

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

PRISCILA MAYRELLE DA SILVA CASTANHA

**ANTICORPOS ANTIDENGUE SOROTIPO  
ESPECÍFICO EM UM ESTUDO DE BASE  
POPULACIONAL REALIZADO EM RECIFE,  
PERNAMBUCO.**

RECIFE  
2011

**PRISCILA MAYRELLE DA SILVA CASTANHA**

**ANTICORPOS ANTIDENGUE SOROTIPO ESPECÍFICO EM UM ESTUDO DE  
BASE POPULACIONAL REALIZADO EM RECIFE, PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Maria Cynthia Braga

Co-orientador: Dra. Marli Tenório Cordeiro

Recife

2011

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

C346a Castanha, Priscila Mayrelle da Silva.

Anticorpos antidengue sorotipo específico em um estudo de base populacional realizado em Recife, Pernambuco / Priscila Mayrelle da Silva Castanha. — Recife: P. M. S. Castanha, 2011.

73 f.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientadora: Maria Cynthia Braga; co-orientadora: Marli Tenório Cordeiro.

1. Dengue. 2. Imunidade. 3. Anticorpos Neutralizantes. I. Braga, M. C. II. Cordeiro, Marli Tenório. III. Título.

---

CDU 616.92

**PRISCILA MAYRELLE DA SILVA CASTANHA**

**ANTICORPOS ANTIDENGUE SOROTIPO ESPECÍFICO EM UM ESTUDO DE  
BASE POPULACIONAL REALIZADO EM RECIFE, PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Cynthia Braga

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dra. Celina Maria Turchi Martelli

Universidade Federal de Goiás

---

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

*Dedico este trabalho a Deus, amigos e familiares.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus que permitiu mais uma vitória em minha vida.

*A Ele seja dada toda honra e toda a glória.*

Aos meus pais, Arlete e Carlos, pela atenção, carinho e incentivo.

Ao meu namorado e amigo Mauricio Torres, pela paciência, amor e incentivo.

À minha orientadora, Dra. Cynthia Braga, pelo apoio, confiança e empenho.

À minha co-orientadora, Dra. Marli Tenório, pelo aprendizado, confiança e atenção.

À equipe do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, em especial a Geórgia Guimarães, Amanda Oliveira, Verônica Gomes e Clintiano Curvelo, por terem sido sempre solícitos.

Ao meu querido amigo e parceiro Leandro Wanderley, pelo carinho, atenção, amizade e por ter sido sempre solícito.

Aos meus queridos amigos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, em especial Almerice Lopes, Eduardo Brandão, Paula Oliveira, Paula Fernanda, Maria José, Socorro, pelos momentos de alegria e descontração dedicados.

As minhas queridas amigas Mirella Moraes, Gabriella Vilella, Carolina Nunes e Danielle Oliveira pela amizade, carinho e incentivo.

Aos pesquisadores Fábio Lopes, Zulma Medeiros, Paulo Sérgio, Wayner Souza, George Diniz e Celina Martelli pelo apoio e atenção.

Ao Mestrado Acadêmico do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela oportunidade de aprendizado.

À equipe da secretaria acadêmica do curso, em especial a Viviane, por terem sido sempre solícitas.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima”.*

Louis Pasteur

CASTANHA, Priscila Mayrelle da Silva. Anticorpos antidengue sorotipo específico em um estudo de base populacional realizado em Recife, Pernambuco. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

