumário.....	ix
Resumo .....	xi
Introdução.....	1
Epidemiologia da infecção pelos vírus dengue.....	4
Os vírus dengue.....	10
Imunopatologia.....	19
Diagnóstico laboratorial.....	23
Epidemiologia molecular.....	30
Referências .....	38
Objetivos.....	66
Artigo 1. Laboratory Surveillance of Dengue Virus in Central-Brazil, 1994-2003.....	68
Resumo.....	70
Abstract.....	71
Introduction.....	72
Methods.....	73
Results.....	75
Discussion.....	77
References.....	80
Figure 1 Reported and laboratory-confirmed dengue cases plotted by months from January 2002 to June 2003.....	84
Table 1. Serotypes of dengue virus isolated, Goiania- Central Brazil, 1994-2003.....	85
Table 2. Characteristics of dengue cases according to serotypes, 2002-2003.....	85
Artigo 2. Epidemiologia molecular do vírus dengue tipo 3 em Goiânia-GO, 2005-2006.....	86
Resumo .....	88

Abstract .....	89
Introdução.....	90
Materiais e métodos.....	92
Resultados.....	97
Discussão.....	100
Referências .....	105
Figuras 1. A - gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídio dos fragmentos de DNA de amostras de DENV-3 produto da 1 <sup>a</sup> PCR de sequenciamento.....	115
Figura 2. Análise filogenética das seqüências dos genes prM/M e E do DENV-3 comparadas a 20 seqüências de referência dos genótipos do DENV-3.....	116
Tabela 1. Seqüências da região prM/M/E do vírus dengue tipo 3 analisadas no estudo.....	117
Tabela 2. Identidade nucleotídica e de aminoácidos entre as seqüências prM/M/E do DENV-3 analisadas no estudo.....	118
Tabela 3. Alterações na seqüência de aminoácidos deduzida da proteína das regiões prM/M E do vírus dengue tipo 3 comparadas à seqüência Brasil-2002 AY976147.....	119
Conclusões e recomendações .....	120
Anexos.....	121

## RESUMO

Atualmente, a dengue representa um dos maiores problemas em saúde pública, pois é causa de doença e morte entre milhares de pessoas que residem nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os vírus dengue existem como quatro sorotipos virais (DENV-1 a DENV-4) de acordo com diferenças antigênicas, sendo caracterizados grupos intra-típicos denominados genótipos. A vigilância laboratorial possibilita a confirmação diagnóstica de infecção por dengue e o monitoramento de sorotipos circulantes, através de técnicas diagnósticas de rotina. Recentemente, o uso de técnicas moleculares tem contribuído para a caracterização e monitoramento de genótipos potencialmente virulentos na vigência de epidemias e melhor entendimento da biologia do vírus. Esta tese de doutorado compreende uma introdução que contempla uma revisão da literatura sobre dengue e dois manuscritos que descrevem as pesquisas realizadas com enfoque no diagnóstico laboratorial e epidemiologia molecular. O primeiro manuscrito intitulado *Laboratorial Surveillance of Dengue Virus in Central-Brazil, 1994-2003*, foi publicado no *Journal of Clinical Virology*, 2006 37 (3): 179-83. Neste estudo, apresentamos os resultados de uma vigilância laboratorial conduzida na cidade de Goiânia na região Centro-Oeste do Brasil, desde a introdução dos vírus dengue em 1994 até 2003. Casos com suspeita clínica de dengue foram atendidos em unidades de saúde e hospitais de referência da região metropolitana e os testes sorológicos e/ou isolamento viral realizados no laboratório de referência estadual – LACEN-GO. Nosso objetivo foi descrever sobre os sorotipos virais circulantes de dengue nos anos de 1994 a 2003 e o seu papel nos desfechos clínicos de dengue na região Centro-Oeste do Brasil e caracterizar sorotipos e genótipos ou subtipos genômicos pela RT-PCR e RSS-PCR em amostras selecionadas. O sorotipo DENV-1 foi identificado como prevalente nos anos 1994 a 2002, sendo substituído por DENV-3 em 2003. Os adultos

(87,4%) foram mais atingidos e a dengue clássica a mais diagnosticada. A dengue foi confirmada em 50% dos casos suspeitos de dengue incrementado pela RT-PCR. Os genótipos ou subtipos genômicos do DENV-1 e DENV-3 corresponderam circulantes no país. A infecção pelo DENV-3 não sugere um papel relevante no aumento da gravidade da doença durante seu primeiro ano de dispersão no Centro-Oeste do Brasil. O segundo manuscrito, a ser submetido à publicação, foi intitulado *Epidemiologia Molecular do Vírus Dengue tipo 3 em Goiânia – GO, 2005-2006*. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o genótipo circulante do DENV-3 isolado de amostras bem caracterizadas clínica e laboratorialmente em Goiânia-GO/Brasil e analisar as alterações genômicas encontradas. Sete seqüências regiões prM/M/E, foram obtidas e analisadas em comparação com cepas protótipo do DENV-3. As seqüências do estudo apresentaram maior homologia com a cepas do genótipo III. O percentual de identidade nucleotídica das amostras do DENV-3 seqüenciadas variou de 97,0% a 99,6% e de aminoácidos 97,5% a 99,5%, mostrando-se conservadas. A análise da seqüência nucleotídica das amostras do estudo revelou mutações silenciosas e 14 substituições de aminoácidos na seqüência da proteína deduzida do gene prM/M/E. Em conclusão, o estudo confirma que as cepas de DENV-3 da região centro-oeste pertencem ao genótipo III. Alterações genômicas significativas foram observadas ao longo do domínio III da proteína E, as quais poderiam afetar a patogenicidade, entretanto não foram consistentes entre as amostras de DCC e FHD. As amostras de pacientes com dengue clássica apresentaram alterações em resíduos de aminoácidos no domínio III relatados como pontos de atenuação viral. Maiores investigações serão necessárias para confirmar as alterações encontradas e sua relação com as formas clínicas.

Palavras chaves: Vírus dengue; genótipo, epidemiologia molecular, seqüenciamento genômico.

## ABSTRACT

Nowadays, dengue constitute the major public health problem, because is relevant cause of illness and death between thousands people that resident in the tropical and subtropical regions in world. The dengue virus is classified as four serotypes (DENV-1, 2, 3 and 4) according to antigenic differences and characterized intra-typical groups called genotypes. The laboratorial surveillance enables the diagnostic confirmation of dengue infection and monitoring serotypes circulating through the routine diagnostic techniques. Recently, the use molecular techniques has contributed to characterize and monitoring of the genotypes potentially virulent during epidemic and knowledge of biology of dengue virus. This thesis was organized in an introduction section, that include a literature review on dengue, and two manuscripts that describing the research conducted with focus on laboratory diagnostic and molecular epidemiology. The first manuscript entitled *Laboratorial Surveillance of Dengue Virus in Central-Brazil, 1994-2003*, was published at *Journal of Clinical Virology*, 2006 37 (3): 179-83. In this study we present the results of the virological surveillance for dengue cases conducted in the city of Goiânia (~1,200,000 population) from 1994 to 2003. Suspected cases were from the main public infectious disease reference hospital and outpatient clinics covering the metropolitan area. Serological and virus isolation tests were conducted at the regional reference laboratory. Our objective was to report dengue circulating serotypes from 1994 to 2003 and the role of distinct serotypes on dengue clinical outcomes in Central Brazil and to characterize serotypes and genotypes by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and by restricted site-specific PCR (RSS-PCR) patterns in selected samples. Laboratory surveillance identified mainly DEN-1 serotype from 1994 to 2002 shifting to a high circulation of DEN-3 in 2003. The adults (87,4%) were the most affected group and dengue fever accounted for the majority of the cases. Diagnosis of

dengue was confirmed in ~50% of the suspected and enhanced by RT-PCR. RSS-PCR patterns for DEN-1 and DEN-3 corresponded to the circulating subtypes in the country. The infection DENV-3 did not suggest a major role of infecting DEN-3 in increasing disease severity during its first-year spread in Central Brazil. The second manuscript, to be submitted for publication is entitled: *Epidemiologia Molecular do Virus Dengue tipo 3 em Goiânia – GO, 2005-2006*. The objective of this manuscript was to characterize the DENV-3 genotype circulating isolated from well-characterized clinical and laboratory samples in Goiânia-GO/Brasil. Seven samples had sequences of the prM/M/E region obtained and comparative analysis was performed with the reference strains. The results showed the homology of the genomics sequences with genotype III strains. The nucleotide identity of the all the samples varied from 97.0% to 99.6% and the amino acid sequences from 97.5% to 99.5%. The analysis of the nucleotide sequence revealed silent mutation and 14 amino acid changes in the protein deduced from gene prM/M/E. In conclusion, the study confirms that the strains of DENV-3 in Central Brazil relate to genotype III. The genomic changes along Domain III of the protein E were observed, which could affect the pathogenicity, but were not consistent between samples of DCC and DHF. Samples of patients with dengue fever had mutations related to viral attenuation. More investigation is necessary to evidence of genomic changes found in relationship with clinical forms.

Keywords: Dengue virus; genotype, molecular epidemiology, genomic sequencing.

## INTRODUÇÃO

---

A dengue é uma doença infecciosa causada pelos vírus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) transmitida ao homem pela picada do mosquito *Aedes aegypti* e caracterizada por um espectro de manifestações clínicas desde a Febre da Dengue (FD) ou dengue clássica até a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque de Dengue (SCD), a forma mais grave da doença. Está amplamente distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, em decorrência da expansão do vetor nos últimos 30 anos, constituindo um problema global de saúde pública pela crescente incidência de casos e a emergência da febre hemorrágica da dengue, importante causa de mortalidade. Cerca de 50 milhões de pessoas adoecem anualmente por dengue e mais de 500 mil desenvolvem FHD, afetando o sistema de saúde, o trabalho e o turismo com repercussões econômicas e sociais (Pinheiro & Corber 1997, Gubler 1998, Halstead 2007, Harving & Røesholt 2007, WHO 2008).

A expansão das epidemias de dengue ocorreu em parte pela falta de uma vacina disponível contra a doença e por fatores que reconhecidamente contribuíram para a dispersão do vetor: o crescimento global da população e urbanização não planejada, problemas com infra-estrutura de saneamento básico, falhas no controle efetivo do mosquito, aumento do uso de produtos não biodegradáveis, mudanças climáticas e o aumento das viagens aéreas favorecendo o maior deslocamento entre populações (WHO 1997, Gubler 1998, Torres 2005).

Nesse contexto, um maior investimento em pesquisas na busca de melhor entendimento sobre a doença tem sido a preocupação de organismos internacionais. Em 2002, a Organização Mundial de Saúde organizou uma Conferência em Biotecnologia e Genômica em Benefício da Saúde com a participação de renomados cientistas que discutiram sobre pesquisas em dengue. As recomendações foram com base na formação de uma rede integrada para estudos colaborativos envolvendo informações em vigilância,

estudos clínicos e fisiopatológicos, desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas, vacinas, bioética e questões sociais (Calva et al. 2002).

Desde 1999, a dengue foi incorporada no Portifólio da UNICEF, UNDP, World Bank e no Programa Especial da Organização Mundial da Saúde para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (WHO/TDR 2006), cujas prioridades foram revistas durante o encontro de cientistas participantes do grupo de trabalho (Dengue Scientists Work Group) SWG/TDR, Genebra, 2006, objetivando pesquisas para o desenvolvimento no tratamento, prevenção e controle. Algumas instituições não governamentais também estão envolvidas nesse processo contribuindo com o financiamento de pesquisas para o desenvolvimento de drogas e vacinas, controle do vetor e pesquisas clínicas, tais como, a Foundation Mellinda Gates, PDVI, IVCC, TDR, European Comission, Welcome Trust e Novatis.

Evidências dos avanços nas pesquisas em dengue compreendem: o desenvolvimento de novas metodologias na busca de um diagnóstico mais rápido, acurado e que possa prever gravidade; os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento de formas graves da doença; o uso de anticorpos monoclonais, demonstrando alterações genômicas que evidenciam atenuação ou virulência viral; o uso de técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da biologia do vírus e da sua diversidade genética.

Os resultados dessas pesquisas vêm contribuindo com o melhor entendimento da doença e desenvolvimento de vacinas e terapêutica viral.

## **EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELOS VÍRUS DENGUE**

Historicamente, as primeiras descrições de epidemias de dengue na literatura médica foram relatadas na África, Ásia e América, em 1779 e na Filadélfia em 1780 (Henchal & Putnak 1990). Entretanto, relatos de uma doença semelhante à dengue já apresentava dispersão global, mesmo antes do século XVIII (Gubler 1998).

A primeira epidemia conhecida de FHD ocorreu em Manila, nas Filipinas, em 1953-54, onde dois novos vírus sorologicamente relacionados foram isolados e denominados dengue tipo 3 e 4 (Hammon et al. 1960), em seguimento aos vírus dengue tipo 1 e 2 identificados por Sabin et al. (1952).

Após a Segunda Guerra Mundial, houve dramático aumento na incidência de dengue e FHD em escala mundial, sendo que as décadas de 80 e 90 foram marcadas pela propagação geográfica e intensificação das epidemias de dengue e emergência de FHD na Ásia, espalhando-se pela Índia, Paquistão, Sri Lanka e Ilhas Maldivas e China (Pinheiro & Corber 1997, Gubler 1998, WHO 2002).

A circulação de múltiplos sorotipos de dengue ocorre na Ásia há muitas décadas, caracterizada como uma doença pediátrica onde, até recentemente 50% das crianças tailandesas poderiam adquirir uma ou mais infecção por dengue até os 5 anos de idade e aos vinte anos teriam anticorpos para os 4 sorotipos (Fischer & Halstead 1970). Atualmente, com o crescimento econômico e melhorias nos programas de controle da doença, a incidência da doença diminuiu em alguns países, entretanto houve aumento de FHD em crianças e emergência da doença em adultos (Ooi et al. 2003, Halstead 2006). Outros estudos na Ásia relatam a dispersão da doença, circulação viral e aumento da incidência de casos discutindo estratégias de controle e prevenção (Rahman et al. 2002, Victor et al. 2007).

No continente americano as epidemias de dengue foram raras entre os anos de 1950 e 1970, principalmente em função da erradicação do *Ae. aegypti* na maioria dos países da América Central e do Sul (Gubler 1998). Os sorotipos do vírus dengue responsáveis pelas epidemias neste período foram conhecidos a partir de 1952, quando foi isolado DENV-2 em Trinidad e, após dez anos, DENV-3 foi isolado de amostras em Porto Rico. Porém, em 1976, houve reinfestação do *Ae. aegypti* nas Américas pela descontinuidade das medidas de controle do vetor (Pinheiro & Corber 1997, PAHO 2001). Em 1977, o DENV-1 foi introduzido na Jamaica e dispersou-se rapidamente provocando epidemias em vários países do Caribe e América Central. Até 1980, mais de 700 mil casos da doença foram registrados em todo o continente (PAHO 1989). O primeiro registro de DENV-4 ocorreu em 1981 na Ilha de St. Bartolomeu, em Porto Rico e, após causar surtos no Caribe e países da América Central e do Sul, este sorotipo tornou-se endêmico na região (PAHO 2001). Ainda em 1981, houve introdução de um novo genótipo de DENV-2 no continente, desencadeando, em Cuba, a primeira epidemia de FHD das Américas, onde 10.132 casos de FHD/SCD foram registrados com 158 óbitos, sendo 101 crianças (Kourí et al. 1987). Registros de FHD também ocorreram na Venezuela durante a epidemia de 1989-1990 (Pinheiro & Corber 1997). De 1981 a 1997, 24 países reportaram casos de FHD (Gubler 1998). Nessas epidemias dois terços dos casos ocorreram em crianças com menos de 15 anos de idade, sendo que no Brasil e na Colômbia, predominaram os pacientes adultos. O DENV-3 foi detectado em 1994, primeiramente na América Central, depois no México e América do Sul (Guzman et al. 1996, Uzuku et al. 2001), sendo caracterizado o genótipo III (distinto do genótipo que circulava nas Américas há 17 anos) e esteve associado às epidemias de FHD/SCD no Sri Lanka e Índia na década de 80 (Messer et al. 2003). Nos anos de 2000 e 2005 o DENV-3 circulou em vários países, sendo introduzido

na América do Sul, pela Venezuela e Brasil, causando grandes epidemias (PAHO 2000, Nogueira et al. 2001, Uzcategui et al 2003, De Simone et al. 2004, Peyrefitte et al. 2005).

A epidemiologia da doença caracterizou-se por um aumento da frequência de casos de dengue e de FHD em vários países da América Central e Caribe, estabelecendo um padrão de hiperendemicidade com epidemias intermitentes e persistência da co-circulação de múltiplos sorotipos virais (Guzman & Kouri 2003). Esta alta atividade dos vírus dengue no continente e a re-infestação pelo *Aedes aegypti* em 1977, contribuíram para a re-introdução dos vírus no Brasil na década de 80 (Pinheiro & Corber 1997).

No Brasil, os primeiros relatos de dengue (denominada à época de polka) descreveram surtos ocorridos em 1846 no sudeste, norte e nordeste do país (Mariano 1917). A descrição do quadro clínico de dengue clássico foi feita com base em estudos realizados durante a epidemia de 1922-23 no Rio de Janeiro e Niterói (Figueiredo et al. 2000).

A re-infestação do *Aedes aegypti* a partir de 1976 possibilitou a introdução dos vírus dengue em Boa Vista-RR (1981) (Osanai et al. 1983), entretanto, foi a partir de 1986, pela introdução do DENV-1 no Rio de Janeiro, que o vírus espalhou pelo país (Schatzmayr 2000).

Um caso de DENV-2 foi reportado em Belém (1989), isolado de um paciente oriundo de Luanda, Angola (Travassos da Rosa et al. 1989), entretanto, não houve disseminação deste vírus, o qual pertencia ao genótipo IV (Burkina Faso), diferente do genótipo III (Jamaica), identificado nos casos autóctones de DENV-2 no Rio de Janeiro identificados em 1990. Posteriormente, no Ceará (1994), a epidemia de DENV-2 registrou os primeiros casos de FHD no Brasil (Nogueira et al. 1990, Vasconcelos et al. 1995).

DENV-1 e DENV-2 circularam concomitantemente pelo país causando epidemias por quase 10 anos até a introdução do DENV-3, em 2000, primeiramente registrado em

São Paulo, de um caso importado da Nicarágua (Rocco et al. 2001). No mesmo ano o DENV-3 foi isolado no Rio de Janeiro e se espalhou rapidamente para todo o Brasil (Nogueira et al. 2001). Em 2002 ocorreu a mais grave epidemia de dengue no Brasil, com mais de 794 mil casos notificados (MS/SVS 2003) sendo prevalente o DENV-3.

O agravamento da situação epidemiológica da dengue pela dispersão dos vírus pelo país e conseqüente aumento da incidência de casos notificados de dengue e FHD (Teixeira et al. 2005), levou o Ministério da Saúde a implantar o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), com o objetivo de intensificar de ações de controle para a redução do impacto da dengue no Brasil. Considera-se que as ações do PNCD, desenvolvidas em parceria com Estados e Municípios, tenham contribuído com a redução dos casos da doença a partir de 2004 (MS/SVS 2008).

Dois padrões epidemiológicos de dengue foram descritos no Brasil: de 1986 a 1993 com epidemias esporádicas e localizadas em centros urbanos, e de 1994 a 2005, um cenário endêmico-epidêmico com a circulação dos três sorotipos virais (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) em todo o território nacional e com incremento de hospitalizações e casos de dengue hemorrágico (Siqueira et al. 2005).

As sucessivas epidemias com notificação de alto número de casos por todos os estados brasileiros demonstram o avanço da dengue nos últimos 20 anos de epidemias no Brasil com o registro de 4 234 049 casos de dengue (Nogueira et al. 2007).

Em 2007, ocorreram epidemias com altas taxas de incidência, a exemplo dos estados de Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro; observou-se a interiorização da doença e a concentração de casos de dengue hemorrágico/óbitos em determinadas regiões do Brasil (MS/SVS 2008). Foi observado um aumento de casos de FHD em menores de 15 anos nos estados do Maranhão e Piauí, com isolamento do DENV-2. Por esse motivo o Ministério da Saúde alertou para a possibilidade de mudanças no perfil epidemiológico da dengue no

Brasil que, diferentemente dos países asiáticos, atinge os adultos (Siqueira et al. 2005, MS/SVS 2008). Em Goiás, à semelhança do cenário epidemiológico do país, a ocorrência de epidemias de dengue, com introdução sucessiva dos três sorotipos virais têm incrementado o número de casos notificados com o aparecimento de formas graves e óbitos (Feres et al. 2006, SES-GO 2008). Desde a introdução do DENV-1 em 1994 até 2007, foram notificados 165.532 casos de dengue, com 375 casos FHD e 72 óbitos (SES-GO 2008). Os primeiros casos de FHD foram registrados a partir da introdução do DENV-2 em 1998, entretanto, o DENV-1 manteve-se como o sorotipo prevalente até 2002, durante a maior epidemia de dengue já registrada em Goiás (28 373 casos notificados), o qual foi substituído pelo DENV-3 nos anos subseqüentes.

Entre dezembro de 2007 e fevereiro de 2008, a população de Goiás viveu uma situação ímpar com a ocorrência de uma epidemia de febre amarela. Houve registro de epizootia e a confirmação de 21 casos de febre amarela silvestre representando 52% (21/40) do total de casos confirmados no Brasil. Goiás é região endêmica para febre amarela e para controle da epidemia 2.847.695 doses de vacina contra a febre amarela foram aplicadas na população no referido período (MS/SVS 2008). Este é um dado epidemiológico importante para interpretações no diagnóstico laboratorial de febre amarela e dengue, pois a concomitância de epidemias por diferentes flavivírus em uma mesma região, requer a utilização de técnicas que possibilitem o diagnóstico diferencial das infecções (MS/FUNASA 2002). A presença de anticorpos IgM anti-FA, de origem vacinal, pode resultar em resposta cruzada com a pesquisa de anticorpos anti-dengue mediante a suspeita clínica da doença. Na prática laboratorial, para todos os casos com suspeita clínica de dengue e histórico de vacina anti-FA recente, realiza-se a sorologia para dengue e febre amarela, assim como para todo caso suspeito de febre amarela realiza-se a pesquisa de anticorpos IgM anti-dengue. A inibição da hemaglutinação (IH), o isolamento viral e a

pesquisa de RNA e antígenos virais, são importantes ferramentas também utilizadas no esclarecimento do diagnóstico das infecções por flavivírus ((MS/FUNASA 2002).

Estudos realizados em Goiânia têm contribuído para a o entendimento da epidemiologia da dengue na região. Uma prevalência de 40% de exposição prévia ao vírus dengue, obtida em inquérito populacional em Goiânia em 2001, permitiu estimar uma exposição prévia aos vírus do dengue em mais de 400 mil residentes ao considerar a população global do município (Siqueira et al. 2004). A vigilância laboratorial tem sido realizada na região e contou com a implementação de técnicas de biologia molecular, neste estudo, para a detecção de sorotipos e genótipos circulantes (Feres et al. 2006). Um estudo de coorte incluiu casos DC e FHD, oriundos de demanda de vigilância epidemiológica, caracterizados clínica e laboratorialmente com o objetivo de determinar fatores prognósticos para desencadeamento de FHD. A persistência de viremia na defervescência e alterações de enzimas hepáticas foram significativas e importantes para o prognóstico de doença mais grave (Guilarde et al. 2008). Na população estudada a infecção secundária, considerada como fator de risco para FHD, não foi associada aos casos de FHD confirmados, abrindo perspectivas para a caracterização molecular dos sorotipos e genótipos virais circulantes. Outro estudo mostrou o perfil da epidemia em crianças, o qual tem sido subestimado na região em função de sintomas clínicos inespecíficos. Cerca de 20% dos casos tiveram FHD ou dengue com complicações (Rocha 2008).

## OS VÍRUS DENGUE

### Classificação

Os vírus dengue pertencem a família *Flaviviridae*, ao gênero *Flavivirus*, o qual é composto por 53 espécies, onde 27 são transmitidos por mosquitos, 12 por carrapatos e 14 não possui vetor conhecido. Das espécies de vírus transmitidas por mosquito, 65% produzem doença em humanos (ICTV 2005). O *Aedes aegypti* é o vetor mais importante envolvido na transmissão viral da dengue, seguido do *Aedes albopictus*. Os vírus dengue foram classificados em quatro sorotipos antigenicamente distintos designados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (ICTV 2005).

### Estrutura e morfologia

Os *Flavivirus* são vírus esféricos com 40-60 nm de diâmetro constituídos por um capsídeo icosaédrico formado por um único tipo de proteína denominada proteína C, que circunda o genoma viral (Chambers et al. 1990). O envelope viral é formado por uma bicamada lipídica incorporando a glicoproteína E, a proteína M e pequenos resíduos da proteína prM (Figura 1), as quais formam pequenas projeções na superfície do vírion (Heinz & Allison 2001, Mukhopadhyaya et al 2005).

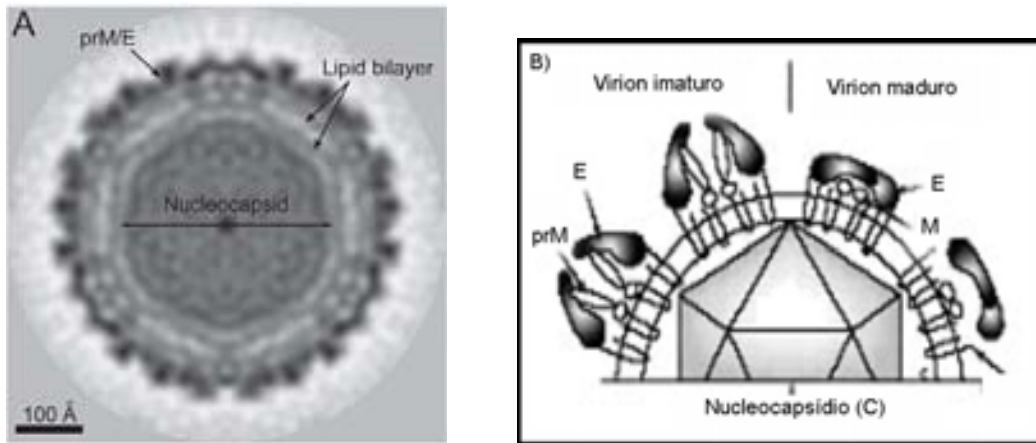


Figura 1. Partícula viral e composição esquemática do vírus dengue – adaptado de Heinz & Allison (2001) e Rossman (2008). A) Partícula do vírus dengue determinada pela criomicroscopia eletrônica demonstrando a simetria icosaédrica 100 Å de resolução Rossman et al. 2008. B) Diagrama esquemático do vírus dengue ilustrando o estágio de maturação, Heinz & Allison (2001). Onde: E – proteína do envelope; M – proteína de membrana; prM – proteína pré-membrana; C – proteína do capsídeo.

## Genoma viral

Os *Flavivírus* têm genoma de RNA fita simples (*ssRNA*) polaridade positiva com aproximadamente 11 Kb de tamanho e massa molecular de  $4 \times 10^6$  Da. O genoma possui na extremidade terminal 5' uma região cap 7 metil guanosina e não apresenta cauda poliadenilada na extremidade 3' (Chambers et al. 1990, Henchal & Putnak 1990). As extremidades 5' e 3' possuem duas regiões não codificantes com 96 e 454 nucleotídeos, respectivamente e, entre estas, uma única fase aberta de leitura, que codifica uma poliproteína de 3386 a 3434 aminoácidos. Esta poliproteína é posteriormente clivada co- e pós-traducionalmente em proteínas estruturais (C, prM/M e E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Heinz & Allison 2001). Uma peptidase sinal do hospedeiro é responsável pelas clivagens entre C-prM, prM-E, E-NS1, e próxima da região carboxiterminal da NS4A. Uma serina protease, codificada pelo vírus, é responsável pelas clivagens entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B e NS4B/NS5. A

enzima responsável pela clivagem da NS1/NS2A ainda é desconhecida (Lindenbach & Rice 2002) (Figura 2).

As regiões 5' e 3' não codificantes (RNC) são importantes para controle da replicação do RNA viral (Clyde et al. 2006).

O genoma viral de polaridade positiva serve como RNA mensageiro (mRNA) para a tradução das proteínas virais. Nenhum RNA viral subgenômico tem sido encontrado em células infectadas com vírus (Chambers et al. 1990). A região não codificante (RNC) 5' é uma seqüência não conservada entre os diferentes flavivírus, e pode estar envolvida na tradução do genoma ou ainda na complementaridade da cadeia negativa, que serve como sítio de iniciação da cadeia positiva durante a síntese da replicação do RNA. A RNC 3' exibe grande variabilidade, embora várias características conservadas e estruturas secundárias tenham sido descritas (Lindenbach & Rice 2003).

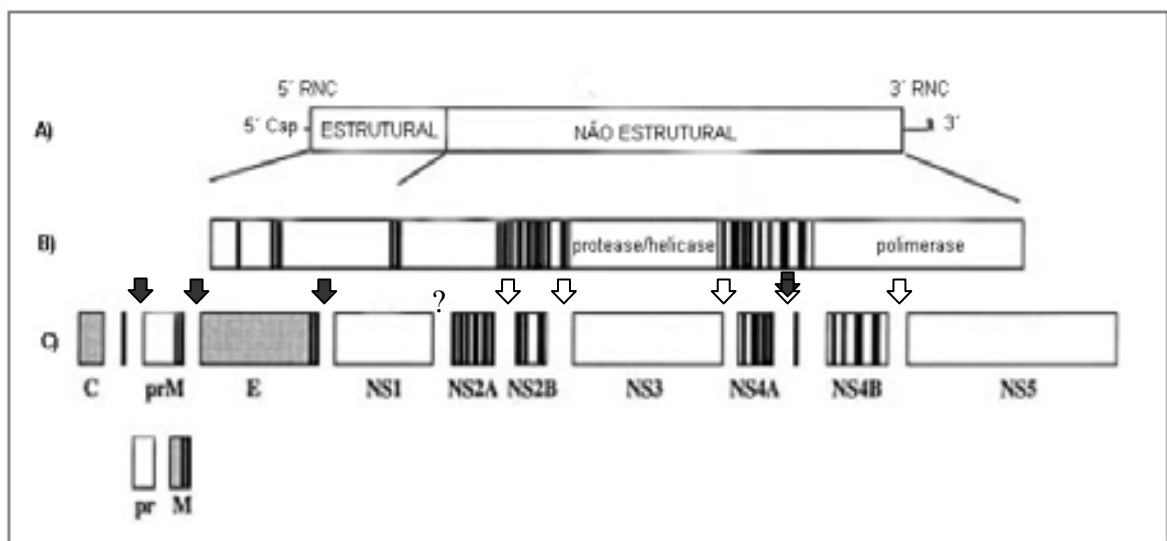


Figura 2. Organização genômica dos Flavivírus – adaptado de Chambers et al. (1990), Lindenbach & Rice (2002). A) Genoma viral dos Flavivírus com regiões que codificam proteínas estruturais e não estruturais, regiões cap 5' e 3' e regiões não codificantes RNC; B) Tradução e processamento da poliproteína; As setas pretas representam os sítios de clivagem pela signalase. C) Precusores e proteínas gerados pela clivagem proteolítica da poliproteína, proteínas estruturais em cinza e não estruturais em branco e preto. As setas brancas representam os sítios de clivagem pela protease viral. A atividade proteolítica responsável pela clivagem entre NS1 e 2A ainda não é conhecida.