## RESUMO

Dengue é considerada a mais importante arbovirose, constituindo um grave problema de saúde pública no mundo. A doença é causada por um *Flavivirus* com quatro sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4) antigenicamente similares, mas imunologicamente distintos. A circulação simultânea desses sorotipos é apontada como um importante fator de risco para determinação dos casos graves da doença, pois aumenta a probabilidade de ocorrência de infecções secundárias e o surgimento de genótipos mais virulentos. Inquérito sorológico de base populacional conduzido na cidade do Recife, Pernambuco, entre 2005-2006, em 2.833 indivíduos com idades entre 05 e 64 anos, residentes em três áreas com condições sócio-econômicas distintas encontrou prevalência global superior a 80%, indicando elevada transmissão da infecção no município. Esse estudo investigou a imunidade antidengue sorotipo específica em uma amostra aleatória de 324 participantes com sorologia positiva (IgG) de uma das áreas investigadas. Além disso, estimou-se a proporção de susceptíveis aos diferentes sorotipos na população, com base na extrapolação dos resultados da amostra. O teste de neutralização por redução do número de placas (PRNT) foi utilizado na sorotipagem. A frequência de infecções monotípicas e multítípicas foram analisadas de acordo com grupo etário, sexo, dengue auto-referida e busca por atendimento. Observou-se elevada proporção de indivíduos imunes ao DENV-3 (35,6%; IC: 86,7-96,6) e de infecções multítípicas (61,6%), não tendo sido observado diferenças entre os grupos etários ( $p=0,395$ ). Houve maior proporção de susceptíveis aos sorotipos DENV-1 (<15 anos=59,5%;  $\geq 15=48,2\%$ ) e DENV-2 (<15 anos=76,9%;  $\geq 15=68,4\%$ ). A baixa circulação do DENV-3 e a recente recirculação dos sorotipos DENV-1 e 2 no município deve-se possivelmente à elevada proporção de imunes ao DENV-3. O elevado percentual de imunes a mais de um sorotipo, inclusive na população infanto-juvenil, indica à elevada intensidade e o potencial de transmissão desses vírus na área estudada e alerta para a necessidade de instituição de medidas mais efetivas de controle vetorial e de vigilância epidemiológica.

**Palavras chaves:** dengue, imunidade, anticorpos neutralizantes.



CASTANHA, Priscila Mayrelle da Silva. Antidengue serotype specific antibodies in a population-based study conducted in Recife, Pernambuco. 2011. Dissertation (Master's Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

## ABSTRACT

Dengue is the most important arthropod-borne viral disease and it is a serious public health problem. The disease is caused by a *Flavivirus* with four serotypes (DENV-1, 2, 3 and 4) antigenically similar but immunologically distinct. The simultaneous circulation of these serotypes is identified as an important risk factor for determination of severe disease. A population-based household survey was performed in three noncontiguous areas of Recife, between 2005-2006, in 2.833 subjects (5-64 years) and found an overall prevalence of over 80%, suggesting high transmission of the virus in the city. This study investigated the immune anti-dengue serotype-specific in a random sample of 324 participants with positive serology (IgG) from one of the areas investigated. Furthermore, we estimated the proportion of susceptible to different serotypes in the population, based on the extrapolation of sample results. The Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) was used for serotyping. The frequency of monotypic and multitypic was analyzed according to age group, sex, self-reported dengue and seeking care. There was a high proportion of individuals immune to DENV-3 (35.6%; CI: 86.7-96.6) and multitypic infections (61.6%), no differences were observed between age groups ( $p=0.395$ ). There were more susceptible to serotypes DENV-1 (<15 years = 59.5%,  $\geq 15 = 48.2\%$ ) and DENV-2 (<15 years = 76.9%,  $\geq 15 = 68.4\%$ ). The low circulation of DENV-3 and the recent re-circulation of serotypes DENV-1 and 2 in the city are possibly due to the high proportion of immune to DENV-3. The high percentage of immune from more than one serotype indicates the high intensity and potential transmission of these viruses in the population, including the juvenile, and alert to the need to institute more effective measures for vector control and epidemiological surveillance.

**Key words:** dengue, immunity, neutralizing antibodies.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Países e áreas de risco de transmissão da dengue, 2008.....	14
Figura 2-	Esquema da estrutura de um vírus dengue.....	15
Figura 3-	Período de viremia e resposta de anticorpos dos indivíduos infectados pelo vírus dengue.....	20
Figura 4-	Localização geográfica da área selecionada para o estudo.....	30
Gráfico 1-	Perfil de anticorpos antidengue sorotipo específico segundo grupo etário, Bairro do Engenho do Meio, Recife. 2005.....	42
Gráfico 2-	Título de anticorpos neutralizantes (log10) antidengue sorotipo específico no soro de indivíduos com resposta multítípica para os três sorotipos virais (n=12). Bairro do Engenho do Meio, Recife. 2005.....	45
Gráfico 3-	Proporção estimada de vulneráveis à infecção pelos sorotipos de vírus dengue circulantes (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) segundo grupo etário na área de estudo. Bairro de Engenho do Meio, Recife, 2005.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características demográficas e clínicas da amostra de estudo. Engenho do Meio, Recife. 2005.....	41
Tabela 2-	Perfil de anticorpos antidengue sorotipo específico segundo grupo etário. Bairro do Engenho do Meio, Recife. 2005.....	42
Tabela 3-	Padrão de imunidade sorotipo específico segundo características demográficas e clínica. Engenho do Meio, Recife. 2005.....	44
Tabela 4-	População, positivos examinados e proporção estimada de vulneráveis à infecção pelos sorotipos de vírus dengue circulantes (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) com base na extrapolação das amostras do inquérito sorológico de dengue. Bairro de Engenho do Meio, Recife, 2005.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ELISA	Ensaio imunoenzimático
FA	Febre amarela
FHD	Febre hemorrágica da dengue
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LaViTE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
MEM	Minimal Essential Medium
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PRNT	Teste de neutralização por redução do número de placas
RNA	Ácido ribonucléico
SCD	Síndrome do choque da dengue
SFB	Soro fetal bovino
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<i>Objetivo Geral.....</i>	<i>28</i>
<b>3.2</b>	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>28</i>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<i>Caracterização da área de estudo e população de estudo.....</i>	<i>30</i>
<b>4.2</b>	<i>Cálculo da amostra.....</i>	<i>32</i>
<b>4.3</b>	<i>Procedimentos laboratoriais.....</i>	<i>32</i>
<b>4.3.1</b>	<i>Manutenção da Cultura Celular.....</i>	<i>32</i>
<b>4.3.2</b>	<i>Preparação dos Estoques dos Vírus: DENV-1, 2 e 3.....</i>	<i>33</i>
<b>4.3.3</b>	<i>Neutralização por redução do número de placas (PRNT).....</i>	<i>34</i>
<b>4.3.4</b>	<i>Crítérios de positividade e determinação dos títulos de anticorpos.....</i>	<i>34</i>
<b>4.3.5</b>	<i>Validação dos resultados.....</i>	<i>35</i>
<b>4.4</b>	<i>Definição e categorização das variáveis.....</i>	<i>36</i>
<b>4.5</b>	<i>Tratamento e análise dos dados.....</i>	<i>37</i>
<b>4.6</b>	<i>Limitações Metodológicas.....</i>	<i>37</i>
<b>4.7</b>	<i>Considerações éticas.....</i>	<i>38</i>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<i>Características da população de estudo.....</i>	<i>40</i>
<b>5.2</b>	<i>Perfil de anticorpos antidengue sorotipo específico.....</i>	<i>41</i>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>APÊNDICE A – Questionário padronizado do inquérito.....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em pesquisa.....</b>	<b>72</b>

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é considerada a mais importante arbovirose em termos de morbidade e mortalidade em todo o mundo e tem demandado progressivos esforços e investimentos por parte dos países endêmicos (GUZMÁN et al., 2010). Estima-se que, aproximadamente 03 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco de transmissão do vírus no mundo, e que ocorram anualmente cerca de 50 a 100 milhões de casos em mais de 100 países nos continentes Africano, Américas, Sudeste Asiático e na região do Pacífico (GUZMAN et al. 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009) (Figura 1).



Figura 1 - Países e áreas de risco de transmissão da dengue, 2008.

FONTE: Organização Mundial de Saúde (2009)

NOTA: Adaptado e traduzido pela autora.

Nas Américas, cerca de cinco milhões de casos foram notificados, entre os anos de 2001 e 2007, havendo registros da circulação dos quatro sorotipos do vírus em diversos países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). O Brasil concentra mais de 70% dos casos de dengue registrados no continente e cerca de 60% dos casos registrados mundialmente

(TEIXEIRA et al., 2009). No país, dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) atestam a ocorrência de mais de 900.000 casos suspeitos da doença de janeiro a junho de 2010, dos quais cerca de 50% foram confirmados. A taxa de incidência no período foi de 412 / 100.000 habitantes, tendo-se constatado um incremento de 31% da frequência de casos graves (FHD/SCD) e de 67,6% de óbitos pela doença, em relação ao mesmo período do ano anterior (BRASIL, 2010a).

A dengue é causada por quatro sorotipos de vírus (DENV-1, 2, 3 e 4) antigenicamente similares, mas imunologicamente distintos, pertencentes à família *Flaviviridae*, e é transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, usualmente o *Aedes aegypti* (GUBLER, 2002). O DENV possui um envelope lipoprotéico e um genoma constituído por ácido ribonucléico (RNA) de fita única, não-segmentada e de polaridade positiva, que codifica três proteínas estruturais (capsídeo - C, pré-membrana/membrana - prM/M e envelope - E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (ROSS, 2010) (Figura 2).