## **Proteínas estruturais**

A proteína C constitui o capsídeo viral. Possui massa molecular de 12-14 kDa, e resíduos básicos que mediam a interação com o RNA genômico formando o complexo ribonucleoproteína (Lindenbach & Rice 2002). A proteína C nascente contém na região carboxi – terminal uma âncora membranosa hidrofóbica que serve como peptídeo sinal para translocação da prM dentro do lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER). Este domínio hidrofóbico é clivado para proteína C madura por uma serina protease viral (Heinz & Allison 2003).

A proteína prM é uma glicoproteína precursora da proteína M. Possui massa molecular de 18 a 19 kDa. Morfologicamente, encontra-se na forma de um heterodímero estável com a proteína E. Esta é translocada dentro do lúmen do RE pelo domínio hidrofóbico C-terminal da proteína C e sofre clivagens pela peptidase sinal do hospedeiro para ser liberada e removida do capsídeo (Lindenbach & Rice 2003). A clivagem proteolítica de prM em M ocorre durante a maturação ou liberação do vírus da célula e parece ser crucial para o evento terminal da morfogênese viral (Henchal & Putnak 1990). A função da prM é estabilizar a proteína E, impedindo a exposição prematura do peptídeo de fusão ao pH reduzido encontrado na via exocítica. A retenção da proteína prM pode afetar a conformação e antigenicidade da proteína E, e reduzir a infectividade viral inibindo a fusão viral (Heinz & Allison 2003). A proteína M (8 kDa) encontra-se presente na superfície do vírion maduro e admite-se que a sua formação seja necessária para a geração da atividade de fusão do envelope viral (Mukhopadhyaya et al 2005).

A proteína E é a maior proteína de superfície do vírus com massa molecular 51-60 kDa constitui a glicoproteína do envelope viral, altamente conservada entre os flavivírus e apresenta um importante papel na infectividade do vírion, sendo responsável pela ligação

da partícula viral à célula e fusão com a membrana endossomal em pH ácido. Possui atividade hemaglutinante e é indutora de anticorpos neutralizantes, sendo o principal alvo da resposta imunoprotetora no hospedeiro vertebrado (Roehring 2003). É sintetizada como uma proteína de membrana tipo I, contendo 12 cisteínas conservadas que formam pontes dissulfeto (Heinz & Allison 2003).

A estrutura cristalizada de um fragmento solúvel da proteína E do DENV-3 foi determinada (Modis et al. 2004), a qual apresentou estrutura semelhante ao TBEV descrita anteriormente (Rey et al. 1995). O modelo da proteína E de DENV-3 revelou uma estrutura alongada rica em folhas  $\beta$ , formando um homodímero (“head-to-tail”). Cada subunidade é composta de três domínios: o domínio I, as cadeias  $\beta$  predominam com uma estrutura dando a forma de um Barril  $\beta$  e eixo orientado em paralelo à membrana viral; o domínio II é uma estrutura alongada semelhante a um “dedo”, que é composta de duas alças descontínuas estendidas do domínio I. Uma dessas alças é estabilizada por três pontes dissulfetos e formam uma ponta que interage com pontos hidrofóbicos providos de resíduos adjacentes da junção dos domínios I e III do segundo monômero a qual se projeta ao longo da superfície do vírus. A alça que constitui esta ponta é altamente conservada entre todos os flavivírus e funciona como um peptídeo de fusão interno. O domínio III é uma região constante semelhante uma imunoglobulina, que se supõem ser uma região de ligação ao receptor com uma série de determinantes de virulência e neutralização (Rey et al. 1995, Mandl et al. 2000, Modis et al. 2005) (Figura 3).

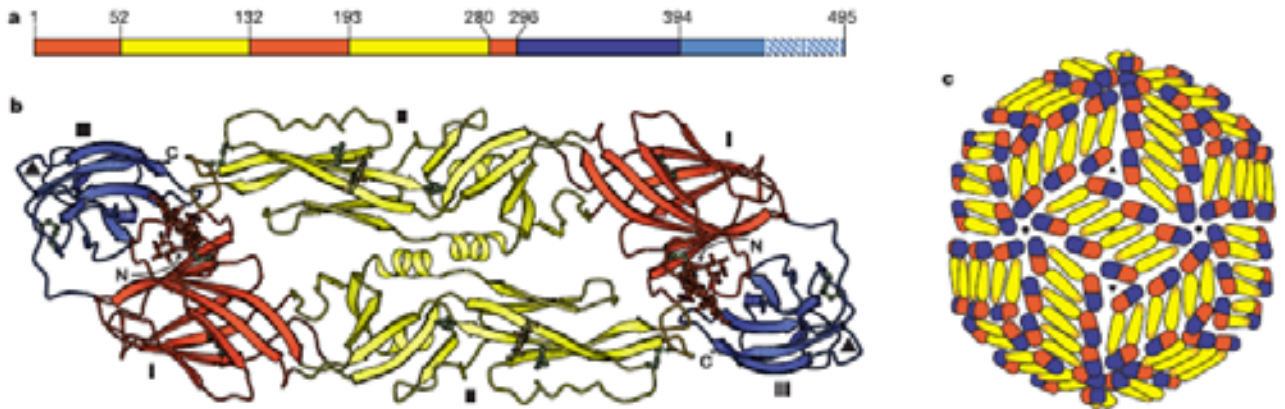


Figura 3. Estrutura tridimensional dos domínios do fragmento solúvel da proteína E. a) os domínios representados pela cor vermelha DI, amarelo DII e azul DIII; b) conformação dos três domínios de E na partícula do virion maduro; c) o empacotamento dos domínios na superfície do virion. Extraído de Modis et al., 2004.

### Proteínas não estruturais

A proteína NS1 é uma glicoproteína com peso molecular de 48 kDa expressa na forma residente no RE, na superfície das células infectadas e na forma solúvel (sNS1), extracelular, sendo esta capaz de induzir resposta imune humoral. Os anticorpos podem direcionar a lise mediada pelo complemento, em células infectadas por flavivírus com a NS1 na superfície e que também é alvo para células T citotóxicas (Henchal et al. 1990, Burke & Monath 2002). Sua função está relacionada com a morfogênese viral, entretanto, não está bem definida ainda qual a função das formas extracelulares da NS1 (Burke & Monath 2002, Lindenbach & Rice 2003). A forma secretada solúvel é constituída de três grupos de dímeros, mantidos juntos por interações hidrofóbicas que podem surgir via seqüestro de interações membranosas, colocadas na superfície dos dímeros de NS1 (Lindenbach & Rice 2003). O processamento proteolítico da junção das proteínas NS1/NS2A ocorre por uma enzima do hospedeiro desconhecida residente no RE. Esta proteína é altamente hidrofílica e não contém domínios transmembrana, porém a natureza

desta associação com membranas é controversa. A NS1 contém dois ou três sítios de N-glicosilação N130 e N207, os quais demonstraram ser requeridos para a replicação viral em células de mosquito, e 12 cisteínas conservadas que formam pontes dissulfetos (Crabtree et al. 2005).

Bem menos caracterizadas são as pequenas proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A e NS4B. A NS2A tem sido implicada no processamento de NS1 que juntamente com a NS4A e NS4B estariam envolvidas no processo da replicação viral. A região N-terminal da NS2A é gerada via clivagem da NS1-2A por uma enzima do hospedeiro residente no RE ainda desconhecida (Lindenbach & Rice 2002). A região C-terminal é gerada pela clivagem pela serina protease viral, no citoplasma da célula hospedeira.

A região C terminal da NS4A age como uma seqüência sinal para a translocação da NS4B para dentro do lúmen do RE. A proteína NS4B é uma proteína transmembrana que está localizada em sítios de replicação e no núcleo. Esta proteína é modificada após a tradução para uma forma que migra muito rapidamente em SDS-PAGE (Chambers et al. 1990). Recentemente, foi demonstrado que NS4B e, em menor extensão NS2A e NS4A, são capazes de bloquear a sinalização de IFN beta e gama (Clyde et al. 2006).

A NS2B possui massa molecular de 14 kDa. É uma proteína associada à membrana do retículo endoplasmático, forma um complexo com NS3 requerido como co-fator para função de serina protease de NS3 e está contida em uma região hidrofílica central conservada de 40 resíduos (Lindenbach & Rice 2002).

A proteína NS3 é a segunda maior proteína viral (68-70 kDa), e também muito conservada entre os flavivírus e não contém uma cadeia hidrofóbica longa. Postula-se que tenha atividade enzimática multifuncional contendo pelo menos duas atividades enzimáticas (protease e helicase) envolvidas no processamento da poliproteína e replicação

do RNA. NS3 também exibe a nucleosídeo trifosfatase e helicase função requerida para a síntese de vRNA (Li et al. 1999).

A maior e a mais conservada proteína viral é a NS5 (103-104 kDa), contém homologia de seqüência com RNA polimerase RNA dependente (RdRPs) de outros vírus RNA fita positiva, possuindo função de RNA polimerase, e com o motif Gly-Asp-Asp (GDD) comum dessas enzimas (Henchal & Putnak 1990).

### **Domínios da proteína E e a entrada do vírus na célula**

O domínio III do envelope viral tem sido proposto ser o domínio receptor de ligação da célula dos flavivírus e consiste de 100 resíduos de aminoácidos (posição 300-400 da proteína E), sendo expresso como proteína de fusão e também reconhecido por anticorpos policlonais e monoclonais (Halstead et al. 2005). Mutações que levaram ao escape de neutralização de anticorpos têm sido determinadas usando anticorpos monoclonais (MAbs) subtipo e sorotipo específicos (Roehrig 2003). A substituição de um simples aminoácido pode ter um grande efeito no reconhecimento de epítomos de neutralização dos vírions. Seis regiões de neutralização na proteína E foram mapeadas em todos os três domínios estruturais (DI, DII e DIII), entretanto os MAbs específicos do DIII foram os bloqueadores mais potentes da adsorção do vírus na célula (Crill & Roehrig 2001). As regiões de neutralização foram: 1) aa de 67-72 e aa 112, 2) aa de 123-128, 3) aa 155 e 158, 4) aa 171, 181 a 293, 5) aa 52, 136 e 270-279, 6) aa 307-311 333, 384 e 385. A variação de um subgrupo de 56 resíduos não conservados expostos na superfície viral de diferentes sorotipos de dengue, provavelmente, seriam os pontos de ligação de anticorpos (Modis et al. 2005). Estes cobrem a maioria dos epítomos responsáveis pela neutralização por anticorpos monoclonais e incluem os resíduos 291, 305 e 381 a 383 (Hiramatsu et al.

1996, Hung et al. 2004, Modis et al. 2004, Zulueta et al. 2006). Uma asparagina no resíduo 388 parece ser causa de aumento na incidência de FHD, enquanto que aminoácidos carregados nesse resíduo reduzem a virulência (Leitmeyer et al. 1999). Essas mutações reforçam a significância do DIII como proposto receptor de ligação.

Admite-se que a entrada do vírus dengue na célula deve empregar receptores vírus específicos e demais estruturas. A primeira linha de receptores parecem ser os receptores de baixa afinidade, tal como o DC-SIGN de células dendríticas imaturas, e o Vírus-IgG-FcR (Halstead et al. 2005). DC-SIGN pode mediar a infecção dos quatro DENV, e a expressão ectópica confere a permissibilidade para a infecção (Tassaneetrithep et al. 2003). Um segundo receptor menos comum e de alta afinidade, deve interagir com DIII e, juntamente com um terceiro receptor que reconhece o DII, promove a fusão da membrana do vírus com a membrana celular (Clyde et al. 2006). Os monócitos/macrófagos e as células dendríticas imaturas têm sido propostas como os principais alvos para a replicação dos vírus dengue (Chen & Wang 2002). A ligação da proteína E a receptores celulares induz a formação de vesículas endocíticas recobertas por clatrina. Após a internalização por endocitose, mediada por receptor, os vírus são liberados no citoplasma por mudanças conformacionais induzidas por pH ácido, que levam à exposição do peptídeo de fusão (Heinz & Allison 2003). Estas alterações causam a trimerização da proteína E (Modis et al. 2004).

O nucleocapsídeo é liberado no citoplasma por meio de fusão do envelope com a membrana de vesículas endocíticas, catalizada por baixo pH (Modis et al. 2004).

No citoplasma da célula hospedeira, o genoma de RNA positivo serve como mRNA para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais e também como molde para a síntese de uma fita complementar negativa que, por sua vez, servirá de molde para a síntese de mais fitas positivas a serem utilizadas na montagem de novas partículas virais. A

replicação é um processo semiconservativo e envolvem intermediários e formas replicativas intermediárias (dupla fita) (Fields 2001).

A montagem das partículas virais ocorre em íntima associação com o RE das células hospedeiras. O domínio citoplasmático, altamente básico, da proteína C interage com o RNA genômico viral para formar o nucleocapsídeo precursor. As proteínas prM e E são deslocadas para o RE, posicionando seus domínios carboxi-terminal hidrofóbicos na bicamada lipídica. A formação das partículas virais ocorre através do revestimento do nucleocapsídeo viral com as proteínas do envelope, ancoradas na membrana do RE celular. A clivagem de prM ocorre provavelmente próximo ou durante a liberação do vírus, já que não se detecta proteína M nas partículas intracelulares e pode estar relacionada com o desencadeamento de mudanças no envelope que promovem a infectividade (Fields 2001). Os vírus brotam para a luz do RE adquirindo uma membrana lipídica (envelope), assim, os vírus se mantêm solúveis nas cisternas do RE. A progênie viral é transportada em vesículas para a membrana plasmática e daí liberadas por exocitose através do sistema de Golgi (Chambers et al. 1990).

## **IMUNOPATOLOGIA**

A dengue apresenta um amplo espectro clínico, sendo a maioria das infecções subclínica, e entre os casos sintomáticos a dengue clássica (DC) é a forma mais comum. A DC é caracterizada por doença febril aguda com duração de 3-7 dias, acompanhada principalmente por dor de cabeça, mialgia e exantema. A FHD representa a forma clínica grave da doença e ocorre em torno de 3% dos infectados (Halstead 1980), a qual é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular levando ao extravasamento de plasma, alteração de número e função de leucócitos e trombocitopenia (WHO, 1997). A

infecção provocada por cada um dos quatro sorotipos da dengue produz imunidade protetora e duradoura e, uma imunidade heteróloga por pequena duração (Shu & Huang 2004).

O mecanismo imunopatológico que leva ao desenvolvimento da FHD, ainda não está completamente estabelecido, sendo o maior desafio para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Rothmann 2004, Clyde et al. 2006).

Diferentes hipóteses têm sido aventadas na tentativa da elucidação do agravamento da dengue. O mecanismo da amplificação da infecção dependente de anticorpos (*ADE antibody – dependent enhancement*) postulada por Halstead (1988), propõe que a infecção sequencial por diferentes sorotipos virais aumenta o risco para FHD/SCD pela presença de anticorpos heterólogos preexistentes, sub-neutralizantes os quais formam imunocomplexos com o vírus. Estes são reconhecidos e internalizados com maior eficiência por monócitos, propiciando maior replicação viral. Esta teoria foi também admitida em vários estudos que descrevem casos de FHD em infecção secundária (Sangkawibha et al. 1984, Thein et al. 1997, Vaughn et al. 2000, Guzman 2005, Alvarez et al. 2006, Pang et al. 2007).

Pela teoria de Rosen (1977) a evolução genética dos vírus, submetidos à uma pressão seletiva, possibilitou o aparecimento de variantes mais virulentas dentro dos sorotipos virais de dengue, que poderiam ser responsáveis pela variabilidade na expressão clínica da doença, determinando o maior ou menor potencial epidêmico de FHD/SCD. Kouri et al. (1987) decreveram sobre a virulência viral como fator de risco para FHD. Evidências dessa teoria foram demonstradas em estudos consistentes na Ásia e América do Sul pela associação de FHD com específicos sorotipos e/ou genótipos (Rico-Hesse 1997, Watts et al. 1999, Leitmeyer et al. 1999, Messer et al. 2003). Cepas de DEN-2 autóctones do continente americano se relacionam com epidemias de febre da dengue, enquanto cepas

asiáticas estão associadas com epidemias de FHD (Torres 2005). Outros autores consideram que a introdução de um novo genótipo viral seria fator de risco para FHD (McBride & Bielefeldt-Ohmann 2000), porém Stephenson (2005) descreve que as evidências de associação do prognóstico clínico com genótipo viral são tênues até o presente. Halstead (2006) argumenta que o genótipo Americano do DENV-2 falhou em causar FHD pela neutralização cruzada pelo DENV-1, em epidemias anteriores e que no contexto de duas infecções, a suscetibilidade do hospedeiro é modificada por uma infecção prévia, não havendo regra básica para a virulência viral.

Por outro lado, Kouri et al. (1989) descreveram que o desencadeamento de FHD/SCD possa ser consequência de um mecanismo complexo envolvendo fatores de risco atribuídos ao hospedeiro, à virulência viral e à epidemiologia da doença, abrangendo as teorias de Rosen e Halstead e considerando outras variáveis, tais como: idade, sexo, raça, estado nutricional, doenças crônicas, intensidade da resposta imune, ampla circulação do vírus, seqüência de sorotipos circulantes, como possíveis determinantes da gravidade clínica da dengue (Torres 2005). A alta densidade do vetor e a elevada circulação viral em uma população suscetível seriam necessárias para aumentar o número de casos de FHD (Kouri et al. 1987, Guzman & Kouri 2002).

Para explicar a imunopatogênese da dengue Rothman & Ennis, (1999) descreveram ativação do sistema imune inato e adaptativo durante a infecção. O principal alvo para a resposta imune ao dengue é a proteína E, componente da superfície externa do vírion e a proteína NS1 na forma secretada é expressa na superfície das células infectadas e induzem imunidade protetiva (Kuhn et al. 2002, Young et al. 2000). Entretanto, a ativação das células de memória por uma re-infecção por sorotipo diferente, leva a uma cascata de ativação celular e verdadeira ‘tempestade’ de citocinas inflamatórias (Pang et al. 2007). A formação de imunocomplexos durante a interação com as células apresentadoras de

antígeno - APC (monócitos, macrófagos e células dendríticas) infectadas levaria à ativação maciça de linfócitos T. No contexto, o imunocomplexo (vírus-anticorpo subneutralizante) se liga ao receptor Fc para IgG na superfície de monócitos facilitando a internalização viral e a infecção destas células, permitindo a ativação aumentada de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Kurane & Ennis 1994, Libraty et al. 2002). Foi demonstrado que durante a fase aguda da dengue os macrófagos, após o reconhecimento do antígeno, liberam TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-1, IL-6, fator ativador de plaquetas e histamina. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados passam a produzir altos níveis de IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6 e TNF $\alpha$  que poderiam vir a induzir o extravasamento de plasma por múltiplos efeitos sobre o endotélio vascular, com envolvimento do sistema complemento, bem como pela ativação de monócitos, linfócitos e plaquetas (McBride & Bielefeldt-Ohmann 2000, Mangada et al. 2002, Mongkolsapaya et al. 2003, Pang et al. 2007). Em casos de FHD foram evidenciados níveis aumentados de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$ , quando comparados com quadros de dengue clássica. Uma explicação chave para a associação das citocinas com FHD inclui a mudança da resposta de tipo Th1 na dengue clássica para Th2 na FHD com aumento dos níveis de IL-10 e IL-4 (Chaturvedi et al. 1999, 2006). Recentemente, células T regulatórias CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) (Treg) têm sido avaliadas em casos clínicos de diferente gravidade. Os resultados sugerem que pacientes com doença leve teriam maiores taxas de células T regulatórias, quando comparados com os casos graves. Assim as células Treg seriam capazes de suprimir a produção de citocinas vasoativas estimuladas por infecção aguda pelo vírus da dengue (Luhn et al. 2007). Todas essas evidências apontam para o importante papel das citocinas e mediadores químicos na exacerbação da cascata de eventos inflamatórios na dengue (McBride & Bielefeldt-Ohmann 2000, Stephenson 2005, Torres 2005). Fatores genéticos individuais e de populações foram vistos com diferentes níveis de suscetibilidade às doenças. Polimorfismos na região do gene HLA de classe I estão

associados com suscetibilidade para FHD. Alguns autores têm documentado correlação de tipos de HLA (HLA-A, HLA-B-alvo, HLA-CW1) com formas mais graves de dengue, bem como outros tipos de HLA (HLA-B13, HLA-B14) que se associam com formas mais leves da doença (Clyde et al. 2006, Sierra et al. 2007). A expressão de genes inflamatórios incluindo IFN- $\gamma$  e IL-12A foi demonstrada em crianças com infecção grave por dengue, e, o perfil de *Toll-like receptors* foi diferentemente ativado com aumento da expressão de TL7 e TL4R3, ambos incrementando a resposta anti-viral em associação com efusão pleural e manifestações hemorrágicas (Kruif et al. 2008).

## **DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

A confirmação diagnóstica e o manejo clínico são considerados de fundamental importância nas áreas afetadas pela doença (WHO/TDR 2006). O diagnóstico da infecção pelo vírus baseia-se na pesquisa de anticorpos ou do vírus, utilizando-se o método específico de acordo com o estágio de infecção. Antígenos e partículas virais são detectáveis no sangue cerca de três dias antes e até cinco depois do aparecimento da febre, com decréscimo na concentração à medida que os anticorpos são produzidos e aparecem na circulação (Guzman et al. 2004). As técnicas rotineiramente usadas para o diagnóstico da infecção por dengue são: o isolamento viral e a detecção de anticorpos vírus específico. Com os recentes avanços de técnicas moleculares e de técnicas de detecção rápida, novas ferramentas diagnósticas estão se tornando mais disponíveis aos laboratórios (Shu & Huang 2004, WHO/TDR 2006).

No âmbito da vigilância laboratorial, uma Rede Nacional de Diagnóstico em Dengue, com base nos Laboratórios de Saúde Pública (LACENS) de referência nos

Estados, e laboratórios de referência nacionais o Instituto Evandro Chagas (IEC) e Instituto Oswaldo Cruz (IOC), conforme o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) e sob a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB) da Secretaria de Vigilância a Saúde/MS. Como diagnóstico de rotina são realizados o isolamento viral em cultura celular e a sorologia pela técnica imunoenzimática, baseada na captura de anticorpos IgM - MAC-ELISA. Casos de dengue são notificados por vigilância passiva e encaminhados para confirmação diagnóstica e monitoramento da circulação de sorotipos. A técnica de RT-PCR descrita por Lanciotti et al (1992) é a mais amplamente utilizada e vem sendo implantada nos LACENs,

Recentes revisões sobre o diagnóstico laboratorial da dengue relatam as metodologias mais rotineiramente usadas e os avanços em técnicas diagnósticas (De Paula & Fonseca 2004, Shu & Huang 2004, Kao et al. 2005, Clyde et al. 2006, TDR/SWG/2006).

### **Isolamento viral**

Dentre os sistemas de isolamento viral para dengue, a inoculação intratorácica em mosquitos adultos (*Toxorhynchites amboinensis* e *Toxorhynchites splendens*) é o método mais sensível para a confirmação de dengue, entretanto, culturas de células de mosquito linhagem C6/36 do mosquito *Ae. albopictus*, AP-61 do mosquito *Ae. pseudoscutellaris* e TRA-284 do mosquito *Tx. amboinensis* são as mais utilizadas (Varma et al. 1974, Igarashi 1978, Kuno 1982). Destas linhagens, a cultura celular C6/36 tem sido a mais empregada em laboratório por ser altamente permissiva à infecção pelos vírus dengue, de fácil manutenção, podendo ser mantida em temperatura ambiente, e sendo ideal para a rotina de vigilância virológica (Nogueira et al. 1988, Gubler 1998, Miagostovich et al. 1993). Os sinais de multiplicação viral podem ser observados pela presença de efeito citopático (ECP) na monocamada de células, sendo a confirmação e a identificação dos sorotipos

virais realizada pela técnica de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos (Gubler et al. 1984). Algumas amostras não são facilmente identificadas pela baixa concentração de vírus no sangue. A viremia é curta variando entre 2 -3 dias antes dos sintomas até 4-5 dias de doença (WHO/TDR 2006).

### **Testes moleculares**

Técnicas moleculares baseadas na detecção de seqüências genômicas por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), têm se tornado as técnicas mais importantes no diagnóstico de dengue. Possibilita um rápido e sensível diagnóstico, podendo ser, inclusive, utilizada na vigilância entomológica e estudos moleculares (Shu & Huang 2004, Guzman & Kouri 2004). O RNA viral tem sido detectado no soro, plasma, pool de mosquitos infectados, células infectadas, papel de filtro e fragmentos de tecidos parafinados (Suk-Yin et al. 1994, Rosário et al. 1998, Sariol et al. 1999, Guzman & Kouri 2004, De Oliveira Poersch et al. 2005, Klugthong et al. 2007). Vários protocolos de PCR têm sido desenvolvidos para detecção e tipagem dos quatro sorotipos virais, os quais também variam na posição genômica dos primers e sensibilidade e especificidade (Lanciotti et al. 1992, Brow et al. 1996, Figueiredo et al. 1997, Harris et al. 1998, Singh et al. 2006). A RT-PCR baseada em duas etapas, a RT nested PCR (RT-NPCR) descrita por Lanciotti et al. (1992) é a técnica rotineiramente utilizada em laboratórios nas Américas (Shu & Huang, 2004, Kao et al. 2005). A comparação da detecção viral por imunofluorescência e RT-PCR após a inoculação de DENV-1 em cultura de células C636 realizada por De Paula & Fonseca (2004), mostrou que a associação de RT-PCR e isolamento em cultura de células aumenta significativamente a sensibilidade diagnóstica.

A RT-PCR em tempo real é uma técnica de amplificação genômica que produz medidas quantitativas da carga viral. Completamente automatizada, tem a vantagem de ter baixa contaminação e alta sensibilidade (Callahan et al 2001, Shu & Huang 2004). A técnica utiliza um par de primers e sondas específicos para cada sorotipo de dengue. Outra vantagem sobre a PCR tradicional é que a coleta de dados é feita na fase exponencial da reação, refletindo através de um sinal fluorescente o número de produtos gerados, não necessitando de eletroforese (Callahan et al 2001, Lindegren et al. 2005). Uma maior sensibilidade da PCR em tempo real em relação ao PCR convencional foi relatada em alguns estudos (Ito et al. 2004, Levi et al. 2007). A desvantagem desta técnica é referente a produção de primers e à perfeita combinação de primers e seqüência de sondas (WHO/TDR 2006).

### **Diagnóstico sorológico**

O teste de inibição da hemaglutinação (IH) possui uma metodologia simples capaz de determinar infecção passada ou infecção aguda pela conversão sorológica em soros pareados, de grande valor diagnóstico (Vordam & Kuno 1997, Miagostovich et al. 1999). Os anticorpos IH persistem por longos períodos, sendo largamente utilizado em inquéritos soroepidemiológicos. É uma técnica sensível, e aplicável para diferenciação de infecção primária e secundária, entretanto, a necessidade de amostras pareadas e a baixa especificidade do teste para discriminar resposta entre os diferentes flavivírus limitaram seu uso (WHO 1997).

O teste de soroneutralização por redução em placas (TNRP) é um método útil para detectar e quantificar os níveis de anticorpos anti-dengue sorotipo-específico em estudos soroepidemiológicos e de determinação de imunidade pós-vacinal (Russell & McCown 1972). A alta sensibilidade e especificidade do teste e a estabilidade dos anticorpos

neutralizantes determinam a importância deste teste para estudos de soroprevalência. Entretanto, esta técnica exige recursos humanos treinados e manuseio cuidadoso das culturas celulares nas diferentes etapas do teste, com dispendioso tempo de execução o que restringe o seu uso em larga escala (Vorndam & Kuno 2001, Kao et al. 2005).

O diagnóstico sorológico através de ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) (Kuno et al. 1987) é o método de rotina para o diagnóstico de dengue. É uma técnica de simples processamento, tem alta sensibilidade e especificidade e necessita de uma única amostra de soro, a partir do quinto dia de doença, quando 80% dos casos têm anticorpos IgM detectáveis. A presença desses anticorpos confirma infecção ativa ou recente por dengue (Travassos da Rosa et al. 1994, WHO 1997). Em geral tem 10% de falso negativo e 1,7% de falso positivo tem sido observado. A limitação deste teste inclui a especificidade dos antígenos e a reatividade cruzada entre os flavivírus circulantes (WHO/TDR 2006).

A técnica para detecção de IgG anti-dengue também tem sido utilizada para determinar infecção passada por dengue, correspondendo à sensibilidade do IH, entretanto, revela ter melhor especificidade, sendo utilizado para definição de infecção primária e secundária (Cardosa et al. 2002). O uso de polipeptídeos recombinantes da proteína do envelope viral tem sido sugerido para melhorar substancialmente a sensibilidade do MAC-ELISA e ELISA indireto (Videa et al. 2005) e do IgG ELISA (Dos Santos et al. 2004). A determinação de avidéz em testes IgG ELISA também propõe a classificação da infecção em primária e secundária e tende a ser mais utilizado que o IH nesta proposta (De Souza et al 2007, Matheus et al. 2005).

Diferentes kits comerciais para detecção de anti-IgM e anti-IgG baseados em ensaio imunoenzimático, dot-ELISA, ultramicroELISA e imunocromatografia têm sido disponibilizados para o diagnóstico de dengue, e foram comparados quanto à sensibilidade

e especificidade frente a técnicas padrão (Kuno et al. 1998, Vaughn et al. 1999, Chakravarti et al. 2000, Poersch et al. 2005, Abhyankar et al. 2006). Alguns kits têm demonstrado bom desempenho nos estudos e determinado a classificação de infecção primária e secundária baseados na razão entre IgM/IgG (Vaughn et al. 1999, Falconar et al. 2006).