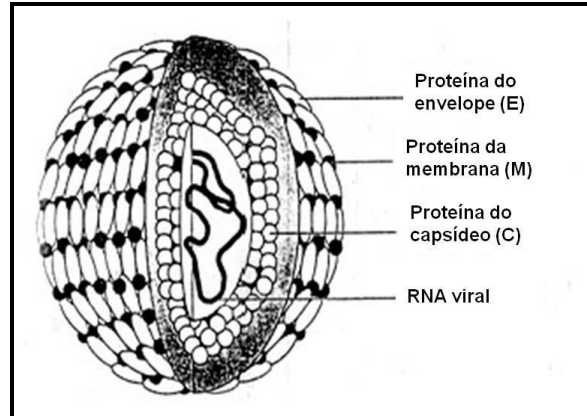


Figura 2 - Esquema da estrutura de um vírus dengue.

Fonte: Acosta-Bas; Gomez-Cordero (2005).

Nota: Adaptado e traduzido pela autora

Após a inoculação do vírus no organismo humano, pela picada de um mosquito infectado, ocorre o período de incubação, que dura em média de 4 a 7 dias. Nesse período, novas partículas virais são replicadas no citoplasma das células infectadas e o indivíduo ainda não apresenta sinais e sintomas da doença. O término do período de incubação coincide com o surgimento das manifestações clínicas da doença e com o início da fase virêmica, na qual as partículas virais ou



seus componentes (RNA ou antígenos) são detectados na corrente sanguínea e podem ser transmitidos, durante o repasto sanguíneo, aos mosquitos vetores (KAO et al., 2005; PEELING et al., 2010).

A resposta imune humoral se desenvolve aproximadamente 06 dias após a inoculação do vírus, com a produção de anticorpos neutralizantes específicos que possuem como principal alvo as proteínas do envelope viral (KAO et al., 2005; PEELING et al., 2010). A infecção pelo vírus dengue induz imunidade protetora de longa duração para sorotipos homólogos, mas de curta proteção para sorotipos heterólogos (KOH et al., 2008; WILDER-SMITH et al., 2005). O espectro clínico da infecção é bastante amplo, podendo se apresentar principalmente por infecção assintomática ou febre indiferenciada, e mais raramente pelas formas graves, como a febre hemorrágica da dengue (FHD) ou a síndrome do choque da dengue (SCD) (HALSTEAD, 2007).

No Brasil, os primeiros casos de dengue confirmados laboratorialmente ocorreram em 1981, na cidade de Boa Vista, Roraima, região Norte do País, quando os sorotipos DENV-1 e DENV-4 foram isolados (OSANAI et al., 1983). Em 1986, o sorotipo DENV-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, e foi responsável por graves epidemias da doença em todo país (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; ROSA, 1986). Condições ambientais propícias à proliferação do vetor e à circulação do vírus contribuíram para a introdução do sorotipo DENV-2, inicialmente identificado no estado do Rio de Janeiro em 1990, período no qual foram registrados os primeiros casos de FHD no país (NOGUEIRA et al., 1993).

Em 2001, o sorotipo DENV-3 foi isolado pela primeira vez no Rio de Janeiro e, após, um período de co-circulação com os sorotipos DENV-1 e DENV-2, causou uma grave epidemia no estado (MIAGOSTOVICH et al., 2006). Diferente dos demais sorotipos, o sorotipo DENV-3 se expandiu rapidamente, causando graves epidemias em diversos estados brasileiros (CORDEIRO et al, 2007a; MELO, et al, 2007; MONTENEGRO et al, 2006; TEIXEIRA et al, 2009). Após, dois anos da circulação viral do DENV-3, a infecção por este sorotipo havia se expandido para 22 dos 27 estados da Federação e para quase 3.000 municípios (TEIXEIRA et al., 2005). No país, atualmente circulam três sorotipos - o DENV-1, 2 e 3, havendo registros de casos isolados de infecções pelo DENV-4 em Roraima, Manaus e Belém (BRASIL, 2010b, 2011a, 2011b).

Entre os anos de 2007 e 2009, após mais de cinco anos de predomínio da circulação do DENV-3 no Brasil, constatou-se a sua substituição pelo DENV-2, que passou a ser o sorotipo mais frequentemente isolado. Essa mudança coincidiu com o aumento da incidência das formas

graves da doença, particularmente na população infanto-juvenil, e com o aumento da demanda por internações hospitalares nesse grupo populacional (BRASIL, 2010a). Até 2006, a maioria dos casos de dengue e FHD registrados no país eram na população adulta (TEIXEIRA et al., 2009). Ao longo do ano de 2009, dados do Ministério da Saúde (MS) atestam ter havido uma nova mudança no sorotipo predominante com recirculação e predomínio das infecções pelo sorotipo DENV-1. Esse fato foi apontado como um dos fatores responsáveis pelo aumento do número de casos de dengue no ano de 2010, em virtude do elevado número de indivíduos susceptíveis a esse sorotipo devido à baixa circulação desse vírus na última década (BRASIL, 2010a).

A co-circulação dos diferentes sorotipos do vírus aumenta a probabilidade de emergência de linhagens e genótipos com maior potencial epidêmico e/ou virulência, além da ocorrência de infecções secundárias na população que constitui, segundo a teoria de infecções seqüenciais, um dos fatores de risco para a ocorrência das formas graves da doença (GUBLER, 2002; GUZMÁN, 2004; ROSS, 2010; WILDER-SMITH et al., 2005). Segundo essa teoria, a presença de anticorpos heterólogos pré-existentes, na vigência de uma nova infecção por um sorotipo distinto, desencadeia o fenômeno denominado imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos pré-existentes ou ADE (*antibody dependent enhancement*). Nesse fenômeno, os anticorpos não-neutralizantes originados da infecção primária se unem ao vírus da infecção secundária, facilitando a entrada do vírus nos monócitos, via células com receptores específicos para a porção Fc dos anticorpos. Esse mecanismo aumentaria o número de células infectadas, estimularia a liberação de citocinas e mediadores químicos pelos linfócitos, levando a danos, alterações do sistema vascular, hemorragia e choque (HALSTEAD, 2003).

Essa teoria tem sido confirmada por estudos de base hospitalar e populacional (ENDY et al, 2002; THOMAS et al, 2008; VALDES et al., 1999) que têm observado o aumento do risco de desenvolvimento de FHD/SCD em populações expostas a infecções por mais de um sorotipo do vírus. No sudeste asiático, onde circulam os quatro sorotipos, estudos mostram que a infecção secundária por diferentes sorotipos foi o fator mais freqüentemente associado aos casos graves da doença (CORWIN et al, 2001; ENDY et al, 2002; NISALAK et al, 2003; SUWANDONO et al, 2006; VAUGHN et al, 2000). Na Indonésia, um estudo conduzido em hospitais de Jakarta durante um surto de dengue ocorrido em 2004, no qual houve co-circulação dos quatro sorotipos do vírus, mostrou que a infecção por DENV-3 esteve associada à ocorrência de casos de febre hemorrágica da dengue. Nesse estudo foi igualmente observada uma clara associação entre a

gravidade das manifestações clínicas da doença e a presença de infecção secundária (SUWANDONO et al, 2006).

No continente americano, os quatro sorotipos do vírus têm sido responsáveis por graves epidemias com ocorrência de elevado número de casos graves e fatais (PINHEIRO; CHUIT, 1998). Em Cuba durante a epidemia de dengue hemorrágico em 1997, constatou-se que os principais fatores de risco para o desenvolvimento de FHD/SCD foram às infecções secundárias e que o risco aumentou em quinze vezes quando a infecção secundária era causada pelo sorotipo DENV-2 (VALDES et al., 1999). Resultados semelhantes foram encontrados durante uma epidemia de dengue na Ilha de Martinicana, no Caribe, onde houve co-circulação dos sorotipos DENV-2 e 4 (THOMAS et al, 2008).

Todavia, contrariando a teoria da imunoamplificação, outros estudos realizados em diferentes regiões do mundo têm observado elevada ocorrência de dengue hemorrágica entre casos de infecção primária pelo vírus dengue, sugerindo que, outros fatores possivelmente estão envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença. Na Nicarágua, durante a epidemia de 1998, o sorotipo predominante foi o DENV-3 e a maioria dos casos de FHD/SCD ocorreu em infecções primárias (HALSTEAD et al., 2001). No Brasil, resultados semelhantes foram observados no estado do Rio de Janeiro durante a epidemia de 2002, onde se constatou que a maior parte dos casos de óbitos por dengue foi decorrente de infecções primárias pelo sorotipo DENV-3 (NOGUEIRA et al., 2005). No Recife, região Nordeste do país, estudos prospectivos de base hospitalar encontraram maior frequência de infecções primárias entre os casos de adultos com FHD (BRITO, 2007; CORDEIRO et al, 2007b).