Testes utilizando imunocromatografia para detecção de anticorpos IgM anti dengue têm sido avaliados e o diagnóstico mais acurado foi maior nas amostras de fase aguda mais tardia. Na diferenciação de infecção primária e secundária a sensibilidade variou entre 61-77%, e a especificidade foi aceitável (Blacksell et al. 2006).

### **Avanços nas técnicas diagnósticas**

A pesquisa do antígeno viral NS1 e anticorpos anti-NS1 é inovadora na determinação de infecção por dengue. A NS1 é uma glicoproteína produzida e secretada durante a replicação viral e aparece precocemente depois de um dia do início da febre e declina depois de 5 a 6 dias de doença. Por este motivo estudos têm sido dedicados à utilização de antígeno NS1 para o diagnóstico de dengue. Testes de ELISA estão sendo disponibilizados para captura de AgNS1, os quais apresentam sensibilidade de 88,7% a 97,4%, sendo indicados como diagnóstico de primeira linha por possibilitar a detecção precoce da infecção durante a viremia, período onde os anticorpos não estão detectáveis e quando apenas o isolamento viral e a RT-PCR poderiam confirmar a infecção por dengue (Young et al. 2000, Alcon et al. 2002, Dussart et al. 2006, Kumarasamy et al. 2007). Esses estudos também identificaram a correlação entre a gravidade da doença e o nível de antígeno NS1 no soro. A identificação dos sorotipos virais, utilizando anticorpos monoclonais para a captura de antígeno NS1 e a determinação de infecção primária e

secundária pela técnica de ELISA indireta IgG-NS1, têm sido desenvolvidas estão sendo disponibilizadas como kits comerciais (Xu et al. 2006, Shu et al. 2003, WHO/TDR 2006).

A citometria de fluxo (FACS - fluorescence activation-cells sorting) tem sido utilizada para detecção de DENV em células infectadas (Lambeth et al. 2005). Este método mostrou ter vantagens com relação à TNRP por reduzir o tempo de infecção das células de 5-7 dias para 24 horas e poder titular amostras clínicas que freqüentemente não formam placas em monocamadas de células.

Novas tecnologias estão sendo apresentadas para o diagnóstico baseado em quimioluminescência (biosensores de fibra ótica) para detectar vírion, genoma e anticorpos anti-dengue (Salama et al. 2004, WHO/TDR 2006).

A tecnologia de antígenos recombinantes (Dos Santos et al. 2004) e anticorpos monoclonais (Bedouelle et al. 2006) também está sendo usada para a produção de kits diagnósticos para detecção de anticorpos anti-dengue IgM, IgG, IgA e IgE no soro e saliva de pacientes infectados, para aumentar a sensibilidade e especificidade do método.

A imunotécnica baseada na ligação de antígenos e anticorpos em microesferas (MIAs) com detecção por um simplificado aparelho de citometria de fluxo (WHO/TDR 2006), oferece a vantagem de ser mais rápida que o MAC-ELISA, podendo ser usada para avaliar respostas de anticorpos para múltiplos vírus.

O avanço nos métodos diagnósticos sorológicos e moleculares tem melhorado significativamente a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da infecção pelos vírus dengue. Um diagnóstico rápido, precoce e acessível, e que possa inferir sobre o prognóstico da doença, ainda é necessário. Espera-se que a disponibilização de novos métodos venha contribuir com a confirmação diagnóstica e vigilância epidemiológica fundamentais para o tratamento e controle da doença (Shu & Huang 2004, Gúzman & Kouri 2004, WHO/TDR 2006).

## **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR**

O advento da biologia molecular tem possibilitado o desenvolvimento em vários campos da ciência e tecnologia, mais precisamente, na caracterização genômica de diferentes microrganismos (Nogueira et al. 2000, Whitley 2008). Com o avanço e disponibilização dos métodos de sequenciamento genômico houve, simultaneamente, um aumento do número de cepas analisadas e a necessidade do desenvolvimento de métodos estatísticos e filogenéticos para determinar as relações entre seqüências. Estas análises exigem muitos recursos computacionais, os quais têm sido desenvolvidos com o advento da Bioinformática.

A epidemiologia molecular do DENV tem especial papel não somente na identificação de sorotipos, genótipos e vigilância viral, mas também em esclarecer sobre a variação genética dos vírus e a sua importância clínica e epidemiológica (Holmes 1998, Nogueira et al. 2000, Rico-Hesse 2003).

O sequenciamento genômico dos vírus dengue, o uso de anticorpos monoclonais neutralizantes e a citometria de fluxo são algumas técnicas importantes na determinação da diversidade genética dos DENV, permitindo monitoramento da emergência de cepas com potencial epidêmico e a determinação de pontos de neutralização viral com implicações diretas no desenvolvimento de vacinas (King et al. 2008).

### **Variação genômica e antigênica dos vírus dengue**

Os quatro sorotipos de dengue foram primeiramente reconhecidos por diferenças antigênicas e biológicas com base em técnicas de soroneutralização (Russel & McCown 1972).

Diferentes metodologias foram utilizadas na análise antigênica dos vírus dengue, entretanto, evidências da variabilidade genômica entre os DENV do mesmo sorotipo foram determinadas em estudos de “fingerprinting” do RNA viral (Veza et al. 1980, Trent et al. 1990), formando grupamentos resultantes denominados “topotipos”.

Na década de 80, o desenvolvimento de novas técnicas em biologia molecular permitiu o sequenciamento genômico parcial dos vírus dengue, determinando seqüências relativamente pequenas (240 nt) da região da junção E/NS1 (Blok et al. 1989, Chu et al. 1989, Rico-Hesse 1990) entretanto, caracterizaram genótipos intra-típicos: cinco para DENV-1 e cinco para DENV-2 (Rico-Hesse 1990), quatro para DENV-3 e dois genótipos para DENV-4 (Lanciotti et al. 1994, 1997). O sequenciamento completo dos quatro sorotipos de dengue (Deubel et al. 1986, Zhao et al. 1988, Osatomi et al. 1990, Gonçalves et al. 2002) possibilitou a análise da homologia entre isolados de várias regiões geográficas do mundo e mostrou uma diversidade genética de nucleotídeos em torno de 5% (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos genótipos do DENV de acordo com diferentes autores.

<i>Sorotipo</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Referências</i>
DENV-1	I Américas, África e Sudeste da Ásia; II Sri Lanka; III Japão; IV Sudeste da África, Sul do Pacífico, Austrália e México; V Taiwan e Tailândia	Rico-Hesse 1990 Gonçalves et al. 2002
DENV-2	I Caribe e Sul do Pacífico; II Taiwan, Filipinas, Nova Guiné e Tailândia III Vietnã, Jamaica e Tailândia; IV Indonésia, Seychelles, Burkina Faso e Sri Lanka; V África	Rico-Hesse 1990 Rico-Hesse 1997
DENV-3	I Indonésia, Malásia, Filipinas e Ilhas do Pacífico Sul; II Tailândia; III Sri Lanka, Índia, África e Samoa; IV Porto Rico e Tahiti	Lanciotti et al. 1994
DENV-4	I Filipinas, Tailândia e Sri Lanka; II Ilhas do Caribe e América Central.	Lanciotti et al. 1997

Fonte: adaptado de Gúzman & Kouri 2004.

A homologia encontrada entre seqüências de aminoácidos os vírus dengue foi de 63% a 68% comparada com 44% a 51% entre os DENV e os vírus da febre amarela e febre no Nilo. Nas cepas de DENV-2, a similaridade genética excede 90% (Gubler et al. 2006).

Os vírus dengue também foram classificados em genótipos ou subtipos genômicos a partir de diferentes padrões eletroforéticos determinados pela reação em cadeia da polimerase baseada em sítios de restrição específicos (RSS-PCR) com a amplificação do cDNA viral após a RT-PCR, utilizando quatro iniciadores que anelam em diferentes regiões do gene E entre sítios de restrição polimórficos. Por este método, foram caracterizados sete subtipos para DENV-2 e três para DENV-3 (Harris et al 1999), quatro para DENV-1 e três para DENV-4 (Miagostovich et al. 2000) os quais correspondem aos genótipos caracterizados por sequenciamento genômico.

Estudos sobre a epidemiologia molecular dos vírus dengue analisam as variações de virulência entre genótipos dentro de um mesmo sorotipo e a associação com epidemias de maior ou menor gravidade (Lanciotti et al. 1994, Rico-Hesse 1997, 2003, Messer et al. 2003).

Watts et al. (1999) relataram em um estudo no Peru, casos de infecção secundária sem o aparecimento de FHD quando circulou o genótipo do DENV-2 menos virulento (American). No Caribe a introdução do genótipo mais virulento (Asian) deslocou o genótipo autóctone, americano, havendo relatos das primeiras epidemias de FHD nas Américas (Rico-Hesse 1997, Guzman & Kouri 2002).

Outros estudos demonstraram que o genótipo asiático do DENV-2 replicou em maiores títulos do que o genótipo americano em monócitos/macrófagos (Mo) e células dendrídicas (DC) (Cologna et al. 2003). O sequenciamento completo do genótipo asiático e do americano revelou mutações na proteína E390 (N→D), a qual se relacionava à redução de replicação viral observada no genótipo americano (Leitmeyer et al. 1999).

Considerando a epidemiologia do DENV-3, Messer et al. (2003) mostraram a circulação de um novo variante do DENV-3, genótipo III, associada ao aparecimento de FHD em Sri Lanka em 1989 com dispersão pelo subcontinente indiano e África e, então, para a América Latina. O DENV-3 (posteriormente caracterizado como genótipo III) reapareceu nas Américas a partir de 1994 na Nicarágua e Panamá (CDC, 1995), e causando dengue e FHD, atingiu países da América Central, o México, ilhas do Caribe e, por fim na Venezuela e Brasil (Balmaseda et al 1999, Figueroa & Ramos 2000, Usuku et al 2001, Nogueira et al. 2001, Rigau-Perez et al. 2002, Peyrefitte et al. 2003, Uzcategui et al 2003).

Estudos baseados na filogenia do DENV-3 primeiramente caracterizaram quatro genótipos distintos (Lanciotti et al. 1994), sendo identificados pela origem geográfica: Américas, subcontinente indiano, Tailândia e Sudeste Asiático/Pacífico Sul (Rico-Hesse 2003). Não havendo evidência de um grupo silvestre. Recentemente, Wittke et al. (2002) descreveu sobre genótipos que não estão sendo detectados (cepas do genótipo I) e mostrou uma classificação das cepas de DENV-3 em cinco genótipos.

A variação genética do DENV-3 tem sido o enfoque de vários estudos que determinaram mutações na seqüência da proteína do envelope viral pela análise da comparação de seqüências de diferentes localidades (Chunge et al. 1993, Rodriguez-Roche et al. 2005, Miagostovich et al. 2006, Aquino et al. 2006, Podder et al. 2006, King et al. 2008) e em estudos que determinam a antigenicidade e imunogenicidade dos domínios da proteína do envelope viral, com implicação direta no desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos (Wang et al. 2002, Hurrelbrink and McMinn 2003, Khanam et al. 2006, Zulueta et al. 2006).

A seqüência de sorotipos em infecções sucessivas também tem sido considerada como fator de risco para FHD. Alvarez et al. (2006) evidenciaram risco de FHD em

infecção sequencial de DENV-1 e DENV-3, e não demonstram o mesmo em infecções sequenciais com infecção primária pelo DEN-2, seguida de DEN-3. Outros autores também têm citado risco de FHD na seqüência de DEN-1→DEN-2, DEN-3→DEN-2, DEN-4→DEN-2 (Alvarez et al. 2006, Halstead 2006).

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

Alguns estudos que analisaram isolados do DENV-1 e DENV-2 de diferentes regiões no mundo utilizaram amostras brasileiras na identificação de genótipos circulantes (Deubel et al. 1993, Vorndam et al. 1994). Nessas amostras isoladas no Rio de Janeiro foram identificados os genótipos I (Caribe) do DENV-1 e genótipo III (Jamaica) do DENV-2 (Nogueira et al. 2000).

Uma revisão sistemática dos estudos publicados sobre a caracterização molecular dos DENV foi realizada nas bibliotecas da Pubmed, Scielo, Lilacs e Medline, utilizando o cruzamento dos seguintes unitermos: “dengue”, “characterization”, “molecular”, “genotype” e “Brazil”. Foram encontrados 10 estudos (Quadro 1) que caracterizaram amostras de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e a maioria foi realizada na região sudeste país, entre os anos de 2002 a 2008.

Estudos filogenéticos utilizando amostras do DENV-1 e DENV-2 de diferentes regiões do país detectaram a circulação dos genótipos I (Caribe) e III (Sudeste asiático), respectivamente (Dos Santos et al. 2002, Miagostovich et al. 2002, 2003, Santos et al. 2004, Pires Neto et al 2005). Pires Neto et al. (2005) analisou as seqüências da região da junção E/NS1 (240 nt), de amostras DENV-1 e DENV-2 desde 1988, sem encontrar mudanças no perfil genotípico desses vírus, determinando que ambos teriam potencial para desenvolver dengue ou FHD. Santos, et al (2004) também analisou a região E/NS1 e sugeriu que as seqüências brasileiras de DENV-2 pertençam a diferentes *clades* no

genótipo III. Entretanto, encontrou resultados ambíguos, e considerou que região não é filogeneticamente informativa.

Quadro 1. Publicações brasileiras sobre caracterização molecular dos DENV.

<i>Autor</i>	<i>Estado /Ano</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sorotipo / Genótipo</i>	<i>Região genômica</i>	<i>Método</i>
Figueiredo, LB et al.	MG/2008	9	DENV-3 genótipo I	C, pM, M e E	Sequenciamento
Vieira DS et al.	RO/2007	70	DENV-1 genótipo I	NS1	Clonagem e sequenciamento
Miagostovich MP et al.	RJ/2006	Uma amostra	DENV 3 genótipo III	Genoma completo	Sequenciamento
Aquino VH et al.	SP,RO,MT,GO,A M,RR,PA/2006	19 (Brasil) 9 (Paraguai)	DENV-3 genótipo III	Gene E	Sequenciamento
Araújo FMC	CE/2006	Uma amostra	DENV-2 genótipo III DENV-3 genótipo III	E/NS1 prM/M e E	Sequenciamento
Pires Neto, RJ et al.	SP/2005	22 30	DENV-1 genótipo I DENV-2 genótipo III	E/NS1 (240 nt),	Sequenciamento
Santos, CCLS et al.	SP/2004	84 22	DENV-1 genótipo I DENV-2 genótipo III	E/NS1 (240 nt)	Sequenciamento
Miagostovich MP et al.	RJ/2003	52 15	DENV-2 genótipo III	E/NS1 (240 nt)	RSS-PCR Sequenciamento
Miagostovich MP et al.	RJ/2002	22 Uma amostra	DENV-3 subtipo C genótipo III	C, pM, M e E	RSS-PCR Sequenciamento
Dos Santos FB et al.	RJ/2002	Uma amostra	DENV-2 genótipo III	Genoma completo	Sequenciamento

A análise da seqüência completa do DENV-2 (Santos et al. 2002) caracterizou como genótipo III o vírus circulante no Rio de Janeiro. Foram identificadas alterações nucleotídicas e de aminoácidos na amostra brasileira características do genótipo asiático, as

quais são consideradas responsáveis pela virulência deste genótipo (Leitmeyer et al. 1999). Casos de FHD/SDC foram somente detectados depois da introdução de DENV-2, em 1990, e ainda com aumento do número de hospitalizações, resultando de casos de infecção secundária (Nogueira et al. 1990).

A caracterização molecular do DENV-3 identificou como genótipo III, o vírus circulante no Brasil, primeiramente utilizando a RSS-PCR, e sendo confirmado pelo sequenciamento parcial (Miagostovich et al. 2002, Aquino et al. 2006) e completo do genoma do DENV-3 (Miagostovich et al. 2006). O sequenciamento completo foi realizado com a amostra de um caso de SCD e óbito, e mostrou a inserção de 11 nucleotídeos na região UTR 3' em relação à cepa de referência Sri Lanka, observada em cepas de Martinica e também relatada por Aquino et al. (2006). Esta inserção, entretanto, não correlacionou as alterações dos aminoácidos na proteína E com manifestações clínicas. O genótipo III do DENV-3 tem origem asiática e foi introduzido na América do Sul pela passagem nas Ilhas do Caribe (PAHO 2000, Peyrefitte et al. 2005). Características de virulência deste genótipo foram observadas pela alta capacidade de transmissão viral com rápida dispersão pelo país, causando epidemias e aumento de formas graves (MS/SVS 2003, Nogueira et al. 2001). Aquino et al. (2006) mostraram a homologia das seqüências oriundas de amostras da região norte do Brasil com cepas de Martinica e as seqüências do sudeste, nordeste e centro-oeste com cepas do Rio de Janeiro, sugerindo pelo menos duas entradas do DENV-3 no Brasil.

Recentemente, a caracterização de um novo genótipo do DENV-3 (genótipo I), foi demonstrada em nove amostras com diferentes manifestações clínicas de pacientes de Belo Horizonte. As seqüências obtidas apresentaram homologia com cepas do sudeste asiático que há mais de 27 anos não tem sido detectada mundialmente. A associação com gravidade clínica não foi encontrada. (Figueiredo et al. 2008).

Os estudos em epidemiologia molecular têm permitido a caracterização biológica e genômica de amostras isoladas de casos de dengue e FHD para determinar a presença de sorotipos e genótipos circulantes e a origem evolutiva dos DENV, associando-os ou não com a gravidade da doença nas epidemias.

Vários autores têm relatado mutações na proteína do envelope viral relacionadas com atenuação viral ou mecanismo de escape do vírus importantes para o desenho de vacinas (Mandl et al. 2000, Lin & Wu 2003, Zulueta et al. 2006). Entretanto, as evidências da virulência viral ainda são controversas, pois, fatores individuais do hospedeiro, incluindo a existência prévia de anticorpos heterólogos, têm comprovado influenciar na resposta imune frente ao vírus (Stephenson 2005, Page et al. 2006, Halstead 2006).

Em um país de grandes dimensões como o Brasil, contendo diferenças étnicas, variações climáticas, além de larga fronteira com outros países, por onde podem emergir variantes dos vírus dengue, estudos em epidemiologia molecular têm se tornado indispensáveis e devem ser incentivados para melhor entendimento da diversidade genética dos vírus e epidemiologia da doença (Pires Neto et al. 2005).

Neste estudo nos propomos a fornecer informações no âmbito da vigilância laboratorial a partir da detecção, identificação dos sorotipos e caracterização de genótipos circulantes na região utilizando técnicas moleculares.

## REFERÊNCIAS

- Abhyankar A.M. et al. 2006. Comparison of a dipstick Dot-ELISA with commercial assays for anti-dengue virus IgM antibodies. *Viral Immunol.* 19(4): 630-636.
- Alcon S. et al. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigens in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infection. *J Clin Microbiol* 40: 376-81.
- Aquino V. H., Anatriello E., Goncalves P. F., EV D. A. S., Vasconcelos P. F., Vieira D. S., Batista W. C., Bobadilla M. L., Vazquez C., Moran M., Figueiredo L. T. 2006. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg* 75: 710-715.
- Alvarez M., Rodriguez-Roche R., Bernardo L., Vazquez S., Morier L., Gonzalez D., Castro O., Kouri G., Halstead S. B., Guzman M. G. 2006. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1113-1117.
- Balmaseda A., Sandoval E., Perez L., Gutierrez C. M., Harris E. 1999. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 61: 893-897.

Bedouelle H. et al. 2006. Diversity and junction residues as hotspots of binding energy in an antibody neutralization the dengue virus. *FEBS J.* 273:34-46.

Blacksell SD, Newton PN, Bell D, Kelley J, Jr Mammen PM, Vaughn DW, Wuthiekanun V, Sungkakum A, Nisalak A, Day NPJ 2006. The Comparative Accuracy of 8 Commercial Rapid Immunochromatographic Assays for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection. *Clin Infect Dis*; 42:1127–34

Blok J., Samuel S., Gibbs A. J., Vitarana U. T. 1989. Variation of the nucleotide and encoded amino acid sequences of the envelope gene from eight dengue-2 viruses. *Arch Virol* 105: 39-53.

Brown J. L., Wilkinson R., Davidson R. N., Wall R., Lloyd G., Howells J., Pasvol G. 1996. Rapid diagnosis and determination of duration of viraemia in dengue fever using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 140-143.

Burke DS, Monath TP 2002. Flavivirus: The viruses and their replication. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley, *Virology*. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia. p.

Callahan J. D., Wu S. J., Dion-Schultz A., Mangold B. E., Peruski L. F., Watts D. M., Porter K. R., Murphy G. R., Suharyono W., King C. C., Hayes C. G., Temenak J. J. 2001. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol* 39: 4119-4124.

Calva E., Cardoso M. J., Gavilondo J. V. 2002. Avoiding the genomics divide. *Trends Biotechnol* 20: 368-370.

Cardosa J., Wang S., Sum M., Tio P. 2002. Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue virus and JEV. *BMC Microbiol.* 2: 9.

Chakravarti A, Gur R, Berry N, Mathur MD 2000. Evaluation of three commercially available kits for serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. *Diagn Microbiol Infect Dis* 36: 273-274.

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

Chaturvedi U.C., Nagar R., Shrivastava R. 2006. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47: 155-166.

Chaturvedi U. C., Elbishbishi E. A., Agarwal R., Raghupathy R., Nagar R., Tandon R., Pacsa A. S., Younis O. I., Azizieh F. 1999. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol* 59: 335-340.

Chen Y. C., Wang S. Y. 2002. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol* 76: 9877-9887.

Chu M. C., O'Rourke E. J., Trent D. W. 1989. Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains. *J Gen Virol* 70: 1701-1712.

Chungue, E.; Deubel, V.; Cassar, O.; Laille, M.; Martin, P.M. 1993. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with wild or severe form for dengue fever in French Polynesia. *J. Gen Virol.* 74:2765-2770.

Cologna R., Rico-Hesse R. 2003. American genotypes structural decrease dengue output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 77: 3929-38.

Clyde K., Kyle J. L., Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80: 11418-11431.

Crabtree M.B., Kinney R.M., Miller B.R. 2005. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol.* 150: 771-786.

Crill W. D., Roehring J. 2001. Monoclonal antibodies that bind to domains III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to vero cells. *J Virol.* 75 (16): 7769-7773.

De Oliveira Poersch C., Pavoni D. P., Queiroz M. H., de Borba L., Goldenberg S., dos Santos C. N., Krieger M. A. 2005. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J Clin Virol* 32: 272-277.

De Paula S. O., de Melo Lima C., Torres M. P., Pereira M. R., Lopes da Fonseca B. A. 2004. One-Step RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to Two-Step RT-PCR approaches. *J Clin Virol* 30: 297-301.

De Paula S. O., Fonseca B. A. 2004. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis* 8: 390-398.

De Simone T. S., Nogueira R. M., Araujo E. S., Guimaraes F. R., Santos F. B., Schatzmayr H. G., Souza R. V., Teixeira Filho G., Miagostovich M. P. 2004. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 553-562.

De Souza V.A.F et al. 2007. Sensitivity and specificity of the ELISA-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. *J Clin Virol*. 39: 230-233.

Deubel V., Nogueira R. M., Drouet M. T., Zeller H., Reynes J. M., Ha D. Q. 1993. Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue-2 viruses. *Arch Virol* 129: 197-210.

Deubel V., Kinney R. M., Trent D. W. 1986. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of dengue virus type 2, Jamaica genotype. *Virology* 155: 365-377.

Dos Santos F. B., Miagostovich M. P., Nogueira R. M., Edgil D., Schatzmayr H. G., Riley L. W., Harris E. 2002. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 991-995.

Dussart D.P., et al. 2006. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol.* 13 (11): 1185-89.

Facolnar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM 2006. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccine Immunol* 13: 1044-1051.

Feres V. C., Martelli C. M., Turchi M. D., Junior J. B., Nogueira R. M., Rocha B. A., Silva L. F., de Jesus Silva M. M., de Paula Cardoso D D. 2006. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. *J Clin Virol* 37: 179-183.

Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E. 2001. *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

Figueiredo L.B., Cecílio AB et al. 2008. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14 (2):314-16.

Figueiredo L. T. 2006. Viral hemorrhagic fevers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 203-210.

- Figueiredo L. T. 2000. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect* 2: 1643-1649.
- Figueiredo L. T., Batista W. C., Igarashi A. 1997. A simple reverse transcription-polymerase chain reaction for dengue type 2 virus identification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 395-398.
- Fischer D. B., Halstead S. B. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. V. Examination of agspecific sequential infection rates using a mathematical model. *Yale J Biol Med* 42: 329-349.
- Figueroa R., Ramos C. 2000. Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Arch Med Res* 31: 429-430.
- Goncalvez A. P., Escalante A. A., Pujol F. H., Ludert J. E., Tovar D., Salas R. A., Liprandi F. 2002. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* 303: 110-119.
- Gubler DJ, Kuno G, Markoff L 2006. Flaviviruses. In BN Fields DM Knipe, PM Howley, Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p 1153.
- Gubler D. J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.

Gubler D. J., Kuno G., Sather G. E., Velez M., Oliver A. 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 33: 158-165.

Guilarde A. O., Turchi M. D., Junior J. B. S., Feres V. C. R., Rocha B., Levi J., Souza V., Boas L. S. V., Pannuti C., Martelli C. M. T. 2008. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes related to Viral Load, Serotypes and Antibody Response. *J Infect Dis* 197: 817.

Guzman M. G., Garcia G., Kouri G. 2006. Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities. *Rev Panam Salud Publica* 19: 204-215.

Guzman M. G. 2005. Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience. *Science* 309: 1495-1497.

Guzman M. G., Kouri G. 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 8: 69-80.

Guzman M. G., Kouri G. 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 27: 1-13.

Guzman M. G., Kouri G. 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2: 33-42.

Guzman M. G., Vazquez S., Martinez E., Alvarez M., Rodriguez R., Kouri G., de los Reyes J., Acevedo F. 1996. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Bol Oficina Sanit Panam* 121: 102-110.

Halstead S. B. 2007. Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652.

Halstead S. B. 2006. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 20: 407-415.

Halstead S. B., Heinz F. X., Barrett A. D., Roehrig J. T. 2005. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine* 23: 849-856.

Halstead SB 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476-481

Halstead S. B. 1980. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 58: 1-21.

Hammon W. M., Rudnick A., Sather G. E. 1960. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science* 131: 1102-1103.

Harris E., Sandoval E., Xet-Mull A. M., Johnson M., Riley L. W. 1999. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. *Virology* 253: 86-95.

Harris E., Roberts T. G., Smith L., Selle J., Kramer L. D., Valle S., Sandoval E., Balmaseda A. 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 36: 2634-2639.

Harving M. L., Ronsholt F. F. 2007. The economic impact of dengue hemorrhagic fever on family level in Southern Vietnam. *Dan Med Bull* 54: 170-172.

Heinz F. X., S.L. Allison 2003. Flaviviruses structure and membrane fusion. *Adv Virus Res.* 59: 63-67.

Heinz FX, Allison SL 2001. *The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes.* *Curr Opin Microbiol* 4: 450-455.

Henchal E. A., Putnak J. R. 1990. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3: 376-396.

Hiramatsu K., Tadano M., Men R., Lai C. J. 1996. Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. *Virology* 224: 437-445.

Holmes E. C. 1998. Molecular epidemiology of dengue virus--the time for big science. *Trop Med Int Health* 3: 855-856.

Hung J. J., Hsieh M. T., Young M. J., Kao C. L., King C. C., Chang W. 2004. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* 78: 378-388.

Hurrelbrink, R.J., McMinn, P.C. 2003 Molecular Determinants of virulence the structural and functional basis for flavivirus attenuation. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) *Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.*, California, Academic Press;. v. 59. p. 01-42.

ICTVdB 2005. *Virus taxonomy*. 8<sup>th</sup> reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fr-fst-g.htm>

Igarashi A. 1978. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 40: 531-544.

Kao C. L., King C. C., Chao D. Y., Wu H. L., Chang G. J. 2005. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect* 38: 5-16.

Khanam S., Etedmad B., Khana N., Swaminathan S., 2006. Induction of neutralization antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes. *Am Trop Med Hyg*. 74(2): 266-277.

Klugthong C., et al. 2007. Dengue virus detection using whole blood for RT-PCR and virus isolation. *J Clin Microbiol*. 45(8): 2480.

King C.C. et al. 2008. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. *J Virol* 5: 63.

Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C 1989. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull WHO* 67: 375-380.

Kouri, G.; Guzman, M.G.; Bravo, J.R. 1987. Why Dengue Hemorrhagic Fever In Cuba? 2. An integral analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81(5): 821-3.

Kuhn R. J., Zhang W., Rossmann M. G., Pletnev S. V., Corver J., Lenches E., Jones C. T., Mukhopadhyay S., Chipman P. R., Strauss E. G., Baker T. S., Strauss J. H. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108: 717-725.

Kumarasamy V., Chua S.K., Hassan Z., et al. 2007. Evaluation the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. *Sigapure Med J.* 48(7): 668.

Kurane I., Ennis F. A. 1994. Cytotoxic T lymphocytes in dengue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 189: 93-108.

Kruif M.D., Setiati T.E., Mairuhu A.T.A., Koraka P., aberson, H.A., Spek C.A., Osterhaus A.D.M.E., Reitsma P.H., Brandjes D.P.M., Soemari A., van Gorp E.C.M 2008. Differential gene expression changes in children with sever dengue virus infections. *PLos Neglected Trop Dis.* 2(4): 1-9.

Kuno G, Cropp CB, Wong-Lee J, Gubler DJ 1998. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 59: 757-762.

Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. 1987. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1:153-59.

Kuno G. 1982. Persistent infection of a nonvector mosquito cell line (TRA-171) with dengue viruses. *Intervirology* 18: 45-55.

Lambeth C.R. et al. 2005. Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *J Clin Microbiol* 43 (7): 3267-72.

Lanciotti R. S., Gubler D. J., Trent D. W. 1997. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* 78: 2279-2284.

Lanciotti R. S., Lewis J. G., Gubler D. J., Trent D. W. 1994. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 75: 65-75.

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

Leitmeyer K. C., Vaughn D. W., Watts D. M., Salas R., Villalobos I., de C., Ramos C., Rico-Hesse R. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73: 4738-4747.