A virulência viral também tem sido apontada como um dos fatores relacionados ao aumento da intensidade da transmissão e maior gravidade da doença (MATHEW; ROTHMAN, 2008). Segundo Rico-Hesse (2010), a ocorrência dos casos de FHD em infecções primárias pode possivelmente estar relacionada à virulência do sorotipo infectante. Admite-se que variações genéticas do vírus determinam maior virulência e, conseqüentemente, um maior potencial epidêmico (GUBLER, 1998). Estudos filogenéticos e epidemiológicos têm mostrado que os genótipos americanos de DENV-2 e DENV-3 são menos virulentos que os genótipos de origem asiática de DENV-2 e DENV-3 (RICO-HESSE, 2003; WILDER-SMITH et al., 2005). Nas Américas, o genótipo Americano de DENV-2 esteve associado principalmente aos casos de febre

da dengue, enquanto que a ocorrência dos primeiros casos de FHD coincide com a introdução do genótipo asiático do sorotipo DENV-2 no continente, o que corrobora essa hipótese (RICO-HESSE et al., 2003).

O perfil de resistência ou de susceptibilidade imunológica da população constitui outro elemento que interfere e modula a intensidade da circulação viral e a ocorrência de epidemias na população (KUNO, 1995). Diversos estudos têm mostrado que a intensidade da circulação viral está fortemente associada com a densidade populacional e disponibilidade de indivíduos susceptíveis aos diferentes sorotipos do vírus na população (ENDY et al., 2002; MELO et al., 2007; OCAZIONEZ et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2003).

Estudo desenvolvido em Singapura mostrou que a alternância do sorotipo predominante DENV-2 para o DENV-1 na população, aliado ao elevado percentual de indivíduos vulneráveis a esse novo sorotipo circulante foi um dos fatores que contribuiu para o reaparecimento de casos da doença no país (KOH et al, 2008). Endy e colaboradores (2002), ao analisarem a dinâmica espacial e temporal dos sorotipos do vírus dengue em escolares na Tailândia, em um estudo prospectivo, observaram que a ocorrência de infecção por cada sorotipo viral variou marcadamente no espaço e no tempo, apesar da proximidade entre as escolas estudadas. Os autores concluíram que a presença de imunidade sorotipo específica possivelmente dificultou a reintrodução do mesmo sorotipo que causou os surtos da doença em anos anteriores (ENDY et al., 2002).

No Brasil, dados de um estudo realizado em Goiânia, estado de Goiás, com base em dois inquéritos de base populacional realizados em anos consecutivos (2001 e 2002), corroboram essa hipótese. O estudo mostrou variações na distribuição espacial da prevalência entre os inquéritos, sugerindo que o status imunológico da população residente nas áreas onde havia um elevado percentual de susceptíveis à infecção pode ter contribuído para as mudanças na localização das áreas de risco entre os dois períodos dos levantamentos (SIQUEIRA et al, 2008).

O amplo espectro de apresentações clínicas da infecção pelos vírus dengue dificulta a sua diferenciação de outros agravos, como malária, leptospirose e infecções por outros *Flavivirus* (PEELING et al., 2010). Dessa forma, o diagnóstico laboratorial da infecção constitui uma importante ferramenta de auxílio à confirmação dos casos (GUZMÁN, 2010). O diagnóstico da infecção pelo vírus dengue tem sido feito a partir da utilização de diferentes métodos, como o isolamento dos vírus, a detecção do RNA ou de antígenos virais, ou pela detecção de anticorpos

específicos, sendo a escolha do método diagnóstico mais adequado definida de acordo com o estágio evolutivo da doença (DE PAULA; FONSECA, 2004; GUZMAN; KOURI, 2004; ROSS, 2010).

A produção de anticorpos antidengue é usualmente distinta entre aqueles que apresentaram infecções primárias e secundárias (DUTRA et al., 2010). Na infecção primária, a imunoglobulina M (IgM) é usualmente detectada cinco ou mais dias após o início dos sintomas, enquanto que a imunoglobulina G (IgG) é detectada em baixos níveis cerca de 10 a 15 dias após o início da infecção. Ao contrário, na infecção secundária, os anticorpos IgG são detectados em níveis elevados na fase aguda, enquanto que os anticorpos IgM são usualmente detectados em títulos mais baixos do que os observados nas infecções primárias (DUTRA et al., 2010; PEELING et al., 2010) (Figura 3).

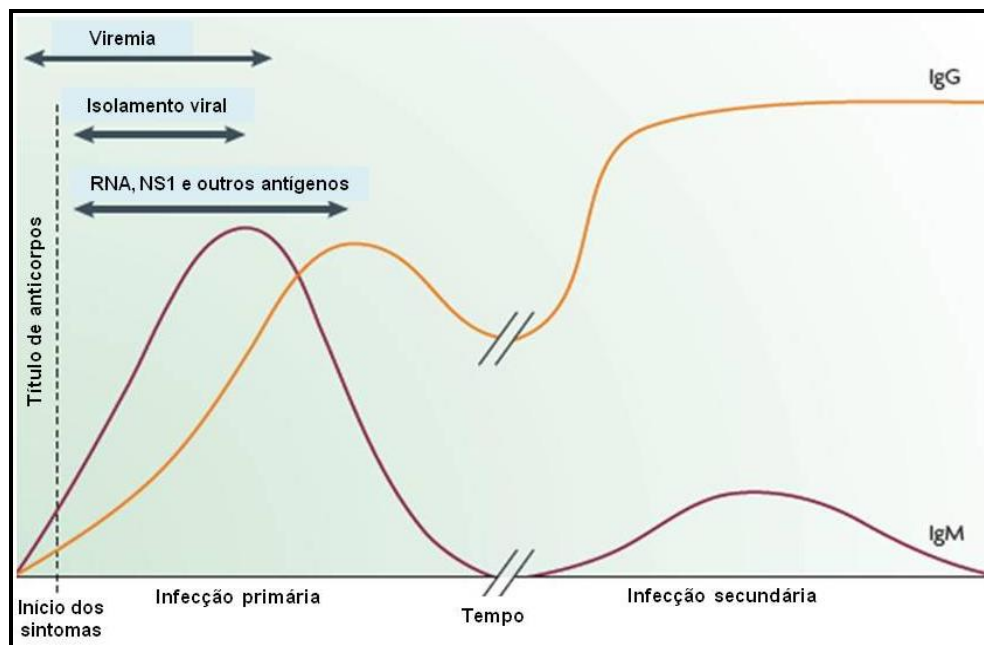


Figura 3 – Período de viremia e resposta de anticorpos dos indivíduos infectados pelo vírus dengue. A resposta de IgM e IgG é variável se a infecção é primária ou secundária.

Fonte: Peeling et al. (2010).

Nota: Adaptado e traduzido pela autora

O baixo custo e facilidade de execução dos testes sorológicos, quando comparado às técnicas de isolamento viral ou métodos baseados na detecção de ácido nucléico, fazem com que

a detecção de anticorpos seja a ferramenta mais comumente utilizada no diagnóstico da dengue (DUTRA et al., 2010; GUZMÁN, 2010). Os principais testes sorológicos são baseados na dosagem de anticorpos das classes IgM e IgG mediante a utilização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). A maior parte desses ensaios está disponível na forma de kits comerciais, o que permite que um grande número de amostras possa ser testado simultaneamente. Entretanto, apesar da alta sensibilidade e facilidade de uso dos testes pela técnica de ELISA, esse método não é capaz de diferenciar os sorotipos virais (DUTRA et al., 2010; GUZMAN; KOURI, 2004; TELES; PRAZERES; LIMA-FILHO, 2005).

O teste de neutralização por redução do número de placas (PRNT) é o método atualmente considerado “padrão ouro” para a determinação da imunidade sorotipo específica aos vírus dengue, embora novas técnicas para mensurar anticorpos neutralizantes estejam atualmente em desenvolvimento (ROEHRING; HOMBACH; BARRETT, 2008). A técnica, considerada o teste sorológico vírus-específico para os diferentes sorotipos do vírus dengue e outros *Flavivirus*, foi originalmente desenvolvida por Russel e Nisalak na década de 60 (RUSSELL; NISALAK, 1967) e tem sido recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na determinação de anticorpos neutralizantes específico para os vírus dengue. (JOHNSON et al, 2009; PANHUIS et al., 2010; ROEHRING; HOMBACH; BARRETT, 2008).

Nesse sistema, a amostra de soro ou plasma do indivíduo é misturada a uma solução contendo partículas virais. Essa mistura é inoculada em uma monocamada de células susceptíveis (originadas de mamíferos ou de mosquitos). Os vírus são capazes de infectar as células susceptíveis produzindo uma área localizada de infecção, chamada de placa, que pode ser detectada após coloração. No entanto, a interação do vírus com anticorpos neutralizantes específicos presentes no soro resulta na formação de complexos antígeno-anticorpo, que inativa a partícula viral, tornando-a incapaz de infectar as células susceptíveis. Assim, ao se testar as amostras sorológicas, as placas formadas são contadas e comparadas com o número de placas encontradas em culturas inoculadas com o vírus sozinho. A atividade neutralizante do soro é determinada pela sua capacidade em reduzir o maior número de placas virais. A positividade da amostra é determinada por uma redução de 50% ou mais na contagem de placas na série de diluições de soro utilizada (PUTNAK et al, 2008; ROEHRING; HOMBACH; BARRETT, 2008; SHU et al., 2002).