Libraty D. H., Nisalak A., Endy T. P., Suntayakorn S., Vaughn D. W., Innis B. L. 2002. Clinical and immunological risk factors for severe disease in Japanese encephalitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 173-178.

Li, H.; Clum, S.; You, S.; Ebner, K.E.; Padmanabhan, R. 1999 The Serine protease and RNA – Estimated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol*. 73(4): 3108-3116.

Lin CW, Wu SC 2003. A functional determinant on Domain III of the Japanese Encephalitis virus envelope protein interacted with neutralizing-antibody combining sites. *J Virol* 77: 2600-2606.

Lindenbach, B.D., Rice, C.M. 2003. Molecular Biology of Flavivirus. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) *Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.*, California, Academic Press. v. 59. p. 23-61.

Lindenbach BD, Rice CM 2002. Flaviviridae: The viruses and their replication. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley, *Virology*. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia. p.

Luhn K. et al. 2007. Increased frequencies of CD<sup>+</sup> CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med* 204: 979-985.

Mandl, C.W., Allison, S.L., Holzmann, H., Meixner, T. Heinz, F.X. 2000 Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J Virol* 74(20): 9601-9609.

Mangada M. M., Endy T. P., Nisalak A., Chunsuttiwat S., Vaughn D. W., Libraty D. H., Green S., Ennis F. A., Rothman A. L. 2002. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* 185: 1697-1703.

Matheus S., et al. 2005. Use of four dengue virus antigens for detection of dengue immune status by ELISA of immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol.* 43(11): 5784-86.

McBride W. J., Bielefeldt-Ohmann H. 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2: 1041-1050.

Messer W. B., Gubler D. J., Harris E., Sivananthan K., de Silva A. M. 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 9: 800-809.

Miagostovich M. P., dos Santos F. B., Fumian T. M., Guimaraes F. R., da Costa E. V., Tavares F. N., Coelho J. O., Nogueira R. M. 2006. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 307-313.

Miagostovich M. P., Sequeira P. C., Dos Santos F. B., Maia A., Nogueira R. M., Schatzmayr H. G., Harris E., Riley L. W. 2003. Molecular typing of dengue virus type 2 in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45: 17-21.

Miagostovich MP, dos Santos FB, de Simone TS, Costa EV, Filippis AM, Schatzmayr HG, Nogueira RM 2002. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res* 35: 869-872.

Miagostovich M. P., dos Santos F. B., Gutierrez C. M., Riley L. W., Harris E. 2000. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. *J Clin Microbiol* 38: 1286-1289.

Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ES, Vorndam V 1999. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol* 14: 183-189.

Miagostovich M. P., Nogueira R. M., Cavalcanti S. M., Marzochi K. B., Schatzmayr H. G. 1993. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35: 149-154.

Modis, Y, Ogata, S. Clements, D., Harrison, S.C. 2005 Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol* 79(2):1223-31.

Modis, Y. Ogata, S. Clements, D., Harrison, S.C. 2004 Structure Of The Dengue Virus Envelope Protein After Membrane Fusion. *Nature* 427 (6972): 313-9.

Mongkolsapaya J., Duagchinda T., Dejnirattisai W., Vasanawathana S., Avirutnan P., Jdirungsri A., Jones Y., McMichael a., Screaton G. 2006. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 176: 3821-3829.

MS/SVS 2008. Informe Epidemiológico da Dengue. 2008

MS/SVS 2003. Informe Epidemiológico da Dengue. 2003

MS/Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) 2002b. *Dengue: diagnóstico e manejo clínico*. Ministério da Saúde, Brasília, 28 pp.

Mukhopadhyays S., Kuhn R.J., Rossman M.G. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3: 13-22.

Nogueira R.M.R., Araújo J.M.G., Schatzmayr H.G. 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Pub.* 22(5): 358-363.

Nogueira R. M., Miagostovich M. P., de Filippis A. M., Pereira M. A., Schatzmayr H. G. 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 925-926.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG 2000. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica* 16: 205-211.

Nogueira R. M., Miagostovich M. P., Lampe E., Schatzmayr H. G. 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 253.

Nogueira R. M., Schatzmayr H. G., Miagostovich M. P., Farias M. F., Farias Filho J. D. 1988. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 219-225.

Ooi E. E., Goh K. T., Chee Wang D. N. 2003. Effect of increasing age on the trend of dengue and dengue hemorrhagic fever in Singapore. *Int J Infect Dis* 7: 231-232.

Osanai C. H., Travassos da Rosa A. P., Tang A. T., do Amaral R. S., Passos A. D., Tauil P. L. 1983. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 25: 53-54.

Osatomi K., Sumiyoshi H. 1990. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology* 176: 643-647.

Pang T., Cardoso M. J., Guzman M. G. 2007. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 85: 43-45.

Page K.R., Scott A., Manabe Y. C. 2006. The expanding realm of heterologous immunity: friend or foe? *Cell Microbiol* 8 (2): 185-196.

Pan American Health Organization 2001. A timeline for dengue in the Americas to December, 2000 and noted first occurrences 2001. Disponível em: <http://www.paho.org/english/HCP/HCT/VBDdengue>.

Pan American Health Organization 1989. Dengue in Americas: 1980-1987. *Epidemiol Bull* 10: 1-8.

Peyrefitte C. N., Couissinier-Paris P., Mercier-Perennec V., Bessaud M., Martial J., Kenane N., Durand J. P., Tolou H. J. 2003. Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). *J Clin Microbiol* 41: 5195-5198.

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

Pires Neto R. J., Lima D. M., de Paula S. O., Lima C. M., Rocco I. M., Fonseca B. A. 2005. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Braz J Med Biol Res* 38: 843-852.

Podder G., Breiman R. F., Azim T., Thu H. M., Velathanthiri N., Mai le Q., Lowry K., Aaskov J. G. 2006. Origin of dengue type 3 viruses associated with the dengue outbreak in Dhaka, Bangladesh, in 2000 and 2001. *Am J Trop Med Hyg* 74: 263-265.

Rahman M., Rahman K., Siddque A. K., Shoma S., Kamal A. H., Ali K. S., Nisaluk A., Breiman R. F. 2002. First outbreak of dengue hemorrhagic fever, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 8: 738-740.

Rey, F.A.; Heinz, F.X.; Mandl, C.; Kunz, C.; Harrison, S.C. 1995 The Envelope glycoprotein from tock-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*; 375(6529): 291-298.

Rico-Hesse R. 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59: 315-341.

Rico-Hesse R., Harrison L. M., Salas R. A., Tovar D., Nisalak A., Ramos C., Boshell J., de Mesa M. T., Nogueira R. M., da Rosa A. T. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244-251.

Rico-Hesse R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174: 479-493.

Rigau-Perez J. G., Ayala-Lopez A., Garcia-Rivera E. J., Hudson S. M., Vorndam V., Reiter P., Cano M. P., Clark G. G. 2002. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg* 67: 355-362.

Rocco I. M., Kavakama B. B., Santos C. L. 2001. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43: 55-57.

Rocha B. A. M. 2008. Perfil clínico-epidemiológico da dengue em menores de 15 anos de idade, no município de Goiânia, Goiás. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, 96 pp.

Rodriguez-Roche R., Alvarez M., Gritsun T., Rosario D., Halstead S., Kouri G., Gould E. A., Guzman M. G. 2005. Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene

sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. *Arch Virol* 150: 415-425.

Roehrig J. T. 2003. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res* 59: 141-175.

Rosario D., Alvarez M., Diaz J., Contreras R., Rodriguez R., Vazquez S., Guzman M. G. 1998. Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples. *Rev Panam Salud Publica* 4: 1-5.

Rosen L 1977. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 26: 337-343

Rothman A.L. 2004. Dengue defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113 (7): 946-51.

Rothman AL, Ennis FA 1999. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257: 1-6.

Russell P. K., McCown J. M. 1972. Comparison of dengue-2 and dengue-3 virus strains by neutralization tests and identification of a subtype of dengue-3. *Am J Trop Med Hyg* 21: 97-99.

Sabin A. B. 1952. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1: 30-50

Salama K 2004. Modelling and simulation of luminescence detection platforms. *Biosensors & Bioelectronics*. 19:1377-1386.

Santos C. L., Sallum M. A., Foster P. G., Rocco I. M. 2004. Molecular analysis of the dengue virus type 1 and 2 in Brazil based on sequences of the genomic envelope-nonstructural protein 1 junction region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46: 145-152.

Sangkawibha N., Rojanasuphot S., Ahandrik S., Viriyapongse S., Jatanasen S., Salitul V., Phanthumachinda B., Halstead S. B. 1984. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120: 653-669.

Sariol C. A., Pelegrino J. L., Martinez A., Arteaga E., Kouri G., Guzman M. G. 1999. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am J Trop Med Hyg* 61: 994-1000.

Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (SES/GO). Nota técnica 2008. SPAIS, Departamento de Endemias.

Schatzmayer HG 2000. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1: 179-181.

Shu P. Y., Huang J. H. 2004. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 642-650.

Shu P. Y., et al. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and ELISA and nonstructural NS1 serotype-specific IgG ELISA for detection on primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 622-30.

Sierra B. et al. 2007 HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol* 68: 531-540.

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

Siqueira Júnior JB, Martelli CMT, Maciel IJ, Oliveira RM, Ribeiro MG, Amorim FP, Moreira BC, Cardoso DDP, Souza WV, Andrade AL 2004. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. *Am J Trop Med Hyg* 71: 646-651.

Singh K., Lale A., Eong Ooi E., Chiu L. L., Chow V. T., Tambyah P., Koay E. S. 2006. A prospective clinical study on the use of reverse transcription-polymerase chain reaction for the early diagnosis of Dengue fever. *J Mol Diagn* 8: 613-616; quiz 617-620.

Stephenson J.R. 2005. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull WHO* 83 (4):308-14.

Suk-Yin., Kautner I., sai-Kit L. 1994. Detection and serotyping of dengue virus by PCR: a simple, rapid method for the isolation of viral RNA from infected mosquito larvae. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 25: 258-61.

Tassaneetrithep B., Burgess T.H., Granelli-Piperno A., Sun W., Sarasombath S., Schlesinger S., Marovich M.A. 2003. DC-SIGN (CD 209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 197: 823-829.

Teixeira Mda G., Costa Mda C., Barreto M. L., Mota E. 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica* 21: 1307-1315.

Thein S., Aung M., Shwe N., Aye M., Zaw A., Aaskov 1997. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 56: 566-572.

Torres E. M. 2005. *Dengue*. FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 344 pp.

Travassos da Rosa AP, Travassos Da Rosa ES, Travassos Da Rosa JFS, Dégallier N, Vasconcelos PF, Rodrigues SG 1994. Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo 2. Instituto Evandro Chagas. FUNASA Ministério da Saúde, Belém-PA, 23 pp.

Trent D. W., Grant J. A., Monath T. P., Manske C. L., Corina M., Fox G. E. 1989. Genetic variation and microevolution of dengue 2 virus in Southeast Asia. *Virology* 172: 523-535.

Trent DW, Manske CL, Fox GE, Chu MC, Kliks Sc, Monath TP 1990. The molecular epidemiology of dengue viruses; genetic variation and microevolution. *In: Applied Virology Research* 2: 293-315

Uzcategui N. Y., Comach G., Camacho D., Salcedo M., Cabello de Quintana M., Jimenez M., Sierra G., Cuello de Uzcategui R., James W. S., Turner S., Holmes E. C., Gould E. A. 2003. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* 84: 1569-1575.

Varma M. G., Pudney M., Leake C. J., Wallace C. 1974. Proceedings: Cytopathic effect of dengue-2 virus on an established mosquito cell-line. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 12.

Vasconcelos P. F., de Menezes D. B., Melo L. P., Pessoa E. T., Rodrigues S. G., da Rosa E. S., Timbo M. J., Coelho I. C., Montenegro F., da Rosa J. F., et al. 1995. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceara State, Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 253-255.

Vaughn D. W., Green S., Kalayanarooj S., Innis B. L., Nimmannitya S., Suntayakorn S., Endy T. P., Raengsakulrach B., Rothman A. L., Ennis F. A., Nisalak A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181: 2-9.

Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Nguyen MD, Kneen R, Cuzzubbo A, Devine PL 1999. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg* 60: 693-698.

Veza A. C., Rosen L., Repik P., Dalrymple J., Bishop D. H. 1980. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 29: 643-652.

Victor T. J., Malathi M., Asokan R., Padmanaban P. 2007. Laboratory-based dengue fever surveillance in Tamil Nadu, India. *Indian J Med Res* 126: 112-115.

Videa E. et al. 2006. Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant polypeptides for diagnosis of dengue. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12: 882-884.

Vorndam, V., Kuno, G. 1997 Laboratory Diagnosis Of Dengue Virus Infections. In: Gubler D.J.; Kuno, G., eds. *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. New York: CAB International: 313-33.

Vorndam V., Kuno G., Rosado N. 1994. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *J Virol Methods* 48: 237-244.

Wang W. K., Lin S. R., Lee C. M., King C. C., Chang S. C. 2002. Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol* 76: 4662-4665.

Watts D. M., Porter K. R., Putvatana P., Vasquez B., Calampa C., Hayes C. G., Halstead S. B. 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 354: 1431-1434.

Whitley R 2008. The new age of molecular diagnosis for microbial agents. *New Engl J Med* 358(10): 988-989.

WHO Healthsites Dengue/dengue hemorrhagic fever. Disponível em <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>. 2007.

WHO/TDR. TDR research on dengue: recommendations of a scientific working group. Dengue. Geneva, Switzerland. Jun. Wu S. J., Grouard-Vogel G., Sun W., Mascola J. R., Brachtel E., Putvatana R., Louder M. K., Filgueira L., Marovich M. A., Wong H. K., Blauvelt A., Murphy G. S., Robb M. L., Innes B. L., Birx D. L., Hayes C. G., Frankel S. S. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 6: 816-820.

WHO 2002. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Fact Sheets, Who information* 117, 4

WHO 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd Edition. Geneva. 34-47.

Wittke V., Robb T. E., Thu H. M., Nisalak A., Nimmannitya S., Kalayanrooj S., Vaughn D. W., Endy T. P., Holmes E. C., Aaskov J. G. 2002. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 301: 148-156.

Wu SJ, Hanson B, Paxton H, Nisalak A, Vaughn DW, Rossi C, Henschal EA, Porter KR, Watts DM, Hayes CG 1997. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 452-457.

Xu H., Di B., Pan Y., Qiu L., Wang Y., Hao W., He L., Yuen K., Che X. 2006. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol* 44: 2872-2878.

Young P. R., Hilditch P. A., Bletchly C., Halloran W. 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 38: 1053-1057.

Zhao B., Mackow E., Buckler-White A., Markoff L., Chanock R. M., Lai C. J., Makino Y. 1986. Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: analysis of genes coding for structural proteins. *Virology* 155: 77-88.

Zulueta A., Martin J., Hermida L., Alvarez M., Valdes I., Prado I., China G., Rosario D., Guillen G., Guzman M. G. 2006. Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res* 121: 65-73.

**OBJETIVOS**

---

Detectar e identificar os sorotipos dos vírus dengue circulantes em Goiânia-GO, nos anos de 1994 a 2003, através do isolamento viral em cultura de células e RT-PCR em amostras provenientes de casos suspeitos de dengue em Goiânia-GO.

Caracterizar os genótipos dos vírus dengue pela RSS-PCR em amostras positivas provenientes de pacientes sintomáticos atendidos nos centros de referência e hospitais selecionados de Goiânia-GO, entre 2002 e 2003.

Caracterizar o genótipo do DENV-3, através do sequenciamento genômico e análise filogenética, em amostras positivas de dengue selecionadas entre diferentes formas clínicas diagnosticados em Goiânia-GO, nos anos de 2005 e 2006.

**ARTIGO 1**

---

## Laboratory Surveillance of Dengue Virus in Central Brazil, 1994-2003

Valéria Christina Rezende Feres<sup>a</sup>, Celina Maria Turchi Martelli<sup>b\*</sup>, Marília Dalva Turchi<sup>b</sup>, João Bosco Siqueira Junior<sup>b</sup>, Rita Maria Ribeiro Nogueira<sup>c</sup>, Benigno Alberto Moraes Rocha<sup>b</sup>, Lucileis F. F. Silva<sup>a</sup>, Maysa Madalena de Jesus Silva<sup>a</sup>, Divina da Dores de Paula Cardoso<sup>b</sup>.

### Affiliation

<sup>a</sup> Public Health Laboratory- LACEN-Go, Secretariat of State of Goiás, Goiania- Goiás, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás

<sup>c</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author. <sup>b\*</sup> Celina Maria Turchi Martelli

Institute of Tropical Pathology and Public Health

Rua Delenda de Resende Melo s/n

Goiania – Goiás, Brazil

Tel.: 55 62 3205 00 05

E-mail address: celina@iptsp.ufg.br

## RESUMO

*Introdução.* Os padrões endêmicos e epidêmicos da dengue no Brasil indicam uma tendência de aumento na incidência e hospitalização desde a década de 80.

*Objetivo:* Descrever sobre os sorotipos virais circulantes de dengue nos anos de 1994 a 2003 e o papel dos diferentes sorotipos nos desfechos clínicos de dengue na região Centro-Oeste do Brasil.

*Métodos:* A vigilância virológica de casos foi conduzida na cidade de Goiânia-GO (~1.200.000 habitantes) de 1994 a 2003. Amostras foram testadas para anticorpos IgM anti-dengue e/ou isolamento viral. A circulação de sorotipos e genótipos foi identificada pela transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e pela PCR baseada em reação de restrição sítio-específicos (RSS-PCR) em amostras selecionadas.

*Resultados:* O grupo mais acometido foi o de adultos (87,4%) e a dengue clássica foi diagnosticada na maioria dos casos. A vigilância laboratorial identificou o sorotipo DEN-1 como prevalente nos anos 1994 a 2002, o qual foi substituído por uma alta circulação de DEN-3 em 2003. A razão de dengue para dengue com complicações/FHD permaneceu constante após a introdução de DEN-3. O diagnóstico de dengue foi confirmado em aproximadamente 50% dos casos suspeitos de dengue foi diagnosticado por RT-PCR. Os padrões de RSS-PCR obtidos para DEN-1 e DEN-3 corresponderam aos subtipos circulantes no país.

*Conclusões:* Os resultados da vigilância virológica não sugerem que a infecção pelo sorotipo DEN-3 tenha um papel relevante da no aumento da gravidade da doença durante seu primeiro ano de dispersão no Centro-Oeste do Brasil.

## ABSTRACT

*Background:* In Brazil, dengue endemic and epidemic patterns indicate an upward trend in incidence and hospitalization in the past decade.

*Objective:* To report dengue circulating serotypes from 1994 to 2003 and the role of distinct serotypes on dengue clinical outcomes in Central Brazil.

*Methods:* Virological surveillance for dengue cases was conducted in the city of Goiânia (~1,200,000 population) from 1994 to 2003. Samples were tested using dengue IgM antibody (MAC-ELISA) and/or virus isolation. Circulating subtypes and genotypes were identified by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and by restricted site-specific PCR (RSS-PCR) patterns in selected samples.

*Results:* Adults (87,4%) were the most affected group and dengue fever accounted for the majority of the cases. Laboratory surveillance identified mainly DEN-1 serotype from 1994 to 2002 shifting to a high circulation of DEN-3 in 2003. The ratio of dengue fever to dengue with complication/DHF remained constant following the introduction of DEN-3. Diagnosis of dengue was confirmed in ~50% of the suspected Cases enhanced by RT-PCR. RSS-PCR patterns for DEN-1 and DEN-3 corresponded to the circulating subtypes in the country.

*Conclusions:* The result of virological surveillance did not suggest a major role of infecting DEN-3 in increasing disease severity during its first-year spread in Central Brazil.

**Keywords:** Dengue; Surveillance; Clinical; Virus isolation; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Diagnosis

## 1. INTRODUCTION

Dengue fever and dengue hemorrhagic fever (DHF) are considered among the most important vector-borne diseases in tropical regions, with an estimated annual incidence of 50-100 million cases of dengue fever and more than 500 000 reported cases of DHF/DSS worldwide (Gubler, 1997; Guzman and Kouri, 2003). In Brazil, the first dengue epidemic was restricted to a city in the northwest region (1981). The introduction of DEN 1 (1986), DEN 2 (1990) and DEN 3 (2000) occurred in the southeast region, considered the main route for the spread of dengue virus countrywide (Miagostovich et al., 2002; Siqueira et al., 2005). During the last decade, there was an upward trend in incidence, peaking with more than 300 cases per 100,000 inhabitants in the year of 2002, with explosive epidemics in many large cities (Siqueira et al., 2005).

Dengue fever (DF) is mainly a mild acute febrile disease and DHF/DSS is characterized by fever, thrombocytopenia, hemorrhagic manifestations, and excessive capillary permeability that may progress to shock and death (WHO, 1997). Increased risk for severity of dengue outcomes are likely to be explained by a secondary infection due to a different serotype, or by correlation with virus virulence yielded by genetic variation (Haslstead 1997; Holmes and Twiddy, 2003). The role of distinct serotypes and/or previous infection on the severity of clinical outcomes has not been fully established (Endy et al., 2004). In Brazil, increasing rates of hospitalization due to DHF or severe DF cases, and increases in the number of deaths caused by the infection have been reported (Siqueira et al., 2005).

In the current study, we present the results of a laboratory surveillance conducted in the city of Goiania in central Brazil since dengue virus introduction in 1994 to 2003. We focused on the circulating serotypes, its temporal association with the outbreaks and the

severity of the clinical cases. We also present the results of an pro-active surveillance to identify serotypes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the genetic characterization by RSS-PCR in selected samples. These findings are important to characterize the epidemiologic pattern of the first decade of dengue/DHF in one of the most populated cities in Central Brazil.

## **2. METHODS**

### *2.1. Surveillance and study site*

Dengue/DHF is a reportable disease and the official Brazilian surveillance system was described in detail previously (Siqueira et al., 2005). Dengue is reported according to severity: (1) dengue fever, (2) dengue with complications, (3) dengue hemorrhagic fever (DHF) and (4) dengue shock syndrome (DSS). Dengue with complications includes the cases that do not fulfill the DHF criteria and the classical dengue case definition is inadequate due to the severity of the clinical manifestations, as follows: hemorrhagic or neurological manifestations, cardio-respiratory dysfunction, hepatic failure, thrombocytopenia (platelet counts  $< 50\ 000$  per  $\mu\text{L}$ ), leucopenia ( $< 1000$  cells) or death (Ministério da Saúde, 2005). DHF and DSS case definition are follows standard criteria (WHO, 1997).

Laboratory surveillance was initiated since the first epidemic in 1994 in the city of Goiania (~1,200,000 population), in central Brazil. Suspected cases were from the main public infectious disease reference hospital and outpatient clinics covering the metropolitan area. Dengue incidence is estimated by case report from the surveillance system. Cases were routinely confirmed by serological test or virus isolation at the regional reference

laboratory. Data on age, sex, disease classification, and disease outcomes for the reported cases were extracted from digital files from the official information system.

Serological tests were performed for serum collected after 5 days of the onset of symptoms using in-house dengue IgM antibody capture MAC-ELISA (Kuno et al., 1987). The Dengue Control Program recommends serological test to all suspected dengue case in non-epidemic periods. During epidemics, around 10% of the suspected cases should be tested by IgM serology (Ministério da Saúde, 2005). From 1994 to 2003, blood samples (< 7 days after the onset of disease) were obtained from suspected dengue cases from hospitals and health centers throughout the year. Virus isolation was performed at the reference laboratory (LACEN-GO, Brazil) using a monolayer of C6/36 *Aedes albopictus* cells (Igarashi, 1978). Dengue virus isolates were identified by an indirect fluorescent antibody test using serotype-specific monoclonal antibodies (Gubler et al., 1984).

## *2.2. Pro-active dengue surveillance*

From May-December 2003, disease surveillance was enhanced to monitor circulating subtypes by adding molecular techniques. 87 suspected dengue cases had paired samples from acute and convalescent-phase (~day 14) collected. Aliquots of blood were immediately stored in liquid nitrogen and transported weekly to the reference laboratory for virus isolation and molecular testing. Besides routine dengue IgM antibodies, IgM/IgG antibodies were assessed by EIA (PanBio Indx, Inc., Baltimore, MD). Serology and virus isolation and reverse transcriptase PCR (RT-PCR) were performed for detecting the infecting serotype, and 12 viral isolates were analyzed by restriction site-specific - polymerase chain reaction (RSS-PCR) for genetic subtype.

The infecting DEN serotype was identified from acute-phase serum samples (n=87) by RT-PCR (Lanciotti et al., 1992). RNA was extracted according to standard protocol

(Boom et al., 1990). Molecular subtyping of DEN 1; DEN 2; DEN 3 were performed according to previously described techniques by using RSS-PCR (Harris et al., 1999; Miagostovich et al., 2000).

### *2.3. Statistical analysis*

Descriptive statistics for the study population characteristics and laboratory findings were performed using SPSS Inc., Chicago, Illinois, version 10.  $\chi^2$  test were applied for comparisons between proportions and  $p < 0.05$  considered to be significant. The study received the approval of the local Ethical Committee, and all patients or guardians gave informed consent for molecular techniques, which are not part of the routine surveillance.

## **3. RESULTS**

A total of 5,553 samples from suspected dengue cases were tested for virus isolation from 1994 to 2003. DEN 1 was the only detected serotype until 1999 followed by virus isolation of DEN 2 and DEN 3 in 2002. The first confirmed DHF occurred in 1998.

During 2002, dengue virus was isolated in 22.8% out of 3052 samples tested. DEN 1 was isolated in 20.7% (632/3052) of the specimens being the predominant serotype among the positive isolates (90.7%), followed by DEN 2 (6.6%) and DEN 3 (2.7%). In 2003, dengue virus was isolated in 16.0% out of 431 samples tested. The predominant serotype was DEN 3 representing 76.8% of positives samples, followed by DEN 1 (17.4%) and DEN 2 (5.8%). There was a statistically significant difference in the proportion of DEN 1 and DEN 3 isolations in both years ( $\chi^2=251.8$ ;  $p < 0.001$  and  $\chi^2=404.7$ ;  $p < 0.001$ ) (Table 1, Figure 1).

The main characteristics of the symptomatic cases in which the infecting serotype was identified are presented in Table 2. The majority of cases had mild disease and was categorized as dengue fever. The overall ratio male to female was around 1:1.3. The most affected age group was adult (> 15 years of age) which comprised 87.4% in the reported dengue cases. Dengue with complications accounted for 22.2% among the DEN 1 isolates in 2002 and 28.3% among DEN 3 in 2003 ( $\chi^2=0.12$ ;  $p=0.73$ ). Overall, eight cases were classified as DHF corresponding to 1.0% of the cases confirmed by isolation. Four deaths due to dengue were laboratory-confirmed by serology and/or immunohistochemistry (liver biopsy). Two were classified as DHF, two as dengue with complication, and all of them occurred in the adult population, age range 20-50 years old.

Pro-active surveillance - Dengue infection was laboratory confirmed in 47.1% out of 87 patients tested by RT-PCR, virus isolation and serology. RT-PCR identified the infecting serotypes in 25.3% of the samples (22/87): DEN 1 (n=7), DEN 2 (n=7) and DEN 3 (n=8). Three positive samples by viral isolation were also positive by RT-PCR, however, for 22 samples the DEN was identified by RT-PCR. 30 patients had IgM positivity (34.1%; IC95% 24.6%-44.6%), with 4 sero-conversion in paired samples. Anti-dengue IgM/IgG antibodies were positive for 81.2% of the samples indicating cumulative dengue virus exposure.

DEN 1 belonged to RSS-PCR subtype C, and DEN 3 strains analyzed matched to subtype C. Both serotypes corresponded to the circulating strains in the country (De Simone et al., 2004). DEN 2 strains had similar profiles but could not be matched to known patterns.

#### **4. DISCUSSION**

In central Brazil, the city of Goiania evolved from high DEN 1 circulation in 2002 to a high circulation of DEN 3 in 2003. Despite the co-circulation of three different serotypes in recent years, DHF and DF cases are still reported mainly in adults, which characterize a different pattern from Asian countries and some endemic American countries (Guzman and Kouri, 2003; Siqueira et al., 2005). The reintroduction of DEN 3 in the Americas occurred in Nicaragua and Panama in 1994, spreading to most American countries (Briseno-Garcia et al., 1996; Nogueira et al., 2001; Barbosa da Silva Jr et al., 2002; Rigau-Perez et al., 2002). A study in Nicaragua showed that children already represent the major burden of dengue after 15 years of dengue virus circulation, and DEN 2 was the prevailing serotype (Hammond et al., 2005).

In our setting the virological surveillance does not suggest a major role of infecting DEN 3 serotype in increasing disease severity since the ratio of dengue fever to dengue with complications/DHF remained constant. These findings are in concordance with data from Puerto Rico where there was not an increase in disease severity associated with DEN 3 introduction in 1998 (Rigau-Perez et al., 2002). In contrast, the introduction of DEN 3 in the Rio de Janeiro State led to almost two thousands DHF cases and 91 fatalities in 2002 (Casali et al., 2004; Nogueira, 2005). The association between severity of disease and introduction of DEN 3 serotypes in both settings in Brazil should be interpreted with caution since primary and secondary dengue infection cannot be distinguished by the official Brazilian surveillance system. In our study more than 20% of laboratory-confirmed dengue cases were classified as dengue with complications showing the difficult to fulfill the DHF criteria. Previous studies have pointed out that the application of the WHO criteria for case ascertainment may underestimate the number of DHF and/or its severe

clinical manifestations, especially among the adult population (Rigau-Perez and Bonilla, 1999; Balmaseda et al., 2005). Sequential viral dengue infections, virulence of different virus strains, previous immune status, genetic diversity of the population, age-related differences and co-morbidity are possible explanations for disease severity (Haslstead, 1997, Hammond et al 2005). Therefore, multiple and complex factors may contribute to dengue severity. Our results, although limited to a subset of the dengue cases and dengue serotypes, reflects the recent introduction DEN 3 in central Brazil.

In this study, the serotypes identification by viral isolation showed low yield. Viral isolation is considered a laborious and time-consuming methodology with well-known limitation for large scale monitoring (Guzman and Kouri, 2004; Shu and Huang, 2004). Nevertheless, it is the gold standard technique for virus detection (World Health Organization, 1997). The RT-PCR technique enhanced the laboratory-confirmed cases in this investigation in concordance with previous publications showing that a combination of RT-PCR and virus isolation increases the laboratory diagnosis of dengue. The advantage of RT-PCR is that it allows a timely identification of dengue serotypes for diagnostic and surveillance purposes. The relatively simple RSS-PCR typing applied helped to characterize the common origin of dengue-1, according to the classification previously described in Brazil (Miagostovich et al., 2000; Miagostovich et al., 2002). The pattern detected in the dengue-3 strain belonged to subtype C, with a variation (Harris et al., 1999) also detected in samples from Brazil (Miagostovich et al., 2002) and Nicaragua (Balmaseda et al., 1999).

Our findings represent an early stage of DEN 3 transmission and that the impact of this serotype on disease severity may still not be noticeable. Continuous monitoring of circulating serotype enhanced with molecular techniques is critical for dengue surveillance

not only to detect the introduction of a new serotype, but also to understand the transition on disease severity and the shift from age groups among different populations and regions.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Dr Carmen Ramos and Flúvia Amorim for assistance.  
Financial support: CNPq-470696/01-0; Pronex/CNPq/Sectec- 23234156. Dr. Martelli received a CNPq Scholarships: (307963/2004-7).

## REFERENCES

- Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, et al. Assessment of the World Health Organization Scheme for Classification of Dengue Severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005;6:1059-62.
- Balmaseda A, Sandoval E, Perez L, Gutierrez CM, Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1999;6:893-7.
- Barbosa da Silva Jr. J, Siqueira Júnior JB, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta Jr. FG. Dengue in Brazil: Current Situation and Prevention and Control Activities. *Epidemiol Bull* 2002;1:3-6.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;3:495-503.
- Briseno-Garcia B, Gomez-Dantes H, Argott-Ramirez E, Montesano R, Vazquez-Martinez AL, Ibanez-Bernal S, et al. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico. *Emerg Infect Dis* 1996;2:133-5.
- Casali CG, Pereira MR, Santos LM, Passos MN, Fortes Bde P, Ortiz Valencia LI, et al. [The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004;4:296-9.
- De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;9:553-62.

- Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, et al. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 2004;6:990-1000.
- Gubler D. Dengue and dengue Hemorrhagic Fever: Its History and Resurgence as a Global Public Health Problem. CAB International, New York, 1997;1-22.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984;1:158-65.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003;1:1-13.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004;2:69-80.
- Halstead SB. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In Gubler DJ, Kuno G. Eds. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Wallingford. UK: CAB International, 1997.
- Hammond SN, Balmaseda A, Perez L, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, et al. Differences in Dengue Severity in Infants, Children, and Adults in a 3-Year Hospital-Based Study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005;6:1063-70.
- Harris E, Sandoval E, Xet-Mull AM, Johnson M, Riley LW. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. *Virology* 1999;1:86-95.

- Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003;1:19-28.
- Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978;3:531-44.
- Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1987;1:153-9.
- 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;3:545-51.
- Miagostovich MP, dos Santos FB, de Simone TS, Costa EV, Filippis AM, Schatzmayr HG, et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res* 2002;8:869-72.
- Miagostovich MP, dos Santos FB, Gutierrez CM, Riley LW, Harris E. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2000;3:1286-9.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª edição, Brasília. 2005.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAP, Schatzmayr H. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 86:925-6.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, Filippis AM, dos Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 2005;9:1376-81.

- Rigau-Perez JG, Ayala-Lopez A, Garcia-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg* 2002;4:355-62.
- Rigau-Perez JG, Bonilla GL. An evaluation of modified case definitions for the detection of dengue hemorrhagic fever. *Puerto Rico Association of Epidemiologists. P R Health Sci J* 1999;4:347-52.
- Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;4:642-50.
- Siqueira JB, Jr., Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* 2005;1:48-53.
- WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd Edition. Geneva. 1997;34-47.

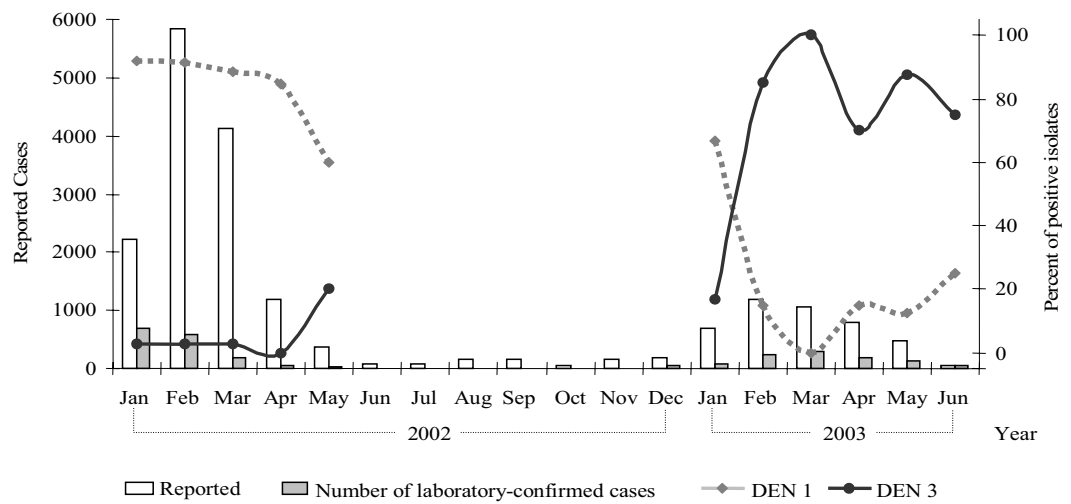


Fig. 1. Reported and laboratory-confirmed dengue cases plotted by months from January 2002 to June 2003. Blank bars show reported cases in the regional surveillance program and black bars the number of laboratory-confirmed cases. Gray lines represent percent of positive DEN 1 isolates and black lines the percent of positive DEN 3 isolates.

Table 1.

## Serotypes of dengue virus isolated, Goiania- Central Brazil, 1994-2003

Years	Reported	Positive/Total (%) <sup>a</sup>	Serotypes (%) <sup>b</sup>		
			DEN-1	DEN-2	DEN-3
1994-98	8644	3 / 233 (1.3)	3 (100.0)	-	-
1999	468	17 / 284 ( 6.0)	14 (82.4)	3 (17.6)	-
2000	432	23 / 367 ( 6.2)	18 (78.3)	5 (21.7)	-
2001	6709	203 / 1 186 (17.1)	160 (78.8)	43 (21.2)	-
2002	17632	697 / 3 052 (22.8)	632 (90.7) <sup>c</sup>	46 (6.6)	19 (2.7) <sup>d</sup>
2003	7438	69 / 431 (16.0)	12 (17.4) <sup>e</sup>	4 (5.8)	53 (76.8) <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Percentages are positive divided by total samples tested for virus isolation

<sup>b</sup> Percentages are dengue serotypes by positive samples

<sup>c</sup> versus <sup>d</sup>  $\chi^2=251,8$   $p<0.001$ ;

<sup>e</sup> versus <sup>f</sup>  $\chi^2=404.7$   $p<0.001$

Table 2.

## Characteristics of dengue cases according to serotypes, 2002-2003

Characteristics	Year 2002			Year 2003		
	DEN 1 n=632 (%)	DEN 2 n=46 (%)	DEN 3 n=19 (%)	DEN 1 n=12 (%)	DEN 2 n=4 (%)	DEN 3 n=53 (%)
Age years						
1 – 10	35 ( 5.5)	2 ( 4.3)	2 (10.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 1.9)
11 - 20	136 (21.5)	4 ( 8.7)	2 (10.5)	3 (25.0)	1 (25.0)	10 (18.9)
21 – 30	162 (25.6)	12 (26.1)	5 (26.3)	2 (16.7)	0 ( 0.0)	12 (22.6)
31 - 40	142 (22.5)	12 (26.1)	3 (15.8)	6 ( 5.0)	1 (25.0)	11 (20.8)
41 - 50	80 (12.7)	7 (15.2)	4 (21.1)	1 ( 8.3)	0 ( 0.0)	8 (15.1)
51 - 60	77 (12.2)	9 (19.6)	3 (15.8)	0 ( 0.0)	2 (50.0)	11 (20.8)
Disease classification						
Dengue Fever	422 (66.8)	28 (60.9)	13 (68.4)	9 (75.0)	4 (100.0)	36 (67.9)
Dengue with complications	159 (22.2)	14 (30.4)	5 (26.3)	1 ( 8.3)	0 ( 0.0)	15 (28.3)
DHF <sup>a</sup>	4 ( 0.6)	2 ( 4.3)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 1.9)
Not classified	47 ( 7.4)	2 ( 4.3)	1 ( 5.3)	2 (16.7)	0 ( 0.0)	1 ( 1.9)

Values shown in parenthesis are percentage; 5 records with missing data on age

<sup>a</sup> DHF Dengue hemorrhagic fever



# **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DENGUE TIPO 3 EM GOIÂNIA, GOIÁS, 2005-2006**

Valéria Christina Rezende Feres<sup>a</sup>, Rita Maria Ribeiro Nogueira<sup>b</sup>, Josélio Maria Galvão de Araújo<sup>b</sup>, Carmen Helena Ramos<sup>a</sup>, Marilia Dalva Turchi<sup>c</sup>, João Bosco Siqueira Júnior<sup>c</sup>, Adriana de Oliveira Guilarde<sup>c</sup>, Benigno Alberto Moraes Rocha<sup>c</sup>, Celina Maria Turchi Martelli<sup>c\*</sup>,

## Affiliation

<sup>a</sup> Public Health Laboratory- LACEN-Go, Secretariat of State of Goiás, Goiania- Goiás, Brazil

<sup>b</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás

Corresponding author. <sup>c\*</sup> Celina Maria Turchi Martelli

Institute of Tropical Pathology and Public Health

Rua Delenda de Resende Melo s/n

Goiania – Goiás, Brazil

Tel.: 55 62 3202 05 00

E-mail address: celina@iptsp.ufg.br

## RESUMO

A dengue é a arbovirose mais dispersa no mundo e representa hoje uma das maiores preocupações em saúde pública. Os vírus dengue são membros da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, sendo caracterizados quatro sorotipos virais (DENV-1 a DENV-4) e diferentes genótipos intra-típicos. O genótipo III do DENV-3 foi associado ao aparecimento de FHD no Sri Lanka e se dispersou pela Índia, África e América Latina. Atualmente, o DENV-3 é o sorotipo prevalente na maioria dos estados brasileiros com aumento de notificações de casos, hospitalizações e óbitos pela doença. O objetivo deste trabalho é caracterizar o genótipo circulante do DENV-3 pelo seqüenciamento genômico e análise filogenética de amostras isoladas de pacientes recrutados de unidades de saúde de referência na cidade de Goiânia-GO, entre 2005 e 2006. Pacientes com FHD e dengue com complicações com resultado de isolamento viral e/ou PCR positivo para DENV-3 foram selecionados de uma coorte de dengue e analisados com casos de dengue clássica selecionados randomicamente. A seqüência da região prM/M/E do genoma viral foi obtida em sete amostras e analisadas em comparação com cepas de referência. Os resultados mostraram a homologia das seqüências do estudo com as cepas do genótipo III. A identidade nucleotídica das amostras variou de 97,0% a 99,6% e de aminoácidos 97,5% a 99,5%. A análise da seqüência nucleotídica revelou mutações silenciosas e 14 substituições de aminoácidos na seqüência da proteína do gene prM/M/E. Em conclusão, o estudo confirma que as cepas de DENV-3 da região centro-oeste pertencem ao genótipo III. Alterações genômicas foram observadas ao longo do domínio III da proteína E, as quais poderiam afetar a patogenicidade, entretanto não foram consistentes entre as amostras de DCC e FHD. Amostras de pacientes com dengue clássica apresentaram alterações relatadas como pontos de atenuação viral. Maiores investigações serão necessárias para confirmar as alterações encontradas e sua relação com as formas clínicas.

## ABSTRACT

Dengue is currently considered a mosquito-borne disease with worldwide dispersion and an important public health problem. Dengue viruses are members of the *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus, and characterized by four serotypes (DENV-1 to DENV-4) with different genotypes intratypical. DENV-3 genotype III was associated with the appearance of dengue hemorrhagic fever (DHF) in Sri Lanka, and the later spread to the Indian, Africa and Latin American continent. Nowadays, DENV-3 is the prevailing serotype in Brazil with increasing trend of the report cases, hospitalizations and deaths. The objective of this manuscript is to characterize the DENV-3 genotype circulating regionally, performing the genomic sequencing and phylogenetic analysis of samples isolated from dengue patients recruited from references health units in the city of Goiânia, Goiás State between 2005-2006. Patients with DHF and complicated dengue forms who had positive virus isolation or positive PCR for DENV-3 were selected from a cohort of dengue and a comparison group of dengue fever was random selected for analysis. Seven samples had sequences of the prM/M/E region obtained and comparative analysis was performed with the reference strains. The results showed the homology of the genomics sequences with genotype III strains. The nucleotide identity of the all the samples varied from 97.0% to 99.6% and the amino acid sequences from 97.5% to 99.5%. The analysis of the nucleotide sequence revealed silent mutation and 14 amino acid changes in the protein deduced from gene prM/M/E. In conclusion, the study confirms that the strains of DENV-3 in Central Brazil relate to genotype III. The genomic changes along Domain III of the protein E were observed, which could affect the pathogenicity, but were not consistent between samples of DCC and DHF. Samples of patients with dengue fever had mutations related to viral attenuation. More investigation is necessary to evidence of genomic changes found in relationship with clinical forms.

## INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose mais dispersa no mundo, transmitida ao homem pela picada do *Aedes aegypti*, o principal vetor (Halstead 2007). A dengue representa hoje uma das maiores preocupações em saúde pública, pois nos últimos 30 anos apresentou uma contínua expansão geográfica com períodos epidêmicos e a tendência de aumento de formas graves. Atualmente, a dengue é endêmica em mais de 100 países nas regiões tropicais, podendo infectar anualmente cerca de 50 milhões de pessoas implicando em hospitalizações e mortes, com grande impacto econômico e social (Gubler 2002, WHO 2007, Harving & Rönsholt 2007).

Os vírus dengue (DENV) são membros da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Possui genoma RNA (~11 Kb) de fita simples, polaridade positiva, cuja única região ORF (*Open Read Frame*) codifica uma poliproteína, co- e pós-traducionalmente clivada em três proteínas estruturais (capsídeo C, membrana prM/M e envelope E) e 7 não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) (Heinz & Allison 2003). Os flavivírus são vírus de 40-60 nm de diâmetro constituídos por um capsídeo icosaédrico formado por pela proteína C, que circunda o genoma viral. O envelope viral incorpora a proteína E, a maior proteína de superfície do vírus, com propriedade antigênica, indutora de imunidade protetora, tendo como principal função participar da ligação com receptores celulares e fusão de membrana para a entrada do vírus (Kuhn et al. 2002, Lindenbach & Rice 2003).

Os DENV foram classificados em quatro sorotipos virais (DENV-1 a DENV-4) de acordo com diferenças antigênicas. A variabilidade genética dos vírus tem sido demonstrada pela caracterização filogenética em diferentes grupos em cada sorotipo denominados genótipos (Deubel et al. 1993, Lanciotti et al. 1997, Nogueira et al. 2000, Rico-Hesse 2003). A definição de homologia entre essas variantes foi determinada pela

comparação entre seqüências parciais da região estrutural do genoma viral de isolados do vírus DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 de diferentes regiões geográficas (Rico-Hesse 1990, Lanciotti et al. 1994, 1997, Gonçalves et al. 2002). A epidemiologia molecular tem demonstrado a origem e distribuição geográfica dos DENV e a associação de específicos genótipos intra-típicos com doença de maior ou menor gravidade (Lanciotti et al 1997, Leitmeyer et al. 1999, Rico-Hesse 1997, 2003, Nogueira et al. 2000, Messer et al. 2003).

Considerando a epidemiologia do DENV-3, Messer et al. (2003) mostrou a circulação de um novo variante do DENV-3, genótipo III, associada ao aparecimento de FHD em Sri Lanka em 1989 com dispersão pelo subcontinente indiano e África e, então, para a América Latina.

No Brasil, o DENV-3 circula concomitantemente com DENV-1 e DENV-2 desde a sua introdução no Rio de Janeiro, em 2000 (Nogueira et al. 2000, 2001). Este sorotipo apresentou rápida dispersão pelo país, causando epidemias em diversas cidades em 2002, tornando-se o sorotipo prevalente na maioria dos estados brasileiros (MS/SVS 2003, Teixeira et al. 2005) A partir de 2002 houve aumento de notificações, hospitalizações e óbitos pela doença (Siqueira Jr et al. 2005).

A caracterização molecular do DENV-3 identificou como genótipo III, o vírus circulante no Brasil, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase baseada em Sítios de Restrição Específicos (RSS-PCR) e pelo sequenciamento parcial e completo do genoma do DENV-3 (Féres et al. 2006, Miagostovich et al. 2002, 2006, Aquino et al. 2006). Foi determinada a origem asiática deste genótipo introduzido no Brasil pela passagem nas ilhas do Caribe. Mutações no genoma do DENV-3 foram demonstradas em alguns estudos, entretanto a associação dessas alterações com a gravidade da doença ainda não está totalmente esclarecida (Aquino et al. 2006, Zulueta et al. 2006).

No Brasil, estudos que determinam a diversidade genética dos DENV ainda são poucos e caracterizam predominantemente amostras da região sudeste do Brasil (Nogueira et al. 2000, dos Santos et al. 2002, Santos et al. 2004, Pires Neto et al. 2005, Miagostovich et al. 2002, 2003, 2006, Figueiredo et al. 2008).

Em Goiânia-GO cerca de 40% da população uma exposição prévia por dengue (Siqueira Jr et al. 2004), a circulação do genótipo III do DENV-3 a partir de 2003, tornando-se prevalente na região (Féres et al. 2006) e em 2005- 2006 durante a epidemia por DENV-3, os casos de FHD não foram associados à infecção secundária (Guillarde et al. 2008). Estes estudos abrem perspectivas para a caracterização molecular dos sorotipos e genótipos virais circulantes na região.

O presente manuscrito objetiva caracterizar o genótipo do DENV-3 de amostras selecionadas entre casos de dengue de diferentes formas clínicas diagnosticados em Goiânia-GO, entre 2005 e 2006, através do sequenciamento dos genes prM/M/E e análise filogenética.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***População de estudo***

As amostras do estudo foram selecionadas de uma coorte de 185 pacientes com confirmação laboratorial de dengue, cujos aspectos clínicos foram descritos em publicação recente (Guillarde et al. 2008). Em resumo, os pacientes foram recrutados em duas unidades de saúde de referência para dengue (Hospital Dr. Anuar Auad-HDT e CAIS Jardim Curitiba), no município de Goiânia-GO/Brasil, entre 2005-2006. A classificação clínica dos casos de dengue seguiu as definições do Ministério da Saúde. Os seguintes

testes laboratoriais foram realizados: 1) pesquisa de anticorpos IgM (MAC-ELISA); 2) isolamento viral em cultura de células C636, descritas em publicação anterior (Féres et al. 2006); 3) testes de avidéz para anticorpos IgG para determinação de infecção primária e secundária, 4) PCR multiplex para tipagem viral e 5) PCR em tempo real para determinação da carga viral, como apresentado por Levi et al. (2007). As técnicas de MAC-ELISA e isolamento viral foram realizadas no Laboratório de Saúde Pública Dr Giovanni Cysneiros – LACEN-GO, conforme rotina de vigilância laboratorial e as demais no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP em um trabalho cooperativo.

#### ***Critério de seleção das amostras***

Das 185 amostras de pacientes da coorte, verificamos quais tinham resultado de isolamento viral e/ou PCR positivo para DENV-3, dentre estas, selecionamos para o estudo todas as amostras de pacientes com clínica de FHD e dengue com complicações e sorteamos aleatoriamente amostras de pacientes com dengue clássica para composição das amostras de trabalho. As etapas referentes às reações de sequenciamento foram realizadas no LACEN-GO com o uso do sequenciador automático pertencente à Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA - PDTIS FIOCRUZ-RJ.

#### ***Isolamento viral***

O isolamento viral do DENV-3 foi realizado em etapa anterior pela inoculação de sangue ou soro dos pacientes em tubos de 16 x 125 mm contendo monocamadas de células *Ae. albopictus*, clone C6/36 confluentes (Igarashi 1978). Os tubos foram incubados em estufa a 28°C por 10 dias, quando as suspensões de células foram coletadas e utilizadas para identificação do sorotipo por imunofluorescência indireta (IF) com anticorpos monoclonais

tipo específicos (Gubler et al. 1984). O sobrenadante de cultura de células e o sangue/soro dos pacientes foram estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### ***Extração de RNA viral***

O RNA viral foi extraído de 200  $\mu\text{l}$  do soro ou sobrenadante da cultura de células infectadas com DENV-3, em primeira ou segunda passagem, utilizando colunas de extração Real Genomics (Real Biotech Corporation, US), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 40  $\mu\text{l}$  de água livre de *RNAse* e *DNase*.

### ***Oligonucleotídeos para sequenciamento***

Dez conjuntos de oligonucleotídeos (Quadro 1) foram sintetizados de acordo com a sequência disponibilizada por Miagostovich et al. (2006) para amplificar fragmentos de aproximadamente 500 pb das regiões prM/M e E do genoma do DENV-3.

### ***Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase - RT-PCR***

A amplificação dos fragmentos requeridos foi procedida usando um único tubo de reação. A mistura de reação consistiu de 1X PCR Master Mix (Promega, US), DTT 3  $\mu\text{M}$  (Promega, USA), cada primer a 0,5  $\mu\text{M}$  (Invitrogen, US), AMV-RT 5U (Promega, US) e água livre de *RNAse* e *DNase* completando um volume final de 45 $\mu\text{l}$ . Cinco microlitros de RNA viral foi adicionado à mistura reagente e o cDNA foi obtido diretamente por transcrição reversa à  $40^{\circ}\text{C}$  por 60 min, seguido de 40 ciclos de amplificação de  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 seg,  $58^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min e extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  de 10 min. Para amplificação foi utilizado o Termociclador Thermo Hybaid PxE 0,2 PCR (Thermo Scientific, US). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese com gel de agarose a

1,3% e brometo de etídeo visualizados sob luz UV. As amostras negativas foram re-inoculadas em cultura de células C6/36 e novamente submetidas à RT-PCR.

### ***Purificação dos produtos de PCR***

Os fragmentos amplificados pela PCR foram purificados utilizando o sistema comercial PureLink™ PCR Purification kit (Invitrogen, US), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

### ***Sequenciamento nucleotídico***

O DNA (20-200 ng) foi seqüenciado diretamente em ambas as direções usando *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, US), 1 pmol de oligonucleotídeos (Tabelas 1 e 2) e água para completar um volume aproximado de 10 µl. O sequenciamento consistiu de 30 ciclos de 96°C/30 seg, 50°C/1 min e extensão final 60°C/4 min. O produto seqüenciado foi purificado em colunas Centri-Sep (Princeton Separations, US) e o DNA seco a 37°C por 18 h. O sedimento foi reconstituído com 10 µl de formamida H-DI (Applied Biosystems, US), transferido para placas de reação e submetido à eletroforese em seqüenciador automático 48 capilares ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems).

### ***Seqüências do Genbank***

Para análise filogenética utilizamos seqüências protótipo representativas dos diferentes genótipos DENV-3 e cepas representativas de outros estados brasileiros disponíveis no Genbank e estão listadas na (Tabela 1).

Quadro 1. Oligonucleotídeos usados para amplificação e seqüenciamento de nucleotídeos das regiões prM, M e E do DENV-3.DENV-3.

Nome	Seqüência (5'-3')	Posição no genoma*
<b>D3-1</b>	GTTGTTAGTCTACGTGGACCGA	2-23
D3-2	GTTGATTCCAGAGGCTGTCTTA	511-532
D3-3	GCCTCTGGAATCAACATGTGCA	518-539
D3-4	CTTAGCCATGGTAGTCACACA	1022-1042
D3-5	GTGACTACCATGGCTAAGAACA	1025-1046
D3-6	GAACCATTGTCTATGTACCATCCA	1544-1567
D3-7	CGGACAGGTTTGGATTTC	1490-1508
D3-8	CAGTTGATTTTCAGGGCTT	2082-2100
D3-9	CAACTGGTACAGGAAGGGAA	2095-2114
D3-10	CTAATTCCGCACACTCCA	2569-2587

\*De acordo com AF316745

### *Análise filogenética*

A análise das seqüências nucleotídicas foi feita usando Chromas software versão 2,33 (Technelysium Pty Ltd, 2001, disponível em <http://technelysium.com.au/chromas.html>) e Clustal X (Thompson et al, 1997 disponível em <http://www.ib.usp.br/henning/software.htm>). As seqüências foram submetidas ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool/NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar a similaridade com as seqüências do DENV-3. O alinhamento das seqüências obtidas e das seqüências selecionadas para comparação foi feito pelo Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). O percentual de identidade entre as seqüências e a construção da árvore filogenética foi realizado utilizando-se os softwares Bioedit versão 7.0.9 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA disponível em [www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)) e Molecular Evolutionary Genetics Analysis - MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004, disponível em

<http://www.megasoftware.net/data.html> ), através dos métodos Neighbor Joining e Tamura Nei e bootstrap de 1000 replicações. Para permitir o enraizamento da árvore foram colocadas três seqüências como grupo externo, sendo o DENV-1, DENV-2 e DENV-4.

### *Qualidade das seqüências*

O programa Phred é largamente utilizado para avaliar a qualidade das seqüências obtidas em seqüenciador automático pela análise do cromatograma e atribui índices de qualidade que avaliam a probabilidade erros na inserção de base nucleotídica. Valor de  $Q \geq 20$  corresponde a 1 erro a cada 100 nucleotídeo e determina uma seqüência com qualidade. As seqüências do estudo foram analisadas por este programa e mostraram  $Q \geq 20$ .

### *Considerações éticas*

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética como uma continuidade do projeto inicial de vigilância laboratorial da dengue. Os pacientes que consentiram no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

## **RESULTADOS**

Amostras estocadas de DENV-3 isolados de 29 pacientes com diferentes quadros clínicos foram submetidas a RT-PCR para amplificação de fragmentos correspondentes à região estrutural do genoma viral (prM/M/E) (Figura 1). Estes genes foram sugeridos como importantes marcadores moleculares de patogenicidade dos DENV (Leitmeyer et al. 1999).

As amostras foram seqüenciadas utilizando 13 conjuntos de oligonucleotídeos que geraram fragmentos contíguos e se sobrepuseram, sendo analisados e editados com base

nos respectivos cromatogramas. A partir desta análise foi obtida uma seqüência consenso para cada uma das amostras.

Neste estudo obtivemos o seqüenciamento genômico do DENV-3 de 7 (sete) seqüências das regiões prM/M e do envelope viral, considerando-se 1977 nucleotídeos seqüenciados (Quadro 2).

Quadro 2. Características clínicas e laboratoriais das amostras de DENV-3 seqüenciadas no estudo.

<i>Nº amostra/ano</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Forma clínica</i>	<i>Tipo de infecção</i>	<i>Desfecho</i>	<i>Isolamento viral</i>	<i>PCR</i>	<i>Carga viral</i>
070/2005	34	F	DC	1ª	Cura	Pos	Pos	55874592.86
151/2005	21	F	DCC	1ª	Cura	Pos	Pos	762501.43
159/2005	36	M	DCC	2ª	Cura	Pos	Pos	775.71
278/2005	31	M	DCC	2ª	Cura	Neg	Pos	103428514.29
287/2005	17	F	FHD	1ª	Cura	Pos	Pos	2001595.71
516/2005	25	M	FHD	-	Óbito	Pos	Neg	-
701/2006	30	M	DC	-	Cura	Pos	Neg	-

Legenda: DC - dengue clássica; DCC: dengue com complicações; FHD: febre hemorrágica da dengue; 1ª – primária; 2ª – secundária; PCR – reação em cadeia da polimerase.

A Figura 2 mostra a análise filogenética das seqüências do estudo comparadas às seqüências representativas dos diferentes genótipos do DENV-3 obtidas do GenBank. As seqüências do estudo foram agrupadas com cepas representativas do genótipo III. Podemos observar a similaridade entre as seqüências formando subgrupos (clades) dentro do genótipo III. As seqüências do estudo apresentaram maior similaridade com a cepa brasileira RJ 74886-AY679147 e as cepas de Martinica (MQ/2001/AY099342 e MQ/1999/AY099337). Interessante observar que a seqüência GO070/2005, de paciente com dengue clássico, mostrou estreita relação com as cepas de Martinica, formando um

subgrupo à parte. À exceção da seqüência GO701/2006, as demais seqüências que apresentaram similaridade com a cepa do Rio de Janeiro AY976147 e eram de pacientes com dengue com complicações (DCC), FHD e óbito. Esta cepa de referência foi seqüenciada de um paciente com DCC e óbito.

O percentual de identidade nucleotídica das amostras do DENV-3 seqüenciadas variou de 97,0% a 99,6% e de aminoácidos 97,5% a 99,5%, quando comparados entre si e as seqüências referências do genótipo III (Tabela 2).

A análise da seqüência nucleotídica das amostras do estudo comparada à seqüência RJ-74886/AY976147 revelou alterações nucleotídicas que, em sua maioria, ocorreram na 3<sup>a</sup> posição do códon, provavelmente não determinando substituição de aminoácidos (mutações silenciosas) e foram mutações por transição (Quadro 3). O percentual médio de divergência nucleotídica nas regiões de estudo foi de 6,5%. Estes resultados indicam que as seqüências das proteínas das amostras de DENV-3 analisadas foram conservadas.

Quadro 3. Frequências dos pares de nucleotídeos do vírus DENV-3

<b>Domínio</b>	<b>Pares idênticos</b>	<b>Tr</b>	<b>Tv</b>
<b>Média</b>	<b>1888</b>	<b>75</b>	<b>14</b>
1 <sup>a</sup> Posição do códon	646	11	2
2 <sup>a</sup> Posição do códon	652	5	2
3 <sup>a</sup> Posição do códon	590	59	10

Legenda: Tr= transição; Tv= transversão; frequência média de todos os táxons apresentados no estudo incluindo as seqüências dos diferentes genótipos do DENV-3.

A Tabela 3 mostra a presença de alterações de aminoácidos entre as seqüências de DENV-3 estudadas e as cepas de referência. Foram encontradas 14 substituições de aminoácidos na seqüência da proteína deduzida do gene prM/M/E. A seqüência GO070/2005 apresentou uma alteração na posição M86 (R→H), tal como identificado no

Sri Lanka/1991. Na seqüência da proteína E observamos alterações significativas nos resíduos E47 (K→E), E383 (K→N), E386 (K→E), E388 (N→H), com mudança na carga do aminoácido, podendo repercutir em suas propriedades biológicas. Destacamos a mudança no resíduo E383 (K→N) em duas seqüências GO070/2005 e GO701/2006 isoladas de pacientes com dengue clássica, sendo que em GO701/2006 também ocorreu alteração em E388. Importante ressaltar que os resíduos E325, 357, 380, 383, 386, 388 e 391 estão localizados na região do domínio III do envelope viral, o qual tem sido considerado como domínio de receptor de ligação dos flavivírus (Chen et al. 1996). As mutações observadas nas posições E325 e E429 ocorreram especificamente no grupo de amostras seqüenciadas neste estudo.

## **DISCUSSÃO**

Os resultados do sequenciamento das regiões prM/M/E do genoma do DENV-3 realizado no presente estudo, evidenciam que o DENV-3 circulante em Goiânia-GO no período 2005-2006 pertence ao genótipo III, confirmando a caracterização realizada em 2002-2003 pela técnica de RSS-PCR (Féres et al. 2006). A RSS-PCR tem sido utilizada para a genotipagem dos vírus dengue, de forma mais simples e rápida, podendo ser útil para monitorar a circulação dos diferentes genótipos virais (Harris et al. 1999). Entretanto, o sequenciamento genômico tem se tornado acessível aos laboratórios nos últimos anos, sendo importante ferramenta da epidemiologia molecular pela caracterização genômica e análise filogenética dos vírus dengue.

O DENV-3, genótipo III, foi introduzido na região das Américas proveniente do Sudeste Asiático, pertencente ao genótipo do subcontinente indiano, tem um fenótipo de

elevada virulência com uma alta capacidade de replicação em células humanas e envolvimento na patogênese da doença (Rico-Hesse 2003).

O DENV-3 foi primeiramente detectado no Rio de Janeiro introduzido no Brasil pelas Ilhas do Caribe (Nogueira et al. 2001, Peyrefitte et al. 2003) oriundo do Sri Lanka (Messer et al. 2003). A introdução deste genótipo no Brasil foi caracterizada pela sua capacidade de rápida disseminação pelo país, causando epidemias explosivas (MS/SVS 2003, Nogueira et al. 2005, Siqueira et al. 2005).

Na análise filogenética, as seqüências do estudo agruparam-se em dois subgrupos dentro do genótipo III, sendo um representado pelas seis seqüências do estudo que apresentaram maior similaridade com a cepa do Rio de Janeiro - Brasil (AY679147), e o outro pela seqüência GO070/2005 que mostrou homologia com as cepas de Martinica (AY099342 e AY099337) (Figura 2). O percentual de identidade nucleotídica e de divergência foi similar a outros que descreveram um estudo semelhante (Muhareva et al. 2005, Cruz 2005).

À exceção da seqüência GO701/2006 as amostras seqüenciadas de pacientes com manifestações graves da doença agruparam com a cepa AY976147, isolada de um caso de SCD e óbito (Miagostovich et al. 2006). Foram observadas duas mutações específicas nos resíduos E325 (K→R) e E429 (V→I) na região do envelope viral (Tabela 3), entretanto, não representam alterações genômicas significativas, pois a mudança ocorreu dentro de um mesmo grupo de aminoácidos.

A proteína E dos flavivírus é a maior proteína de superfície dos vírions, contém aproximadamente 500 aminoácidos e é fortemente conservada entre o grupo. Recentes estudos de cristalografia têm mostrado que a proteína E do DENV é um complexo molecular organizado em três domínios: o domínio central, domínio I, o domínio de dimerização, domínio II e o domínio III que contém o receptor de ligação à célula do

hospedeiro. O domínio III possui de 300 a 400 aminoácidos é muito eficiente na neutralização dos flavivírus (Rey et al. 1995, Modis et al. 2004, 2005).

Nossas seqüências apresentaram mutações ao longo no domínio III da proteína do envelope. As alterações nos resíduos E383 (K→N) e E391(R→K) foram identificadas no estudo de Zulueta et al. (2006) como aminoácidos que afetariam a imunogenicidade do domínio III e estariam relacionados à maior capacidade protetora. Notavelmente, as duas seqüências de pacientes com dengue clássico (GO070/2005 e GO701/2006) mostraram resíduo N383, sendo que GO070/2005 apresenta também K391. Modis et al. (2005) determinou resíduos expostos na superfície dos DENV que provavelmente seriam epítomos responsáveis pela neutralização por anticorpos monoclonais e incluem os resíduos 291, 305 e 381, 383 e 389, estes últimos também relatados em outros estudos como epítomos de neutralização do DENV-2 (Hiramatsu et al. 1996, Hung et al. 2004, Modis et al. 2004). Holzmann et al. (1990) demonstraram que mutações em E384 e E386 (presente em GO070/2005) estariam relacionadas à atenuação do vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV). Uma asparagina no resíduo 388 parece ser causa de aumento na incidência de FHD, enquanto que resíduos carregados reduzem a virulência (Leitmeyer et al. 1999). Esta alteração também foi observada na seqüência GO701/2006.

A patogênese de FHD tem sido amplamente discutida e diferentes hipóteses têm sido aventadas na tentativa da elucidação do agravamento da doença. Pela teoria da amplificação da infecção dependente de anticorpos (ADE antibody – dependent enhancement), postulada por Halstead (1988), a infecção secundária é o principal fator na gravidade da doença admitida em vários estudos que descrevem casos de FHD em infecção secundária (Thein et al. 1997, Vaughn et al. 2000, Gúzman 2005, Alvarez et al. 2006, Pang et al. 2007).

A análise de aspectos epidemiológicos e virais tem produzido evidências da associação de epidemias de FHD com específicos sorotipos e/ou genótipos e podem indicar a virulência viral. Essas evidências foram demonstradas em estudos de genótipos do DENV-2, onde o sudeste asiático foi considerado mais virulento e o americano associado com dengue clássica (Rico-Hesse 1997, Watts et al. 1999, Leitmeyer et al 1999, Messer et al. 2003, Cologna & Rico-Hesse 2003).

Kouri et al. (1989), entretanto, descreveram que o desencadeamento de FHD/SCD possa ser consequência de um mecanismo complexo, multifatorial, envolvendo também fatores de riscos individuais e epidemiológicos (Gúzman & Kouri 2002, Torres 2005).

Os estudos desenvolvidos no Brasil têm contribuído para a identificação de sorotipos e genótipos circulantes e as rotas da dispersão do vírus pelo país (Miagostovich et al. 2003, Santos et al. 2004, Pires Neto et al 2005, Aquino et al. 2006). Evidências de características de virulência do DENV-2 (genótipo III) (Dos Santos et al. 2002) e das características virais do DENV-3 (genótipo III) em um caso de óbito (Miagostovich et al. 2006) foram observadas pelo sequenciamento completo do genoma desses vírus, e, contribuem para a discussão sobre uma associação desses genótipos com doença grave.

Nesse estudo realizamos a caracterização molecular de sete amostras de DENV-3, como genótipo III, isolados de pacientes com DC, DCC e FHD infectados durante as epidemias de 2005 e 2006. Não foram observadas específicas alterações nucleotídicas ou de aminoácidos nas regiões analisadas consistentes entre as amostras de DCC e FHD. Apesar de que as referidas amostras apresentaram homologia com a cepa do Rio de Janeiro isolada de um paciente com SDC e óbito, e algumas delas apresentarem doença grave em infecção primária. Com relação às amostras de dengue clássica, foram encontradas alterações em resíduos de aminoácidos ao longo do domínio III relatados como pontos de atenuação viral. Vários estudos relataram que mutações I e II afetam a virulência pela

influência na atividade de fusão, entretanto, mutações no domínio III têm levado a um melhor entendimento da estrutura e função dos epítopos de neutralização com implicação aos desenhos de vacina (Mandl et al. 2000, Hurrelbrink & McMinn 2003, Zulueta et al. 2006, Khanam et al. 2006).

O número de amostras analisadas neste estudo é relativamente pequeno, mas incentivam estudos com um maior número de isolados de DENV-3 de diferentes regiões para a confirmação das características virais correlacionadas com a forma clínica.

## REFERÊNCIAS

Aquino VH, Anatriello E, Goncalves PF, EV DAS, Vasconcelos PF, Vieira DS, Batista WC, Bobadilla ML, Vazquez C, Moran M, Figueiredo L T 2006. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg* 75: 710-715.

Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, Castro O, Kouri G, Halstead SB, Guzman MG 2006. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1113-1117.

Chen YM, Maguire T, Marks RM 1996. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol*. 70: 8765-8772.

Cologna R, Rico-Hesse R 2003. American genotypes structural decrease dengue output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 77: 3929-38.

Cruz ACR 2005. *Caracterização Molecular e Biológica dos Vírus Dengue Circulante no Brasil*. Tese de Doutorado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 198 pp.

Deubel V, Nogueira RMR, Drouet MT, Zeller H, Reynes JM, Ha DQ 1993. Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue-2 viruses. *Arch Virol* 129: 197-210.

Dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RMR, Edgil D, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E 2002. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 991-995.

Feres VC, Martelli CMT, Turchi MD, Junior JBS, Nogueira RMR, Rocha BA, Silva LF, de Jesus Silva MM, de Paula Cardoso DD 2006. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. *J Clin Virol* 37: 179-183.

Figueiredo LB, Cecílio AB et al. 2008. Dengue vírus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14 (2):314-16.

Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, Liprandi F 2002. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* 303: 110-119.

Gubler DJ 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33: 330-342.

Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 33: 158-165.

Guilarde AO, Turchi MD, Junior JBS, Feres VCR, Rocha BA, Levi J, Souza V, Boas LS V, Pannuti C, Martelli CMT 2008. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults:

Clinical Outcomes related to Viral Load, Serotypes and Antibody Response. *J Infect Dis* 197: 817-823.

Guzman MG 2005. Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience. *Science* 309: 1495-1497.

Guzman MG, Kouri G 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2: 33-42.

Halstead SB 2007. Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652.

Halstead SB 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476-481.

Harris E, Sandoval E, Xet-Mull AM, Johnson M, Riley LW 1999. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. *Virology* 253: 86-95.

Harving ML, Ronsholt FF 2007. The economic impact of dengue hemorrhagic fever on family level in Southern Vietnam. *Dan Med Bull* 54: 170-172.

Heinz FX, Allison SL 2003. Flaviviruses structure and membrane fusion. *Adv Virus Res.* 59: 63-67.

Hiramatsu K, Tadano M, Men R, Lai CJ 1996. Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody

resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. *Virology* 224: 437-445.

Holzman H, Heinz FX, Mandl CW, Guirakhoo F, Kunz C 1990. A single amino acid substitution in envelope protein of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *J Virol.* 64:5156-5159.

Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W 2004. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* 78: 378-388.

Hurrelbrink RJ, McMinn PC 2003 Molecular Determinants Of Virulence The structural and functional basis for flavivirus attenuation. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) *Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.*, California, Academic Press;. v. 59. p. 01-42.

Igarashi A 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 40: 531-544.

Khanam S, Etedmad B, Khana N, Swaminathan S 2006. Induction of neutralization antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes. *Am Trop Med Hyg.* 74(2): 266-277.

Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR 1987 Why Dengue Hemorrhagic Fever In Cuba? 2. An integral analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81(5): 821-3.

Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C 1989. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull WHO*. 67: 375-380.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108: 717-725.

Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW 1997. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* 78: 2279-2284.

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

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Ramos C, Rico-Hesse R 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73: 4738-4747.

Levi JE, Tateno AF, Machado AF, Ramalho DC, Souza AU, Guilarde AO, Feres VCR, Martelli CMT, Turchi AD, Siqueira-Jr JB, Pannuti C 2007 Evaluation of a Commercial Real-Time PCR kit for Dengue Diagnosis in samples collected during an outbreak in Goiânia-GO, Central Brazil, in 2005. *J Clin Microbiol*, 45 (6): 1893-97.

Lindenbach BD, Rice CM 2003. Molecular Biology of Flavivirus. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) *Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.*, California, Academic Press. v. 59. p. 23-61.

Mandl CW, Allison SL, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX 2000 Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J Virol* 74(20): 9601-9609.

Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 9: 800-809.

Miagostovich MP, dos Santos FB, Fumian TM, Guimaraes FR, da Costa EV, Tavares FN, Coelho JO, Nogueira RM 2006. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 307-313.

Miagostovich MP, Sequeira PC, Dos Santos FB, Maia A, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Harris E, Riley LW 2003. Molecular typing of dengue virus type 2 in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45: 17-21.

Miagostovich MP, dos Santos FB, de Simone TS, Costa EV, Filippis AM, Schatzmayr HG, Nogueira RM 2002. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res* 35: 869-872.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC 2005 Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol.*; 79(2):1223-31.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC 2004 Structure Of The Dengue Virus Envelope Protein After Membrane Fusion. *Nature.*; 427 (6972): 313-9.

MS/SVS 2003. Informe Epidemiológico da Dengue.

MS/SVS 2007 *Dengue: diagnóstico e manejo clínico*. Ministério da Saúde, Brasília, 28 pp.

Muhareva R, Andi P, Budian B, et al 2005. Genetics variants and relationship among dengue virus type 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue disease in Indonesia and Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36 (5): 1187-1197.

Nogueira RM, Schatzmayr HG, Filippis AM, dos Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, et al. 2005. Dengue virus type 3, Brasil, 2002. *Emerg Infect Dis*. 9: 1376-1381.

Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 925-926.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG 2000. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica* 16: 205-211.

Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG 2007. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 85: 43-45.

Peyrefitte CN, Couissinier-Paris P, Mercier-Perennec V, Bessaud M, Martial J, Kenane N, Durand JP, Tolou HJ 2003. Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). *J Clin Microbiol* 41: 5195-5198.

Pires Neto RJ, Lima DM, de Paula SO, Lima CM, Rocco IM, Fonseca BA 2005. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Braz J Med Biol Res* 38: 843-852.

Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC 1995. The Envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*; 375(6529): 291-298.

Rico-Hesse R 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59: 315-341.

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244-251.

Rico-Hesse R 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174: 479-493.

Santos CL, Sallum MA, Foster PG, Rocco IM 2004. Molecular analysis of the dengue virus type 1 and 2 in Brazil based on sequences of the genomic envelope-nonstructural protein 1 junction region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46: 145-152.

Siqueira JBJr, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 48-53.

Siqueira Júnior JB, Martelli CMT, Maciel IJ, Oliveira RM, Ribeiro MG, Amorim FP, Moreira BC, Cardoso DDP, Souza WV, Andrade AL 2004. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. *Am J Trop Med Hyg* 71: 646-651.

Teixeira Mda G, Costa Mda C, Barreto ML, Mota E 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica* 21: 1307-1315.

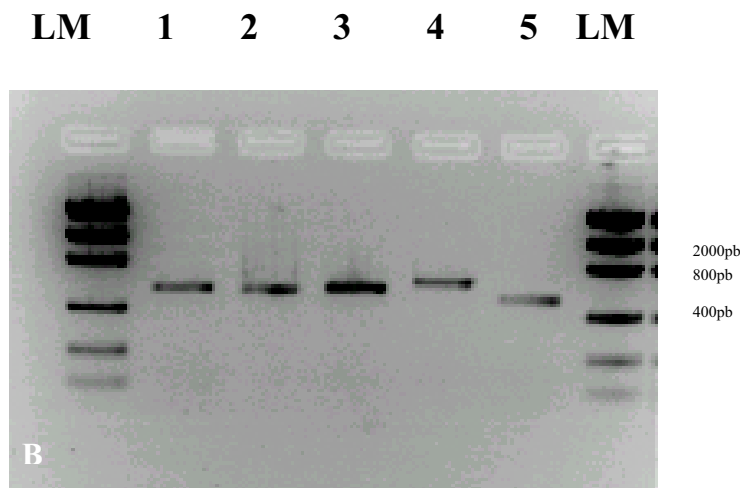
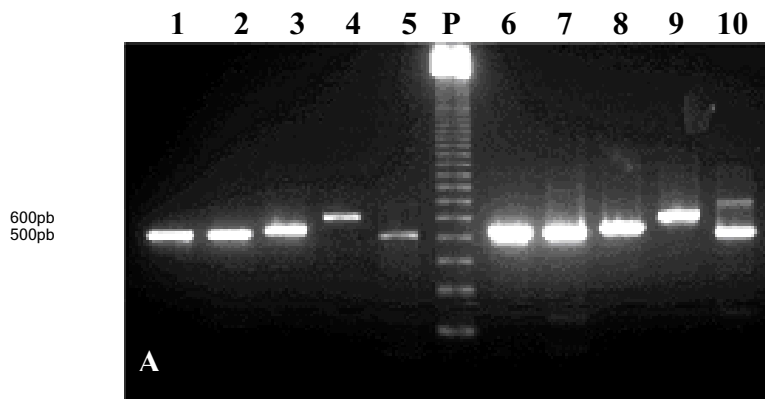
Thein S, Aung M, Shwe N, Aye M, Zaw A, Aaskov 1997. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 56: 566-572.

Torres EM 2005. *Dengue*. FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 344 pp.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181: 2-9.

Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 354: 1431-1434.

Zulueta A, Martin J, Hermida L, Alvarez M, Valdes I, Prado I, China G, Rosario D, Guillen G, Guzman MG 2006. Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res* 121: 65-73.



Figuras 1. A - gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídio dos fragmentos de DNA de amostras de DENV-3 produto da 1ª PCR de sequenciamento: faixas: 1-5 GO151, Padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen), 6-10 GO175; 1.B - gel de agarose 2,3% corado com brometo de etídio representando a quantificação de fragmentos de DNA do DENV-3 da amostra GO070 (faixa 1-5), Peso molecular ““Low DNA mass” (Invitrogen).

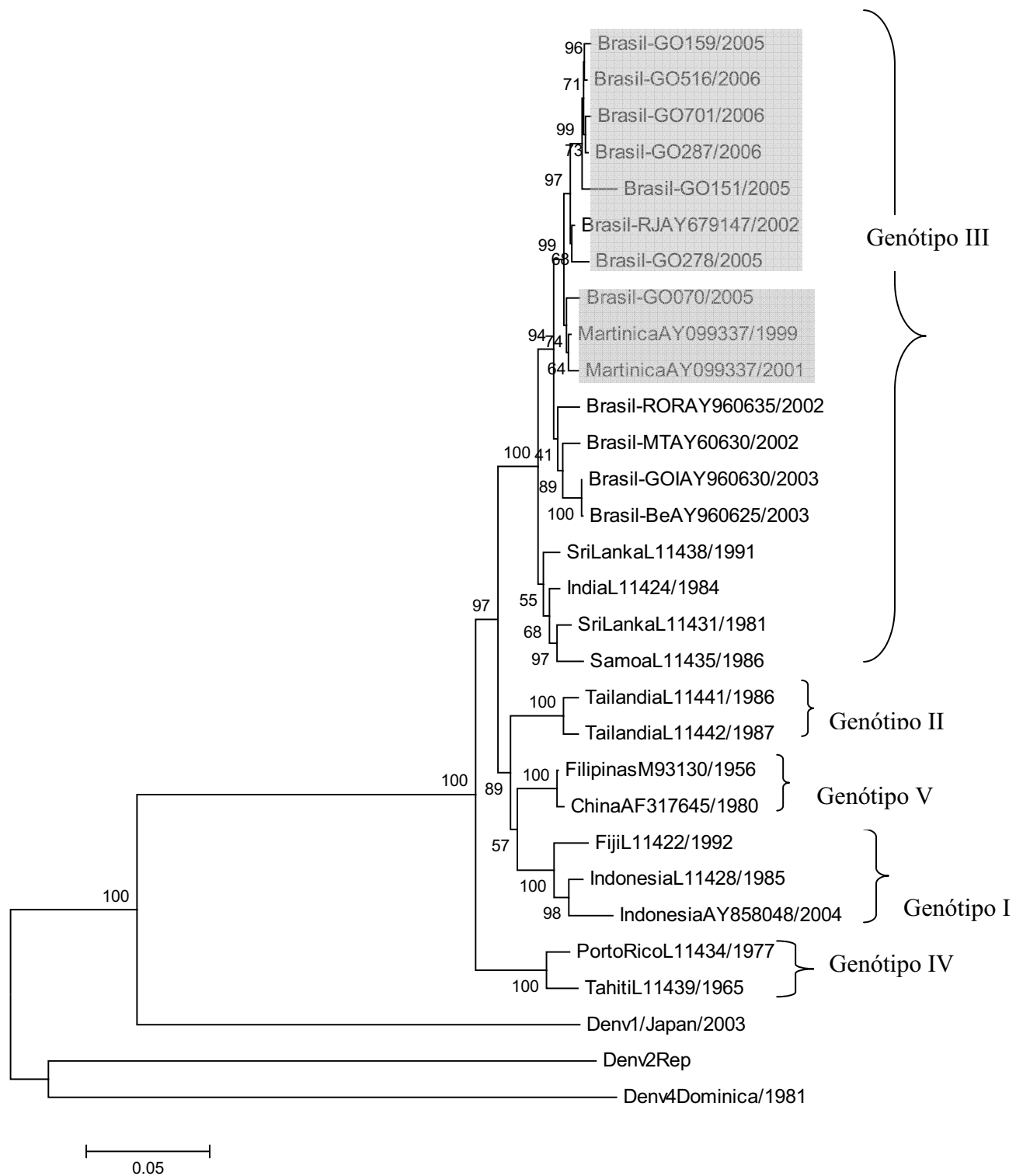


Figura 2. Análise filogenética das seqüências dos genes prM/M e E do DENV-3 comparadas a 20 seqüências de referência dos genótipos do DENV-3. A análise foi realizada pelo método Neighbour-Joining e Tamura Nei. Os valores de ‘bootstrap’ (1000 rep) estão demonstrados nos ramos principais. As seqüências de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 representam o grupo externo (“out group”). As seqüências de estudo estão marcadas em cinza. A barra de escala corresponde à razão de substituição nucleotídica.

Tabela 1. Sequências da região prM M e E do vírus dengue tipo 3 do estudo

Identificação	Classificação	Origem	Ano	Nº acesso GenBank	Genótipo
BR/74886/02	SCD	RJ, Brasil	2002	AY679147	III
BR/2005/GO070	DC	GO, Brasil	2005	Não disponível	III
BR/2005/GO278	DCC	GO, Brasil	2005	Não disponível	III
BR/2005/GO159	DCC	GO, Brasil	2005	Não disponível	III
BR/2005/GO516	FHD/OBITO	GO, Brasil	2005	Não disponível	III
BR/2006/GO701	DC	GO, Brasil	2006	Não disponível	III
BR/2005/GO287	FHD	GO, Brasil	2005	Não disponível	III
BR/2005/GO151	DCC	GO, Brasil	2005	Não disponível	III
D3Mart1243	Dengue	Martinica	1999	AY099337	III
D3Mart2336	Dengue	Martinica	2001	AY099342	III
GO11099	FHD	GO, Brasil	2002	AY960630	III
MTO3103	DC	MT, Brasil	2002	AY960632	III
ROR3845	DC	RR, Brasil	2002	AY960635	III
Be706617	DC	PA, Brasil	200	AY960630	III
2783	Dengue	Sri Lanka	1991	L11438	III
1416	Dengue	Índia	1984	L11424	III
1696	Dengue	Samoa	1986	L11435	III
1326	Dengue	Sri Lanka	1981	L11431	III
85-159	Dengue	Indonésia	1985	L11428	I
TB55I	Dengue	Indonésia	2004	AY858048	I
29472	Dengue	Fiji	1992	L11422	I
D86-007	Dengue	Tailândia	1986	L11441	II
MK315	Dengue	Tailândia	1987	L11442	II
1340	Dengue	Porto Rico	1977	L11434	IV
PR6	Dengue	Porto Rico	1963	L11433	IV
1327	Dengue	Tahiti	1965	L11439	IV
H-87	Dengue	Filipinas	1956	M93130	V
80-2	Dengue	China	1980	AF317645	V
Den1	Demgue	Japão	2003		-
Den2 DR31/01	Dengue	Rep Dominicana	2001	AB122021	-
Den4/814669	Dengue	Dominica	1981	AF326573	-

Legenda: SCD– síndrome do choque por dengue, DC- dengue clássica, D complic – dengue com complicações, FHD – febre hemorrágica da dengue, dengue – forma clínica não especificada.

Tabela 2. Identidade nucleotídica e de aminoácidos entre as seqüências prM M E do DENV-3 analisadas no estudo.

Sequencia	RJ7886	GO159	GO516	GO701	GO287	GO070	GO278	GO11099	Be706617	MT3103	RR3845	Mq/99	Mq/01	SL/91	Im/04	PR/77	H-87
Brasil-RJ7886/2002		99,0	99,2	98,9	99,1	98,9	99,2	98,1	98,1	98,2	98,2	99,3	99,0	97,7	92,9	93,2	94,8
Brasil-GO159/2005	<b>99,2</b>		99,6	99,3	99,5	98,2	98,5	97,4	97,4	97,6	97,5	98,6	98,3	97,1	92,3	92,6	94,1
Brasil-GO516/2006	<b>99,5</b>	<b>99,3</b>		99,5	99,6	98,3	98,6	97,6	97,5	97,7	97,6	98,8	98,5	97,2	92,4	92,9	94,3
Brasil-GO701/2006	<b>99,0</b>	<b>98,9</b>	<b>99,2</b>		99,6	98,2	98,4	97,5	97,5	97,7	97,6	98,7	98,4	97,2	92,3	92,7	94,0
Brasil-GO287/2006	<b>99,3</b>	<b>99,2</b>	<b>99,5</b>	<b>99,3</b>		98,2	98,5	97,6	97,5	97,8	97,6	98,7	98,4	97,1	92,3	92,8	94,2
Brasil-GO070/2005	<b>98,7</b>	<b>98,1</b>	<b>98,3</b>	<b>98,1</b>	<b>98,1</b>		98,2	97,8	97,7	97,7	97,9	99,1	98,9	97,3	92,2	92,8	94,3
Brasil-GO278/2005	<b>99,0</b>	<b>98,3</b>	<b>98,6</b>	<b>98,1</b>	<b>98,4</b>	<b>97,8</b>		97,5	97,4	97,8	97,5	98,7	98,4	97,0	92,4	93,1	94,3
BrasilGO11099/2003	<b>98,6</b>	<b>97,8</b>	<b>98,1</b>	<b>98,0</b>	<b>98,0</b>	<b>98,0</b>	<b>97,7</b>		99,9	98,6	98,3	98,4	98,1	97,6	92,0	92,6	94,0
BrasilBe706617/2003	<b>98,4</b>	<b>97,7</b>	<b>98,0</b>	<b>97,8</b>	<b>97,8</b>	<b>97,8</b>	<b>97,5</b>	<b>99,8</b>		98,5	98,2	98,4	98,1	97,6	92,0	92,6	93,9
BrasilMTO3103/2002	<b>98,3</b>	<b>97,5</b>	<b>97,8</b>	<b>97,8</b>	<b>97,8</b>	<b>97,7</b>	<b>97,7</b>	<b>98,1</b>	<b>98,0</b>		98,2	98,3	98,0	97,4	91,9	92,7	93,8
BrasilROR3845/2002	<b>98,4</b>	<b>97,7</b>	<b>98,0</b>	<b>97,8</b>	<b>97,8</b>	<b>98,1</b>	<b>97,5</b>	<b>98,0</b>	<b>97,8</b>	<b>98,0</b>		98,4	98,2	98,3	92,6	93,0	94,4
Martínica1243/1999	<b>99,6</b>	<b>98,9</b>	<b>99,2</b>	<b>99,0</b>	<b>99,0</b>	<b>99,0</b>	<b>98,7</b>	<b>98,9</b>	<b>98,7</b>	<b>98,6</b>	<b>98,7</b>		99,4	98,0	92,8	93,4	94,6
Martínica2336/2001	<b>99,2</b>	<b>98,6</b>	<b>98,9</b>	<b>98,7</b>	<b>98,7</b>	<b>98,9</b>	<b>98,3</b>	<b>98,4</b>	<b>98,3</b>	<b>98,1</b>	<b>98,6</b>	<b>99,5</b>		97,7	92,4	93,1	94,3
Sri Lanka1326/1991	<b>99,0</b>	<b>98,6</b>	<b>98,9</b>	<b>98,7</b>	<b>98,7</b>	<b>98,7</b>	<b>98,1</b>	<b>98,6</b>	<b>98,4</b>	<b>98,3</b>	<b>98,7</b>	<b>99,3</b>	<b>99,2</b>		92,9	93,3	95,0
IndonésiaTB551/2004	<b>97,4</b>	<b>96,6</b>	<b>96,9</b>	<b>96,5</b>	<b>96,8</b>	<b>96,8</b>	<b>96,5</b>	<b>96,3</b>	<b>96,2</b>	<b>96,0</b>	<b>96,5</b>	<b>97,4</b>	<b>97,2</b>	<b>97,1</b>		91,7	94,6
Porto Rico1340/1977	<b>96,9</b>	<b>96,5</b>	<b>96,8</b>	<b>96,3</b>	<b>96,6</b>	<b>96,5</b>	<b>96,3</b>	<b>95,9</b>	<b>95,7</b>	<b>95,9</b>	<b>96,0</b>	<b>96,9</b>	<b>96,9</b>	<b>96,6</b>	<b>96,5</b>		92,9
FilipinasH-87/1956	<b>98,3</b>	<b>97,5</b>	<b>97,8</b>	<b>97,4</b>	<b>97,7</b>	<b>97,4</b>	<b>97,4</b>	<b>96,9</b>	<b>96,8</b>	<b>96,6</b>	<b>97,1</b>	<b>98,0</b>	<b>97,8</b>	<b>97,7</b>	<b>97,7</b>	<b>96,5</b>	

\*Identidade de aminoácidos em negrito

Tabela 3. Alterações na seqüência de aminoácidos deduzida da proteína das regiões prM/M E do vírus dengue tipo 3 comparadas à seqüência Brasil-2002 AY976147.

Seqüência	Posição do aminoácido no gene													
	M	ENVELOPE												
	86	47	325	357	380	383	386	388	391	402	404	412	428	429
<b>BR/2002/AY679147</b>	R	K	K	T	I	K	K	N	R	A	T	I	N	V
BR/2005/GO070	<b>H</b>	<b>E</b>	.	.	.	<b>N</b>	<b>E</b>	.	<b>K</b>	.	.	.	.	.
BR/2005/GO278	.	.	.	.	<b>T</b>	.	.	.	.	.	.	<b>L</b>	<b>T</b>	.
BR/2005/GO159	.	.	<b>R</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>I</b>
BR/2005/GO516	.	.	<b>R</b>	<b>I</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>I</b>
BR/2006/GO701	.	.	<b>R</b>	.	.	<b>N</b>	.	<b>H</b>	.	.	<b>P</b>	.	.	<b>I</b>
BR/2005/GO287	.	.	<b>R</b>	.	.	.	.	<b>H</b>	.	<b>S</b>	.	.	.	<b>I</b>
SL/1991/L11438	<b>H</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	.	.	<b>N</b>	.	.	<b>K</b>	.	.	.	.	.

## CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Neste trabalho detectamos e identificamos os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 que circularam na região nos anos de 1994 a 2003. O DENV-1 foi o sorotipo prevalente nos anos 1994 a 2002, sendo substituído por DEN-3 a partir de 2003. A confirmação laboratorial foi incrementada pelo uso da RT-PCR e a RSS-PCR, que demonstrou ser útil na triagem dos genótipos circulantes. O aparecimento de formas graves da dengue não se relacionaram a nenhum sorotipo especificamente e a infecção pelo DENV-3 não sugeriu um papel relevante no aumento da gravidade da doença durante seu primeiro ano de dispersão no Centro-Oeste do Brasil.

A análise filogenética de amostras de DENV-3 isolados de pacientes com DC, DCC e FHD seqüenciadas neste estudo confirmou a circulação de genótipo III na região. As seqüências obtidas das regiões prM/M/E apresentaram homologia com as cepas do Rio de Janeiro e Martinica e mostraram-se altamente conservadas. Alterações genômicas significativas foram observadas ao longo do domínio III da proteína E, as quais poderiam afetar a patogenicidade, entretanto não foram consistentes entre as amostras de DCC e FHD. Por outro lado, as amostras de pacientes com dengue clássica apresentaram alterações em resíduos de aminoácidos no domínio III relatados como pontos de atenuação viral.

Embora, com um pequeno número de amostras seqüenciadas, uma das limitações do presente estudo, esperamos estar contribuindo com o melhor entendimento da epidemiologia molecular dos DENV no Centro-Oeste do Brasil e estimulando maiores investigações para confirmar as alterações encontradas, pois a identificação de marcadores de virulência ou atenuação viral dos DENV-3 relacionados à forma clínica representa sem dúvida um dos desafios para o conhecimento da patogenia e epidemiologia molecular da dengue.



## Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994–2003

Valéria Christina Rezende Feres<sup>a</sup>, Celina Maria Turchi Martelli<sup>b,\*</sup>, Marília Dalva Turchi<sup>b</sup>, João Bosco Siqueira Junior<sup>b</sup>, Rita Maria Ribeiro Nogueira<sup>c</sup>, Benigno Alberto Moraes Rocha<sup>b</sup>, Lucileis F.F. Silva<sup>a</sup>, Maysa Madalena de Jesus Silva<sup>a</sup>, Divina da Dores de Paula Cardoso<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Public Health Laboratory-LACEN-Go, Secretariat of State of Goiás, Goiânia-Goiás, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Tropical Pathology and Public Health, Rua 235, S/N, Setor Universitário, Goiânia-Goiás, 74605-050, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Received 13 March 2006; received in revised form 5 July 2006; accepted 18 July 2006

### Abstract

**Background:** In Brazil, dengue endemic and epidemic patterns indicate an upward trend in incidence and hospitalization in the past decade. **Objective:** To report dengue circulating serotypes from 1994 to 2003 and the role of distinct serotypes on dengue clinical outcomes in Central Brazil.

**Methods:** Virological surveillance for dengue cases was conducted in the city of Goiânia (~1,200,000 population) from 1994 to 2003. Samples were tested using dengue IgM antibody (MAC-ELISA) and/or virus isolation. Circulating subtypes and genotypes were identified by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and by restricted site-specific PCR (RSS-PCR) patterns in selected samples.

**Results:** Adults (87.4%) were the most affected group and dengue fever accounted for the majority of the cases. Laboratory surveillance identified mainly DEN 1 serotype from 1994 to 2002 shifting to a high circulation of DEN 3 in 2003. The ratio of dengue fever to dengue with complications/DHF remained constant following the introduction of DEN 3. Diagnosis of dengue was confirmed in ~50% of the suspected cases enhanced by RT-PCR. RSS-PCR patterns for DEN 1 and DEN 3 corresponded to the circulating subtypes in the country.

**Conclusions:** The result of virological surveillance did not suggest a major role of infecting DEN 3 serotype in increasing disease severity during its first-year spread in Central Brazil.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Dengue; Surveillance; Clinical; Virus isolation; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Diagnosis

### 1. Introduction

Dengue fever and dengue hemorrhagic fever (DHF) are considered among the most important vector-borne diseases in tropical regions, with an estimated annual incidence of 50–100 million cases of dengue fever and more than 500,000 reported cases of DHF and dengue shock syndrome (DSS) worldwide (Gubler, 1997; Guzman and Kouri, 2003). In Brazil, the introduction of DEN 1 (1986), DEN 2 (1990) and DEN 3 (2000) occurred in the southeast region, considered the main route for the spread of dengue virus countrywide (Nogueira et al., 2001; Miagostovich et al., 2002; Siqueira et

al., 2005). During the last decade, there was an upward trend in incidence, peaking with more than 300 cases per 100,000 inhabitants in the year 2002, with explosive epidemics in many large cities (Siqueira et al., 2005).

Dengue fever (DF) is mainly a mild acute febrile disease and DHF/DSS is characterized by fever, thrombocytopenia, hemorrhagic manifestations, and excessive capillary permeability that may progress to shock and death (WHO, 1997). Increased risk for severity of dengue outcomes are likely to be explained by a secondary infection due to a different serotype, or by correlation with virus virulence yielded by genetic variation (Halstead, 1997; Holmes and Twiddy, 2003). The role of distinct serotypes and/or previous infection on the severity of clinical outcomes has not been fully established (Endy et al., 2004). In Brazil, increasing rates of hospitalization due

\* Corresponding author. Tel.: +55 62 3259 34 71; fax: +55 62 3205 00 05.  
E-mail address: celina@iptsp.ufg.br (C.M.T. Martelli).

to DHF or severe DF cases, and increases in the number of deaths caused by the infection have been reported (Siqueira et al., 2005).

In the current study, we present the results of a laboratory surveillance conducted in the city of Goiânia in Central Brazil since dengue virus introduction in 1994–2003. We focused on the circulating serotypes, its temporal association with the outbreaks and the severity of the clinical cases. We also present the results of a pro-active surveillance to identify serotypes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the genetic characterization by RSS-PCR in selected samples. These findings are important to characterize the epidemiologic pattern of the first decade of dengue/DHF in one of the most populated cities in Central Brazil.

## 2. Methods

### 2.1. Surveillance and study site

Dengue/DHF is a reportable disease and the official Brazilian surveillance system was described in detail previously (Siqueira et al., 2005). Dengue is reported according to severity: (1) dengue fever, (2) dengue with complications, (3) dengue hemorrhagic fever (DHF) and (4) dengue shock syndrome (DSS). Dengue with complications includes the cases that do not fulfill the DHF criteria and the classical dengue case definition is inadequate due to the severity of the clinical manifestations, as follows: hemorrhagic or neurological manifestations, cardio-respiratory dysfunction, hepatic failure, thrombocytopenia (platelet counts  $< 50,000$  per  $\mu\text{L}$ ), leucopenia ( $< 1000$  cells) or death (Ministério da Saúde, 2005). DHF and DSS case definition follows standard criteria (WHO, 1997).

Laboratory surveillance was initiated since the first epidemic in 1994 in the city of Goiânia ( $\sim 1,200,000$  population), in Central Brazil. Suspected cases were from the main public infectious disease reference hospital and outpatient clinics covering the metropolitan area. Dengue incidence is estimated by case report from the surveillance system. Cases were routinely confirmed by serological test or virus isolation at the regional reference laboratory. Data on age, sex, disease classification, and disease outcomes for the reported cases were extracted from digital files from the official information system.

Serological tests were performed for serum collected after 5 days of the onset of symptoms using in-house dengue IgM antibody capture MAC-ELISA (Kuno et al., 1987). The Dengue Control Program recommends serological test to all suspected dengue case in non-epidemic periods. During epidemics, around 10% of the suspected cases should be tested by IgM serology (Ministério da Saúde, 2005). From 1994 to 2003, blood samples ( $< 7$  days after the onset of disease) were obtained from suspected dengue cases from hospitals and health centers throughout the year. Virus isolation was

performed at the reference laboratory (LACEN-Go, Brazil) using a monolayer of C6/36 *Aedes albopictus* cells (Igarashi, 1978). Dengue virus isolates were identified by an indirect fluorescent antibody test using serotype-specific monoclonal antibodies (Gubler et al., 1984).

### 2.2. Pro-active dengue surveillance

From May to December 2003, disease surveillance was enhanced to monitor circulating subtypes by adding molecular techniques. Eighty-seven suspected dengue cases had paired samples from acute and convalescent-phase ( $\sim$ day 14) collected. Aliquots of blood were immediately stored in liquid nitrogen and transported weekly to the reference laboratory for virus isolation and molecular testing. Besides routine dengue IgM antibodies, IgM/IgG antibodies were assessed by EIA (PanBio Indx, Inc., Baltimore, MD). Serology and virus isolation and reverse transcriptase PCR (RT-PCR) were performed for detecting the infecting serotype, and 12 viral isolates were analyzed by restriction site-specific-polymerase chain reaction (RSS-PCR) for genetic subtype.

The infecting DEN serotype was identified from acute-phase serum samples ( $n = 87$ ) by RT-PCR (Lanciotti et al., 1992). RNA was extracted according to standard protocol (Boom et al., 1990). Molecular subtyping of DEN 1, DEN 2 and DEN 3 were performed according to previously described techniques by using RSS-PCR (Harris et al., 1999; Miagostovich et al., 2000).

### 2.3. Statistical analysis

Descriptive statistics for the study population characteristics and laboratory findings were performed using SPSS Inc., Chicago, IL, Version 10.  $\chi^2$  test were applied for comparisons between proportions and  $p < 0.05$  considered to be significant. The study received the approval of the local Ethical Committee, and all patients or guardians gave informed consent for molecular techniques, which are not part of the routine surveillance.

## 3. Results

A total of 5553 samples from suspected dengue cases were tested for virus isolation from 1994 to 2003. DEN 1 was the only detected serotype until 1999 followed by virus isolation of DEN 2 and DEN 3 in 2002. The first confirmed DHF occurred in 1998.

During 2002, dengue virus was isolated in 22.8% out of 3052 samples tested. DEN 1 was isolated in 20.7% (632/3052) of the specimens being the predominant serotype among the positive isolates (90.7%), followed by DEN 2 (6.6%) and DEN 3 (2.7%). In 2003, dengue virus was isolated in 16.0% out of 431 samples tested. The predominant serotype was DEN 3 representing 76.8% of positives samples, followed by DEN 1 (17.4%) and DEN 2 (5.8%). There was

Table 1  
Serotypes of dengue virus isolated, Goiania-Central Brazil, 1994–2003

Years	Reported	Positive/total <sup>a</sup> (%)	Serotypes <sup>b</sup> (%)		
			DEN-1	DEN-2	DEN-3
1994–1998	8644	3/233 (1.3)	3 (100.0)	–	–
1999	468	17/284 (6.0)	14 (82.4)	3 (17.6)	–
2000	432	23/367 (6.2)	18 (78.3)	5 (21.7)	–
2001	6709	203/1 186 (17.1)	160 (78.8)	43 (21.2)	–
2002	17632	697/3 052 (22.8)	632 (90.7) <sup>c</sup>	46 (6.6)	19 (2.7) <sup>d</sup>
2003	7438	69/431 (16.0)	12 (17.4) <sup>e</sup>	4 (5.8)	53 (76.8) <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Percentages are positive divided by total samples tested for virus isolation.

<sup>b</sup> Percentages are dengue serotypes by positive samples.

<sup>c</sup> V<sub>s</sub>.

<sup>d</sup>  $\chi^2 = 251.8$ ;  $p < 0.001$ .

<sup>e</sup> V<sub>s</sub>.

<sup>f</sup>  $\chi^2 = 404.7$ ;  $p < 0.001$ .

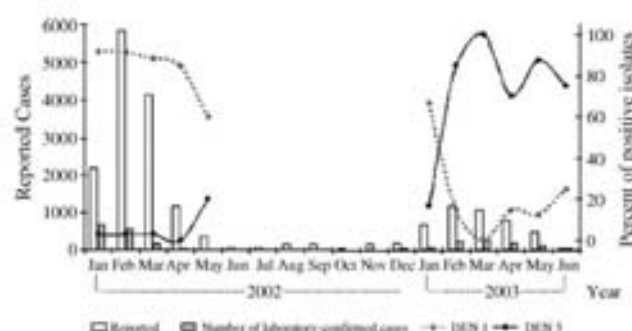


Fig. 1. Reported and laboratory-confirmed dengue cases plotted by months from January 2002 to June 2003. Blank bars show reported cases in the regional surveillance program and black bars the number of laboratory-confirmed cases. Gray lines represent percent of positive DEN 1 isolates and black lines the percent of positive DEN 3 isolates.

a statistically significant difference in the proportion of DEN 1 and DEN 3 isolations in both years ( $\chi^2 = 251.8$ ;  $p < 0.001$  and  $\chi^2 = 404.7$ ;  $p < 0.001$ ) (Table 1; Fig. 1).

The main characteristics of the symptomatic cases in which the infecting serotype was identified are presented

in Table 2. The majority of cases had mild disease and were categorized as dengue fever. The overall ratio male to female was around 1:1.3. The most affected age group was adult (>15 years of age) which comprised 87.4% in the reported dengue cases. Dengue with complications accounted for 22.2% among the DEN 1 isolates in 2002 and 28.3% among DEN 3 in 2003 ( $\chi^2 = 0.12$ ;  $p = 0.73$ ). Overall, eight cases were classified as DHF corresponding to 1.0% of the cases confirmed by isolation. Four deaths due to dengue were laboratory-confirmed by serology and/or immunohistochemistry (liver biopsy). Two were classified as DHF, two as dengue with complication, and all of them occurred in the adult population, age range 20–50 years.

Pro-active surveillance – dengue infection was laboratory confirmed in 47.1% out of 87 patients tested by RT-PCR, virus isolation and serology. RT-PCR identified the infecting serotypes in 25.3% of the samples (22/87): DEN 1 ( $n = 7$ ), DEN 2 ( $n = 7$ ) and DEN 3 ( $n = 8$ ). Three positive samples by viral isolation were also positive by RT-PCR, however, for 22 samples, the DEN was identified by RT-PCR. Thirty patients had IgM positivity (34.1%; IC95%, 24.6%–44.6%),

Table 2  
Characteristics of dengue cases according to serotypes, 2002–2003

Characteristics	Year 2002			Year 2003		
	DEN 1, $n = 632$ (%)	DEN 2, $n = 46$ (%)	DEN 3, $n = 19$ (%)	DEN 1, $n = 12$ (%)	DEN 2, $n = 4$ (%)	DEN 3, $n = 53$ (%)
Age (years)						
1–10	35 (5.5)	2 (4.3)	2 (10.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.9)
11–20	136 (21.5)	4 (8.7)	2 (10.5)	3 (25.0)	1 (25.0)	10 (18.9)
21–30	162 (25.6)	12 (26.1)	5 (26.3)	2 (16.7)	0 (0.0)	12 (22.6)
31–40	142 (22.5)	12 (26.1)	3 (15.8)	6 (5.0)	1 (25.0)	11 (20.8)
41–50	80 (12.7)	7 (15.2)	4 (21.1)	1 (8.3)	0 (0.0)	8 (15.1)
51–60	77 (12.2)	9 (19.6)	3 (15.8)	0 (0.0)	2 (50.0)	11 (20.8)
Disease classification						
Dengue fever	422 (66.8)	28 (60.9)	13 (68.4)	9 (75.0)	4 (100.0)	36 (67.9)
Dengue with complications	159 (22.2)	14 (30.4)	5 (26.3)	1 (8.3)	0 (0.0)	15 (28.3)
DHF <sup>a</sup>	4 (0.6)	2 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.9)
Not classified	47 (7.4)	2 (4.3)	1 (5.3)	2 (16.7)	0 (0.0)	1 (1.9)

Values shown in parenthesis are percentage, five records with missing data on age.

<sup>a</sup> DHF, dengue hemorrhagic fever.

with four sero-conversion in paired samples. Anti-dengue IgM/IgG antibodies were positive for 81.2% of the samples indicating cumulative dengue virus exposure.

DEN 1 belonged to RSS-PCR subtype C, and DEN 3 strains analyzed matched to subtype C. Both serotypes corresponded to the circulating strains in the country (De Simone et al., 2004). DEN 2 strains had similar profiles but could not be matched to known patterns.

#### 4. Discussion

In Central Brazil, the city of Goiania evolved from high DEN 1 circulation in 2002 to a high circulation of DEN 3 in 2003. Despite the co-circulation of three different serotypes in recent years, DHF and DF cases are still reported mainly in adults, which characterize a different pattern from Asian countries and some endemic American countries (Guzman and Kouri, 2003; Siqueira et al., 2005). The reintroduction of DEN 3 in the Americas occurred in Nicaragua and Panama in 1994, spreading to most American countries (Briseno-Garcia et al., 1996; Nogueira et al., 2001; Barbosa da Silva et al., 2002; Rigau-Perez et al., 2002). A study in Nicaragua showed that children already represent the major burden of dengue after 15 years of dengue virus circulation, and DEN 2 was the prevailing serotype (Hammond et al., 2005).

In our setting, the virological surveillance does not suggest a major role of infecting DEN 3 serotype in increasing disease severity since the ratio of dengue fever to dengue with complications/DHF remained constant. These findings are in concordance with data from Puerto Rico where there was no increase in disease severity associated with DEN 3 introduction in 1998 (Rigau-Perez et al., 2002). In contrast, the introduction of DEN 3 in the Rio de Janeiro State led to almost 2000 DHF cases and 91 fatalities in 2002 (Casali et al., 2004; Nogueira et al., 2005). The association between severity of disease and introduction of DEN 3 serotypes in both settings in Brazil should be interpreted with caution since primary and secondary dengue infection cannot be distinguished by the official Brazilian surveillance system. In our study more than 20% of laboratory-confirmed dengue cases were classified as dengue with complications showing the difficult to fulfill the DHF criteria. Previous studies have pointed out that the application of the WHO criteria for case ascertainment may underestimate the number of DHF and/or its severe clinical manifestations, especially among the adult population (Rigau-Perez and Bonilla, 1999; Balmaseda et al., 2005). Sequential viral dengue infections, virulence of different virus strains, previous immune status, genetic diversity of the population, age-related differences and co-morbidity are possible explanations for disease severity (Halstead, 1997; Hammond et al., 2005). Therefore, multiple and complex factors may contribute to dengue severity. Our results, although limited to a subset of the dengue cases and dengue serotypes, reflects the recent introduction of DEN 3 in Central Brazil.

In this study, the serotypes identification by viral isolation showed low yield. Viral isolation is considered a laborious and time-consuming methodology with well-known limitation for large scale monitoring (Guzman and Kouri, 2004; Shu and Huang, 2004). Nevertheless, it is the gold standard technique for virus detection (WHO, 1997). The RT-PCR technique enhanced the laboratory-confirmed cases in this investigation in concordance with previous publications showing that a combination of RT-PCR and virus isolation increases the laboratory diagnosis of dengue. The advantage of RT-PCR is that it allows a timely identification of dengue serotypes for diagnostic and surveillance purposes. The relatively simple RSS-PCR typing applied helped to characterize the common origin of dengue-1, according to the classification previously described in Brazil (Miagostovich et al., 2000; Miagostovich et al., 2002). The pattern detected in the dengue-3 strain belonged to subtype C, with a variation (Harris et al., 1999) also detected in samples from Brazil (Miagostovich et al., 2002) and Nicaragua (Balmaseda et al., 1999).

Our findings represent an early stage of DEN 3 transmission and that the impact of this serotype on disease severity may still not be noticeable. Continuous monitoring of circulating serotype enhanced with molecular techniques is critical for dengue surveillance not only to detect the introduction of a new serotype, but also to understand the transition on disease severity and the shift from age groups among different populations and regions.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Carmen Ramos and Flúvia Amorim for assistance. The financial support was provided by CNPq-470696/01-0; Pronex/CNPq/Sectec-23234156. Dr. Martelli received a CNPq Scholarship (307963/2004-7).

#### References

- Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, et al. Assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005;6: 1059–62.
- Balmaseda A, Sandoval E, Perez L, Gutierrez CM, Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1999;6:393–7.
- Barbosa da Silva Jr J, Siqueira Júnior JB, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta Jr FG. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull* 2002;1:3–6.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;3:495–503.
- Briseno-Garcia B, Gomez-Dantes H, Argott-Ramirez E, Montesano R, Vazquez-Martinez AL, Ibanez-Bernal S, et al. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico. *Emerg Infect Dis* 1996;2:133–5.
- Casali CG, Pereira MR, Santos LM, Passos MN, Fortes Bde P, Ortiz Valencia LI, et al. The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004;4:296–9.

- De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;9:553–62.
- Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, et al. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 2004;6:990–1000.
- Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. New York: CAB International; 1997. p. 1–22.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984;1:158–65.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003;1:1–13.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004;2:69–80.
- Halstead SB. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Wallingford, UK: CAB International; 1997.
- Hammond SN, Balmaseda A, Perez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005;6:1063–70.
- Harris E, Sandoval E, Xet-Mull AM, Johnson M, Riley LW. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. *Virology* 1999;1:86–95.
- Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003;1:19–28.
- Igarashi A. Isolation of a Singh's *aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978;3:531–44.
- Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1987;1:153–9.
- 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;3:545–51.
- Miagostovich MP, dos Santos FB, de Simone TS, Costa EV, Filippis AM, Schatzmayr HG, et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Brazil J Med Biol Res* 2002;8:869–72.
- Miagostovich MP, dos Santos FB, Gutierrez CM, Riley LW, Harris E. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2000;3:1286–9.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ª edição, Brasília. 2005.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAP, Schatzmayr H. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;86:925–6.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, Filippis AM, dos Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 2005;9:1376–81.
- Rigau-Perez JG, Ayala-Lopez A, Garcia-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg* 2002;4:355–62.
- Rigau-Perez JG, Bonilla GL. An evaluation of modified case definitions for the detection of dengue hemorrhagic fever. *Puerto Rico Association of Epidemiologists. P R Health Sci J* 1999;4:347–52.
- Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;4:642–50.
- Siqueira Jr JB, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. *Emerg Infect Dis* 2005;1:48–53.
- WHO. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd ed. Geneva; 1997. p. 34–47.

# Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response

Adriana O. Guilarde,<sup>1</sup> Marília D. Turchi,<sup>1</sup> Joao Bosco Siqueira Jr.,<sup>1</sup> Valeria C. R. Feres,<sup>2</sup> Benigno Rocha,<sup>1</sup> Jose E. Levi,<sup>2</sup> Vanda A. U. F. Souza,<sup>2</sup> Lucy Santos Vilas Boas,<sup>2</sup> Claudio S. Pannuti,<sup>2</sup> and Celina M. T. Martelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás and <sup>2</sup>Laboratório Central de Saúde Pública de Goiás (LACEN-GO), Secretaria de Estado da Saúde de Goiás, Goiânia, and <sup>3</sup>Laboratório de Virologia, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina e Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

**Background.** Clinical manifestations of dengue vary in different areas of endemicity and between specific age groups, whereas predictors of outcome have remained controversial. In Brazil, the disease burden predominantly affects adults, with an increasing trend toward progression to dengue hemorrhagic fever (DHF) noted.

**Methods.** A cohort of adults with confirmed cases of dengue was recruited in central Brazil in 2005. Patients were classified according to the severity of their disease. Associations of antibody responses, viremia levels (as determined by real-time polymerase chain reaction [PCR]), and serotypes (as determined by multiplex PCR) with disease severity were evaluated.

**Results.** Of the 185 symptomatic patients >14 years of age who had a confirmed case of dengue, 26.5% and 23.2% were classified as having intermediate dengue fever (DF)/DHF (defined as internal hemorrhage, plasma leakage, manifested signs of shock, and/or thrombocytopenia [platelet count,  $\leq 50,000$  platelets/mm<sup>3</sup>]) and DHF, respectively. The onset of intermediate DF/DHF and DHF occurred at a late stage of disease, around the period of defervescence. Patients with DHF had abnormal liver enzyme levels, with a >3-fold increase in aspartate aminotransferase level, compared with the range of values considered to be normal. Overall, 65% of patients presented with secondary infections with dengue virus, with such infection occurring in similar proportions of patients in each of the 3 disease category groups. Dengue virus serotype 3 (DV3) was the predominant serotype, and viremia was detected during and after defervescence among patients with DHF or intermediate DF/DHF.

**Conclusions.** Viremia was detected after defervescence in adult patients classified as having DHF or intermediate DF/DHF. Secondary infection was not a predictor of severe clinical manifestation in adults with infected with the DV3 serotype.

Dengue virus (DV), a positive-strand RNA virus of the Flaviviridae family with 4 distinct serotypes (DV1–4), is transmitted to humans by several species of the *Aedes* mosquito [1, 2]. Dengue infection affects ~100 million people annually, predominantly in tropical and sub-

tropical regions, which can lead to explosive outbreaks in urban areas [3–5]. Population-based studies suggest that asymptomatic infections are the main outcome of DV exposure [6, 7]. Clinical manifestations of exposure to DV range from mild dengue fever (DF) to dengue hemorrhagic fever (DHF), a plasma leakage syndrome with a potential life-threatening form known as “dengue shock syndrome” (DSS) [1, 2, 8].

In the Americas, Brazil accounts for ~70% of reported cases of dengue in recent years [9]. According to data from the Brazilian Surveillance System, there were ~345,000 cases of DF, with 628 laboratory-confirmed cases of DHE/DSS and 67 deaths, reported in 2006 [10]. Since the introduction of DV3 in 2000, 3 serotypes (DV1–DV3) have been noted to cocirculate nationwide, with a trend toward increases in the incidence of DHF

Received 16 July 2007; accepted 23 October 2007; electronically published 12 February 2008.

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: Brazilian Ministry for Science and Technology (grants Pronex/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq]/Sector and CNPq-470696/01), CNPq (scholarship 307963/2004-7 to C.M.T.M.).

Reprints or correspondence: Dr. Celina M. T. Martelli, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia/GO, Brazil, CEP 74605-050 (celina@iptsp.ueg.br).

**The Journal of Infectious Diseases** 2008; 197:817–24

© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.  
0022-1899/2008/19706-0007\$15.00

DOI: 10.1093/infdis/jin105

and the number of DHF-associated hospitalizations during the past decade [9, 11, 12]. These data indicate a shift from mild illness toward a more severe clinical manifestation that could be interpreted as an epidemiologic transition pattern. In Brazil, DF and DHF/DSS are predominantly reported among adults; in contrast, in other countries in the Americas and in Southeast Asia, children are the most affected subpopulation [9, 13–16].

Several studies have explored the risk factors that may predict progression of disease from DF to DHF and/or DSS [17–20]. Issues related to immune status, population genetics, viremia titers, distinct serotypes, and the proinflammatory cytokines elicited were investigated predominantly among children in Southeast Asian countries [20–22]. Age at infection and the presence of secondary DV infection due to heterologous serotypes have been associated with disease severity, with the latter risk factor known as the “antibody-dependent enhancement theory” [23]. However, predictors of disease severity are not consistent across all settings [5, 22, 24]. In the present study, we assessed the association of disease severity with primary or secondary DV infections, viremia titers, and DV serotypes among adults during the months when dengue is at its peak in central Brazil. The objective of the study was to determine whether secondary infection or viral titers were related to the clinical outcomes in a cohort of adult patients with dengue.

## METHODS

**Study population and setting.** A clinical cohort of patients with suspected cases of dengue was recruited in the city of Goiânia (population, ~1.2 million) in the midwestern region of Brazil, during an outbreak occurring from January 2005 through July 2005. The first outbreak of infection due to DV1 in the region was reported in 1994, with sequential introduction of DV2- and DV3-associated outbreaks noted in 1999 and 2002, respectively. According to regional laboratory surveillance, there was a shift in predominance of infection with DV1 to infection with DV3 in the city, with cocirculation of 3 serotypes [25]. Patients were enrolled in the reference infectious diseases hospital (Hospital of Tropical Diseases), in one private hospital, and in primary health care units in the same catchment area. The study protocol was approved by the institutional ethics review board. Signed, informed consent was obtained from all participants or legal guardians.

**Design and data collection.** The inclusion criteria were age  $\geq 15$  years and laboratory-confirmed dengue. We prospectively collected baseline demographic and clinical information from all patients, by use of a standard study protocol. Data on age, sex, previous dengue episodes, and key warning signs of illness (e.g., hypotension, intense abdominal pain, and significant bleeding) were recorded. Clinical data and laboratory test results were recorded in each patient's file and were checked by the clinical coordinator. The duration of follow-up for hospitalized patients

was defined as the period from the first medical visit to either the discharge date or death. The duration of follow-up for outpatients was measured as the interval between the first and second blood collections performed during the convalescent phase of disease ( $\sim 15$  days).

**Dengue classification.** DF was defined by the presence of acute febrile illness and  $\geq 2$  of the following symptoms: headache, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, rash, and hemorrhagic manifestations. DHF was defined as fever with thrombocytopenia (platelet count,  $\leq 100,000$  platelets/ $\text{mm}^3$ ), any hemorrhagic manifestation or positive tourniquet test result, and evidence of plasma leakage (as denoted by a  $\geq 20\%$  increase in the hematocrit from the baseline value or by the presence of pleural or abdominal effusion or hypoalbuminemia). DHF was classified into 4 grades of severity, according to definitions of the World Health Organization (WHO): for grade 1, a positive tourniquet test result was the only hemorrhagic manifestation; for grade 2, spontaneous bleeding was noted; for grade 3, hypotension, a narrow pulse pressure ( $\leq 20$  mm Hg), restlessness, and a rapid, weak pulse were noted; and, for grade 4, shock was identified but blood pressure or pulse was undetectable [1]. Intermediate DF/DHF was defined as internal hemorrhage, plasma leakage, manifested signs of shock, and/or thrombocytopenia (defined by a platelet count of  $\leq 50,000$  platelets/ $\text{mm}^3$ ). This group comprised patients who did not fulfill the criteria for DHF/DSS. This intermediate DF/DHF category is in concordance with current case definitions for clinical management published by the Brazilian Control Program Guideline [26]. To grade disease severity, other studies have adopted similar clinical groups [17, 27, 28]. Cases of dengue were confirmed by (1) DV isolation or DV RNA detection by multiplex polymerase chain reaction (PCR) or real-time PCR or (2) IgM antibody capture (MAC) ELISA in the first or second paired samples. Primary and secondary infections were identified using an IgG avidity test [29].

**Definition of variables.** The first 5 days after onset of symptoms were considered to denote the early, acute phase of illness. Illness “day 1” was defined as the day of onset of symptoms. “Day 0” was defined as the day of defervescence, “day - 1” was defined as the day before defervescence, and “day + 1” was defined as the day after defervescence. Hospitalized patients remained within a hospital ward for at least 24 h. Patients receiving day care were patients who stayed in the hospital for intravenous fluid replacement for  $< 24$  h. Ambulatory patients were defined as those patients who attended outpatient clinics without requiring any hospitalization during the current episode of illness.

**Virologic and serologic assays.** Blood samples (10 mL) were collected at the initial clinical visit and  $\sim 15$  days after the onset of symptoms. Serologic testing of serum samples collected during the acute and convalescent phases of illness was performed using in-house dengue MAC ELISA [30]. For specimens collected until day 5 after the onset of symptoms, virus isolation

**Table 1. Demographic data and clinical and laboratory parameters, according to clinical categories, for 185 patients with confirmed dengue.**

Characteristic	DHF <sup>a</sup> (n = 43)	Intermediate DF/DHF <sup>b</sup> (n = 49)	DF (n = 93)	P <sup>c</sup>
Age, mean ± SD, years	32.7 ± 14.4	33.0 ± 13.9	32.4 ± 12.7	.97
Sex, ratio of females to males	1.7:1.0	1.3:1.0	1.2:1.0	.68
Hospitalization	39 (90.7)	26 (53.1)	23 (24.7)	<.01
Spontaneous hemorrhage	36 (83.7)	26 (53.1)	35 (37.6)	<.01
Platelet count nadir, <sup>d</sup> platelets/mm <sup>3</sup>				
>100	...	9 (18.4)	42 (47.2) <sup>e</sup>	<.01
>50 to ≤100	12 (27.9)	6 (12.2)	47 (52.8)	
≤50	31 (72.1)	34 (69.4)	...	
Hematocrit increase, <sup>f</sup> %				
≥20	21 (48.6)	8 (17.4) <sup>g</sup>	...	<.01
≥10 to <20	19 (44.2)	18 (39.1)	16 (24.3)	
<10	3 (7.0)	20 (43.5) <sup>h</sup>	53 (75.7) <sup>i</sup>	
Serum level, median (range)				
Albumin, g/dL	3.1 (2.1–4.5)	3.9 (3.0–4.1)	4.2 (3.5–5.9)	<.01
AST, U/L	161 (36–3635)	116 (35–402)	91 (18–1254)	<.05
ALT, U/L	132 (17–782)	82 (17–340)	67 (11–622)	<.01

**NOTE.** Data are no. (%) of subjects, unless otherwise indicated. DF (dengue fever) and DHF (dengue hemorrhagic fever) were defined according to World Health Organization criteria. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

<sup>a</sup> Six patients had DHF grade 1, 26 patients had DHF grade 2, and 11 patients had DHF grade 3 or 4.

<sup>b</sup> Dengue characterized by internal hemorrhage, plasma leakage, manifested signs of shock, and/or thrombocytopenia (platelet count, <50,000 platelets/mm<sup>3</sup>).

<sup>c</sup> The  $\chi^2$  test was used for categorical variables, and the Kruskal-Wallis test was used for comparison of the median values.

<sup>d</sup> The platelet count nadir was defined as the lowest platelet value obtained.

<sup>e</sup> Data were missing for 4 patients.

<sup>f</sup> Forty-six of the patients with intermediate DF/DHF had ≥2 hematocrit determinations performed, and 69 of the patients with DF had ≥2 hematocrit determinations performed.

<sup>g</sup> Data were missing for 24 patients.

<sup>h</sup> Data were missing for 3 patients.

was performed using a monolayer of C6/36 *Aedes albopictus* cells [31], and DV isolates were identified using an indirect fluorescent antibody test that used serotype-specific monoclonal antibodies. Serologic and virologic tests were performed at the regional reference laboratory (Laboratório Central de Saúde Pública de Goiás [LACEN-Go]), according to the recommendation of the Dengue Control Program [25]. All samples were also evaluated by use of an IgG avidity test, real-time PCR, and multiple PCR performed in the virology laboratory at the Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil [32]. All tests were performed without the investigators having previous knowledge of the epidemiologic and clinical data.

The IgG avidity test was performed on acute- and convalescent-phase samples that were IgG positive and were obtained within 30 days after the onset of symptoms, by use of an "in-house" ELISA. In brief, antigens were prepared with *A. albopictus* C6/36 cells infected with DV1–4 and disrupted by sonication. The avidity index, expressed as a percentage, was calculated by determining the ratio of optical density with urea to the optical density without urea and then multiplying that value by 100 [29]. A receiver-operating char-

acteristic curve analysis performed using Analyze-it software (version 1.73; Analyze-it Software) was used to evaluate the ability of the avidity test to distinguish between primary and secondary dengue infections. The cutoff point was defined as the highest sum of the estimates of sensitivity and specificity. Secondary infection was defined by an IgG avidity index cutoff point of 30%.

**RNA extraction.** RNA was extracted in duplicate from 140  $\mu$ L of plasma, by use of the Qiagen Viral RNA Kit (Qiagen). Elution was performed in 60  $\mu$ L of elution buffer, according to the manufacturer's instructions.

**cDNA synthesis and multiplex RT-PCR.** cDNA was synthesized and multiplex PCR performed as described below. In brief, 5  $\mu$ L of cDNA was added to 20  $\mu$ L of a PCR mix consisting of primers D1, TS1, and TS2 at 0.5  $\mu$ mol/L and primers TS3 and TS4 at 0.125  $\mu$ mol/L; 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 1  $\times$  PCR buffer; 200  $\mu$ mol/L dNTPs; and 1.25 U of Platinum Taq polymerase (Invitrogen). Fragments of different lengths were obtained from dengue serotypes: a 482-bp fragment was obtained from DV1, a 119-bp fragment from DV2, a 290-bp fragment from DV3, and a 389-bp fragment from DV4 [33].

**Table 2. Antibody response patterns, dengue viremia titers, and serotypes noted for 185 patients with confirmed dengue, according to clinical category of disease.**

Variable	DHF (n = 43)	Intermediate DF/DHF* (n = 49)	DF (n = 93)	P†
<b>Antibody response pattern‡</b>				
Primary infection	13 (31.0)	14 (29.8)	36 (39.1)	.46
Secondary infection	29 (69.0)	33 (70.2)	56 (60.9)	
<b>Serum samples positive for viremia,§ n/N*</b>				
At <=5 days‡	6/11	15/25	42/61	.79
At >5 days‡	5/32	1/24	4/32	.40
<b>Viral load,¶ median (range), log<sub>10</sub> RNA copies/mL</b>				
At <=5 days‡	4.45 (2.87–6.30)	4.78 (2.36–8.01)	5.62 (2.23–8.98)	.05
At >5 days‡	3.51 (2.69–5.26)		3.10 (1.38–3.41)	.33
<b>Serotypes‡</b>				
DENV-3	8 (80.0)	10 (100.0)	38 (95.0)	NA
DENV-2	2 (20.0)		1 (2.5)	
DV2/DV3			1 (2.5)	

**NOTE.** Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated. Dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue fever (DF) were defined according to World Health Organization criteria. NA, not available.

\* Dengue characterized by internal hemorrhage, plasma leakage, manifested signs of shock, and/or thrombocytopenia (platelet count, <50,000 platelets/mm<sup>3</sup>).

† The  $\chi^2$  test was used for categorical variables, and the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for comparison of median values.

‡ A total of 181 patients had their immune status assessed by use of an IgG avidity test.

§ As determined by reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR).

¶ The no. of samples with positive viremia/total no. of samples tested.

‡ After the onset of symptoms.

¶ As determined by multiplex PCR.

**Real-time PCR.** Duplicates of 10  $\mu$ L of RNA eluate were directly applied to a dengue real-time commercial kit (RealArt; artus/Qiagen) in a final volume of 25  $\mu$ L and were analyzed on ABI 7300 real-time equipment (Applied Biosystems). The mean value of the duplicate was adopted. A previous study evaluated the use of real-time PCR for the diagnosis of dengue in samples collected from all enrolled patients [32].

**Laboratory values.** Hematocrit and platelet analyses were performed for all patients with dengue, as recommended by the Brazilian Clinical Guideline for Management [26]. Hematocrit and platelet data for hospitalized patients were collected at least once per day. Data on serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and albumin were obtained and recorded at study entry for hospitalized and day care patients; data were obtained again when clinical manifestations were noted, and nadir values were reported. The reference values for normality were a serum AST level of  $\leq$ 45 U/L, a serum ALT level of  $\leq$ 43 U/L, and an albumin level of 3.5–5.0 g/dL. Chest radiography and ultrasonography were performed for patients with suspected pleural effusions or ascites, for further documentation of plasma leakage.

**Statistical analysis.** The positive predictive accuracy (PPA) of the clinical diagnosis was defined as the number of laboratory-confirmed cases divided by the total number of suspected cases. We compared the clinical characteristics and laboratory results

of the patients, according to health care settings and severity. The  $\chi^2$  test was applied for categorical variables, and the Kruskal-Wallis test was used to compare the median values for skewed data distribution, when appropriate. A 2-tailed P value of <.05 was considered to be statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS software for Windows (version 13.0; SPSS).

## RESULTS

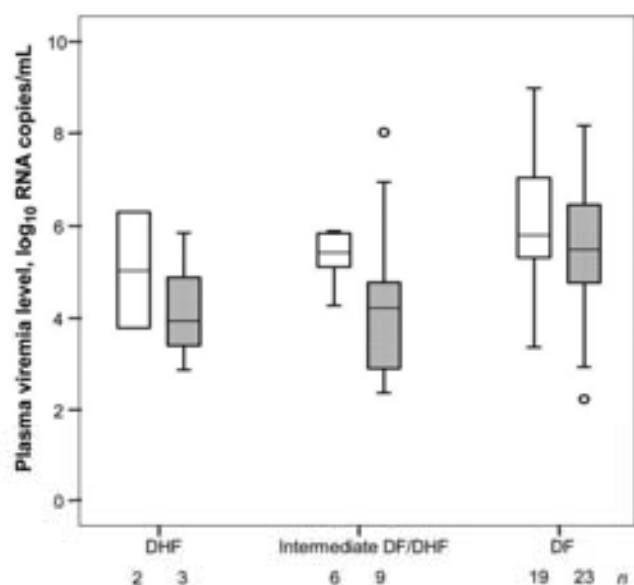
**Patient characteristics.** A total of 226 patients  $\geq$ 15 years of age underwent screening, and 185 of these patients had laboratory-confirmed dengue: 76 (41.1%) had cases confirmed by real-time PCR and/or multiplex PCR and/or viral culture, and 109 (58.9%) had cases confirmed by IgM serologic tests. The ratio of females to males was 1.3:1.0. Almost one-half of the patients were admitted to a hospital ward, 34.6% were monitored in day care settings, and 17.8% were ambulatory patients. The PPA of the suspected clinical diagnosis was  $\sim$ 80%, with similar percentages noted for specific sex and age groups.

Table 1 presents the demographic characteristics of and clinical and laboratory parameters for patients with dengue, according to disease category. Of 185 laboratory-confirmed cases of dengue, 43 (23.2%) were classified as DHF and 93 (50.3%) were classified as DF. Among patients with DHF, 32 (74.4%) pre-

sented with grade 1 or 2 disease, and 11 (25.6%) had hypotension and/or shock (grade 3 or 4 disease), with 2 deaths occurring. Forty-nine patients were classified as having intermediate DF/DHF and presented with  $\geq 1$  of the following severe manifestations of dengue: signs of shock (11 patients), internal hemorrhage (11 patients), plasma leakage (10 patients); and thrombocytopenia (34 patients). Mean age ( $\pm$ SD) was similar among patients, regardless of disease category, and females were slightly outnumbered by males in all groups. All patients with DHF were hospitalized, except for 4 day care patients. The mean duration of hospitalization ( $\pm$ SD) was  $4.3 \pm 2.6$  days. One-half of the patients with intermediate DF/DHF required hospitalization (mean duration, 3.4 days), and  $\sim 25\%$  of patients with DF were also hospitalized (mean duration, 2.6 days). Spontaneous hemorrhage was more frequently observed among patients with DHF (83.7% of patients) and patients with intermediate DF/DHF (53.1% of patients) than among patients with DF (37.6%) ( $P < .01$ ). Approximately 70% of patients with intermediate DF/DHF had a platelet count nadir of  $\leq 50,000$  platelets/ $\text{mm}^3$ . Almost one-half of patients with DF had a platelet count of  $< 100,000$  cells/ $\text{mm}^3$ . The incidence of bleeding was negatively correlated with the platelet count ( $P < .01$ ). A hematocrit increase of  $\geq 20\%$  was detected in  $\sim 50\%$  of patients with DHF. For the remaining patients, plasma leakage was documented by either pleural or abdominal effusion or hypoalbuminemia. The median albumin level was significantly different among patients in different disease groups ( $P < .01$ ). Liver involvement, as denoted by AST and ALT levels, was greater among patients with DHF and severe manifestations than among patients with DF ( $P < .05$ ). Of patients with DHF, 62.2% had a  $> 3$ -fold increase in the serum AST level (compared with reference values for levels considered to be normal), whereas patients with intermediate DF/DHF and those with DF had 38.7% and 34.1%, respectively, which was a statistically significant difference ( $P = .03$ ).

**Assignment to primary or secondary infection group.** Overall, 65% of patients presented with secondary infections. There were no statistically significant differences in the percentage of patients with secondary infection among the groups. Approximately 70% of patients with intermediate DF/DHF and 61% of patients with DF had secondary infections ( $P = .46$ ) (table 2). There was a trend toward an increase in the development of secondary infection according to age group, with 53.3% of patients 15–25 years of age and 80.8% of patients  $> 50$  years of age developing such infection.

**Viremia and serotypes.** Of the samples collected within 5 days of the onset of symptoms, the percentage that were positive for viremia, as determined by molecular tests, was 50%–68% among the disease groups ( $P = .79$ ). The percentage of samples positive for viremia varied from 4% to 15% for samples collected 5 days after the onset of symptoms, and the percentage was not statistically significant different among groups ( $P = .40$ ). Median viremia titers were similar among patients with DHF or inter-

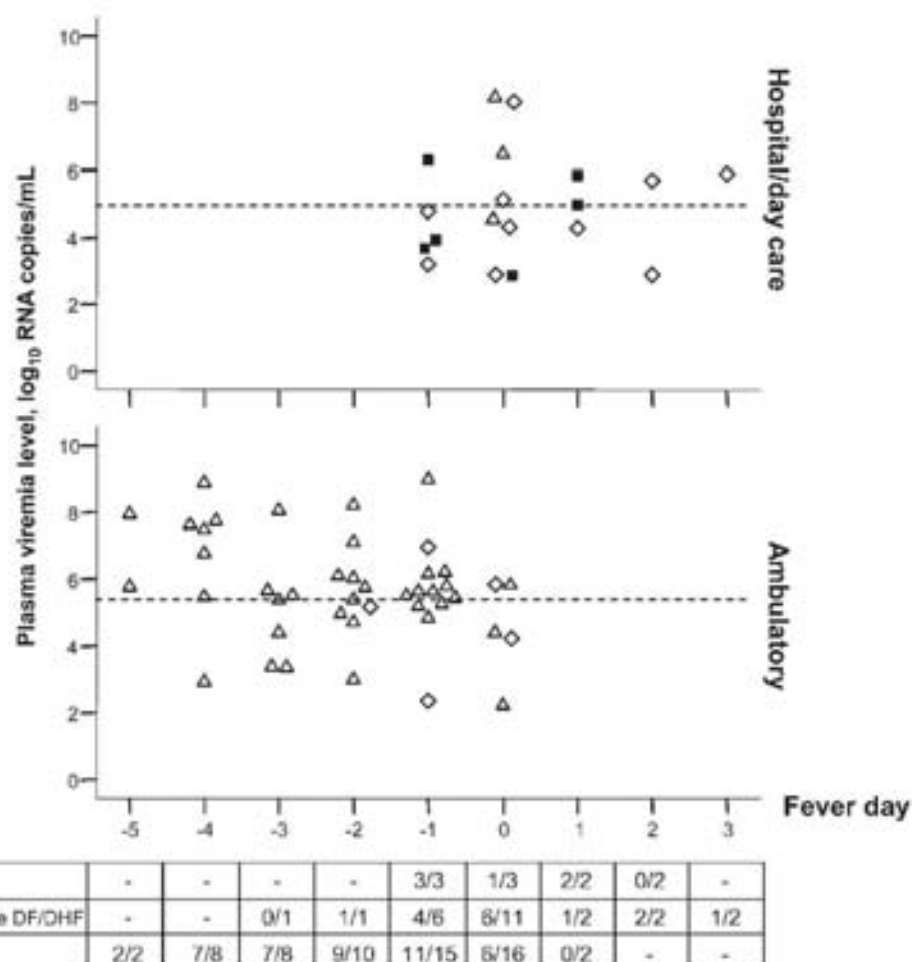


**Figure 1.** Box-plot distribution of viremia levels by primary and secondary dengue infection, according to dengue severity, for samples collected within 5 days of the onset of symptoms. Circles denote outlier values; white boxes, primary infection; gray boxes, secondary infection; horizontal lines, median values. *n*, no. of positive samples, as determined by reverse-transcription polymerase chain reaction. DF, dengue fever; DHF, dengue hemorrhagic fever; intermediate DF/DHF, dengue characterized by internal hemorrhage, plasma leakage, manifested signs of shock, and/or thrombocytopenia (platelet count,  $\leq 50,000$  platelets/ $\text{mm}^3$ ).

mediate DF/DHF (4.45 and 4.78  $\log_{10}$  RNA copies/mL, respectively) and patients with DF (5.62  $\log_{10}$  RNA copies/mL), for samples collected within 5 days of the onset of symptoms. DV3 was the predominant serotype, as determined by multiplex PCR, and 3 patients had DV2 infection (table 2). Dual infection (with DV2 and DV3) was detected, by means of multiplex PCR, in 1 patient, who demonstrated the following characteristics: mild illness, serologic test results compatible with secondary infection, and a viral load of 2.22  $\log_{10}$  copies/mL.

Figure 1 presents the box-plot distribution of the viral load by disease category and by primary and secondary dengue infection, considering samples collected within 5 days of the onset of symptoms. There was no statistical difference between the viremia levels noted in association with primary and secondary infections, for each disease category.

Figure 2 shows the viral titers for specimens collected within 5 days of the onset of symptoms, as stratified by disease category and type of attendance according to defervescence day. For ambulatory patients with DF, a median viral titer of 5.51  $\log_{10}$  RNA copies/mL was detected. A similar result (4.84  $\log_{10}$  RNA copies/mL) was found among patients with intermediate DF/DHF who were hospitalized or in day care settings. At defervescence (day 0), median viremia titers were similar among patients with severe cases and patients with DF. Patients with DHF or intermediate DF/DHF had late viremia from days 1–3 after defervescence.



**Figure 2.** Levels of dengue viremia, by "fever day," in plasma samples collected within 5 days of the onset of symptoms, according to whether the patient was receiving care in a hospital/day care setting or was an ambulatory patient receiving outpatient care. Fever day 0 was defined as the day that defervescence occurred, day -1 was defined as 1 day before defervescence, and day +1 was defined as 1 day after defervescence. Dashed lines denote median levels of viremia. For each disease category shown in the key, the  $n/N$  values denote the no. of samples with positive viremia/the total no. of samples tested. DF, dengue fever; DHF, dengue hemorrhagic fever; intermediate DF/DHF, dengue characterized by internal hemorrhage, plasma leakage, manifested signs of shock, and/or thrombocytopenia (platelet count,  $\leq 50,000$  platelets/ $\text{mm}^3$ ).

## DISCUSSION

Our findings showed that, in the epidemiologic scenario, mild cases of dengue were predominant among adults, and severe cases due to DV3 were not associated with secondary infection. Most patients with DHF or intermediate DF/DHF were  $>5$  days beyond the onset of symptoms at the point-of-care setting. Of interest, plasma viremia remained detectable during the postdefervescence period among patients with severe disease.

In the present study,  $\sim 70\%$  of patients with severe illness had secondary infection, a finding similar to the percentage of patients with DF who had secondary infection (60%). These findings are in agreement with the clinical, epidemiologic, and virologic characteristics noted in dengue studies that also showed the lack of association between disease severity and secondary dengue infection in Nicaragua [17, 34]. Of interest, DV3 was the

predominant serotype in our setting as well as in that in the study by Harris et al. [34]; this suggests that primary infections with this serotype may lead to a severe clinical outcome in adults. These findings support the role of virus virulence as a potential risk factor for disease severity [14, 20, 35, 36].

Our findings in adults contrast with prospective studies conducted in Asia among children [20, 23]. In these studies, an increased relative risk for severe disease was noted among children with evidence of previous DV infection, in accordance with the established immune enhancement theory. Fatal cases were reported in the course of primary infection in Brazil [37]. In a retrospective study in Thailand, secondary dengue infection was significantly associated with DHF outcomes in children, but not in adults [18]. In Cuba, epidemiologic studies documented that the majority of overt cases (DF or DHF cases) were secondary dengue infection with DV1 and/or DV2 serotypes [38]. In our

results, ~30% of primary infections were found in patients with severe and nonsevere cases, in contrast with findings from the Cuban experience. A possible explanation is the more recent circulation of DV in central Brazil, since the first outbreak of DV1 infection occurred in 1994 [25]. In addition, in this study area, a previous household survey conducted in 2000 detected an overall prevalence of 30%, which increased with age, indicating a large susceptible population [6].

The hemagglutination inhibition test or the IgM/IgG ELISA ratio determinations are traditionally performed to define primary and secondary dengue infections [39]. In a previous study, the IgG avidity test exhibited sensitivity and specificity equivalent to those of the IgM/IgG ELISA ratio determinations and the IgG titer assay for discriminating primary from secondary acute DV infection, with all 3 assays maintaining high sensitivity (100%) and specificities (range, 95.7%–97.8%) [40]. The WHO/Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) report stated that the IgG avidity ELISA can be used to differentiate primary from secondary infection, and it considers this technique to be more useful than the hemagglutination inhibition test for this purpose [5, 41]. The possible identification of secondary flavivirus infection rather than true secondary DV infection cannot be ruled out. However, if a cross-reaction occurred, it would have resulted in overestimation of the secondary infection rates.

A number of studies, mainly those conducted among children in Asia, have correlated viremia with dengue severity [19, 20]. In a study conducted in Taiwan, patients with DHF had a higher viral load and a slower rate of clearance of viremia than did adult patients who had DF with secondary DV2 infection [42]. Our results showed detectable viremia levels from days 1–3 after the defervescence period among groups in the adult population with DHF or intermediate DF/DHF, by use of real-time PCR. The possible explanations for detectable viremia among patients with DHF at defervescence and afterward should consider, in addition to prolonged viremia, differences in the viremia clearance rates and the contribution of primary and secondary infection to the clearance rate [42], although this study was not designed to describe the kinetics of viremia. In the DF group, the fact that few patients were tested for viremia in the defervescence period precludes meaningful comparisons of these patients with patients with severe disease. In our setting, 75% of patients with DHF and intermediate DF/DHF arrived at the point of care while already in the defervescence transition period, whereas patients with DF were mostly seen at the early onset of symptoms. Under the assumption of late onset of DHF/DSS, if our study protocol had included only patients in the early, acute phase of illness (<5 days after the onset of the illness), when viremia is highly detectable, only 25% of the patients with DHF and 50% of the patients with DHF or intermediate DF/DHF would have been recruited. This selective criterion to recruit only patients in the early stages of illness would exclude most adult patients with severe cases of dengue in central Brazil.

For patients with DF and those with intermediate DF/DHF, no differences were observed in the proportion of samples positive for viremia or in the median viremia titers. However, one limitation of the present study is that viremia was measured at a single point in time that corresponded with the time of entry of the patient into the study, and peak viremia might not have been identified. We analyzed viremia levels within 5 days of the onset of symptoms, because, in our previous report [32], there was no significant difference between the median viremia titers detected between days 1–3 and days 4–5 of illness (data not shown).

Approximately 27% of patients with intermediate DF/DHF had  $\geq 1$  of the 4 severe manifestations of dengue, including internal hemorrhage, plasma leakage, manifested signs of shock, and/or marked thrombocytopenia, but they did not fulfill the DHF/DSS WHO criteria [1]. Other studies have also suggested that the number of severe cases of dengue may be underestimated by adopting this criterion [17, 27]. Controversies about the application of WHO dengue classification have been extensively discussed in the literature, mainly in relation to the documentation of plasma leakage in adult patients [43–45]. Evidence of hepatic inflammation was demonstrated by high median serum levels of AST and ALT in patients with DHF or intermediate DF/DHF, compared with those noted in patients with DF. The lack of serial daily determinations of laboratory values for day care attendees or outpatients is a limitation that could result in underestimation of AST and ALT values. However, abnormal liver enzyme values have been associated with disease severity in several other reports [46–48].

In conclusion, abnormal liver enzyme levels were associated with a poor outcome of dengue. Detection of viremia after the defervescence period was observed in adult patients classified as having intermediate DF/DHF and DHF. Secondary infection was not a predictor of severe clinical manifestation in adults, who were primarily infected with serotype DV3 in central Brazil.

## Acknowledgments

We thank Josela Palmeira, Andrea Finotti, and Tinoir Soares de Oliveira for technical assistance. We thank the director and staff at the Hospital of Tropical Diseases for their support.

## References

1. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control. 1997:1–58. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>. Accessed 5 January 2006.
2. Gubler DJ, Kuno G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing, 2001.
3. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ* 2002; 324:1563–6.
4. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2002; 10:100–3.
5. World Health Organization. Report of the meeting of the Scientific Working Group on Dengue (Geneva). 2006:1–168. Available at: <http://www.who.int/csr/don/20060111/>

- www.who.int/tdr/publications/publications/swg\_dengue\_2.htm. Accessed 12 July 2007.
- Siqueira JB, Martelli CM, Maciel JJ, et al. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71:646–51.
  - Yeh WT, Chen RF, Wang L, Liu JW, Shiao MF, Yang KD. Implications of previous subclinical dengue infection but not virus load in dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48:84–90.
  - Lee MS, Hwang KP, Chen TC, Lu PL, Chen TP. Clinical characteristics of dengue and dengue hemorrhagic fever in a medical center of southern Taiwan during the 2002 epidemic. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39: 121–9.
  - Siqueira JB Jr, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:48–53.
  - Brazilian Ministry of Health. Epidemiology of dengue until December 2006 [in Portuguese]. 2006:1–17. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_dez2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_dez2006.pdf). Accessed 10 December 2006.
  - De Simone TS, Nogueira RM, Araújo ES, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98:555–62.
  - Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1376–81.
  - Zagne SM, Alves VG, Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Tavares W. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 677–9.
  - Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74:449–56.
  - Montenegro D, Lacerda HR, Lira TM, et al. Clinical and epidemiological aspects of the dengue epidemic in Recife, PE, 2002 [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:9–13.
  - Habstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 2006; 20:407–15.
  - Hammond SN, Balmaseda A, Pérez L, et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:1063–70.
  - Wichmann O, Hongsirirong S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 1022–9.
  - Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, et al. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 2004; 189:990–1000.
  - Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000; 181:2–9.
  - Nguyen TH, Nguyen TL, Lei HY, et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:370–4.
  - Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 2006; 80:11418–31.
  - Habstead SB, Nimmanitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 1970; 42:311–28.
  - Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ* 2005; 83:308–14.
  - Feres VC, Martelli CM, Turchi MD, et al. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994–2003. *J Clin Virol* 2006; 37:179–83.
  - Ministério da Saúde. Dengue: diagnosis and clinical handling. 2005. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue\\_manejo\\_clinico\\_2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue_manejo_clinico_2006.pdf). Accessed 30 January 2006.
  - Balmaseda A, Hammond SN, Pérez MA, et al. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:1059–62.
  - Wichmann O, Gascon J, Schunk M, et al. Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators. *J Infect Dis* 2007; 195: 1089–96.
  - de Souza VA, Fernandes S, Araújo ES, et al. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1782–4.
  - Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36:153–9.
  - Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978; 40:531–44.
  - Levi JE, Tateno AF, Machado AF, et al. Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of dengue virus in samples collected during an outbreak in Goiânia, Central Brazil, in 2005. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1893–7.
  - Harris E, Roberts TG, Smith L, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2634–9.
  - Harris E, Vide E, Pérez L, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63:5–11.
  - Rosen L. Disease exacerbation caused by sequential dengue infections: myth or reality? *Rev Infect Dis* 1989; 11:8840–2.
  - Anantapreecha S, Chanama S, Anuegoonpipat A, et al. Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol Infect* 2005; 133:503–7.
  - Nogueira RM, Miagostovich MP, Cunha RV, et al. Fatal primary dengue infections in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:418.
  - Guzmán MG, Kouri G, Valdes L, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 2000; 152:793–9.
  - Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, et al. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:693–8.
  - Souza VA, Tateno AF, Oliveira RR, et al. Sensitivity and specificity of three ELISA-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. *J Clin Virol* 2007; 39:230–3.
  - Mathews S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. Use of four dengue virus antigens for determination of dengue immune status by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5784–6.
  - Wang WK, Chen HL, Yang CF, et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 2006; 43:1023–30.
  - Rigau-Préz JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:297–302.
  - Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health* 2006; 11:1238–55.
  - Deen JL, Harris E, Wills B, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 2006; 368:170–3.
  - Libraty DH, Endy TP, Hwang HS, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 2002; 185:1213–21.
  - Souza LI, Alves JG, Nogueira RM, et al. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. *Braz J Infect Dis* 2004; 8:156–63.
  - Uehara PM, da Cunha RV, Pereira GR, de Oliveira PA. Liver involvement in patients with dengue hemorrhagic fever: a rare phenomenon? [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:544–7.