O teste PRNT tem sido amplamente utilizado em estudos que avaliam o poder imunogênico de vacinas contra dengue atualmente em desenvolvimento (BECKETT, et al., 2010; SIMASATHIEN, et al., 2008), em pesquisas acadêmicas (CUNHA et al, 2008; ENDY et al., 2002) e estudos de patogênese da doença (RODRIGO et al., 2009; WAHALA et al., 2009). A necessidade de laboratórios bem equipados, com capacidade para a manipulação de cultura de células e vírus, o tempo requerido para execução do teste (~ 7 dias) e de uma equipe de laboratório com expertise para a realização dessa técnica são algumas das limitações que dificultam a realização do PRNT em larga escala em ensaios clínicos de vacinas e particularmente em estudos epidemiológicos (JOHNSON et al, 2009; PUTNAK et al, 2008). Além disso, nas infecções seqüenciais por diferentes sorotipos do vírus, a maior parte dos anticorpos neutralizantes produzidos é específica ao sorotipo que causou a infecção primária, dificultando a interpretação dos resultados do PRNT em infecções secundárias (SHU et al., 2002).

As variações na execução e a falta de padronização da técnica, que permite a utilização de uma ampla variedade de linhagens de células, vírus e meios de cultivo celular, constituem outra limitação de pode gerar diferentes resultados e dificultar a comparação de dados entre laboratórios e instituições (THOMAS et al., 2009). Para contornar esse problema, a OMS recentemente publicou um guia com recomendações para o desenvolvimento do teste (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

Estudos epidemiológicos de base populacional que determinem o perfil de anticorpos neutralizantes sorotipo específico ainda são escassos no Brasil (CUNHA et al, 2008) e no mundo (SÁNCHEZ-BURGOS et al, 2008) e podem ser úteis para a compreensão da dinâmica e da força de transmissão dos diferentes sorotipos do vírus na população, além de auxiliar na predição de futuras epidemias.

No Brasil, embora se tenha conhecimento sobre os sorotipos circulantes, os dados disponíveis são oriundos das ações da vigilância ativa (SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2002) e, portanto, restritos aos casos sintomáticos que procuram os serviços de saúde, pouco se sabendo sobre a dinâmica de circulação dos diferentes sorotipos na comunidade e o perfil da imunidade sorotipo específica da população após mais de 20 anos de re-emergência da doença. Ressalta-se ainda que, a maior parte dos estudos sobre a circulação dos sorotipos da dengue é de

base clínica-hospitalar (BRITO, 2007; GUILARDE et al, 2008) e clínico-epidemiológicos (CORDEIRO et al ,2007b; VASCONCELOS et al., 1998).

No estado de Pernambuco, e particularmente na cidade do Recife, os primeiros registros de dengue ocorreram em 1987, pelo sorotipo DENV-1, que ocasionou a primeira epidemia na cidade. Em janeiro de 1995, após quase sete anos sem novos registros da doença, a introdução do sorotipo 2 deu origem a uma segunda epidemia (CORDEIRO et al, 2007a). Em 2002, o vírus DENV-3 foi introduzido na cidade e causou a maior e mais grave epidemia, com mais de 35.000 casos registrados (CORDEIRO et al, 2007a; MONTENEGRO et al, 2006). Dados recentes da Secretaria Municipal de Saúde mostram que, no ano de 2010, cerca de 15.000 casos de dengue foram registrados, dos quais mais de 9.000 foram confirmados laboratorialmente na cidade, com registros de circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde, 2011).

Entre 2005 e 2006, um inquérito sorológico de base populacional para infecção pelo vírus dengue foi realizado em três áreas não contíguas com condições sócio-econômicas baixa, intermediária e alta dessa cidade, e obteve uma prevalência global de soropositivos de 85,4%, sugerindo elevados níveis de transmissão da infecção (BRAGA et al, 2010). Essa pesquisa pretende analisar o perfil imune de anticorpos neutralizantes antidengue sorotipo específico entre os indivíduos soropositivos identificados no bairro de Engenho do Meio, uma área com condições sócio-econômicas intermediárias em relação às duas outras áreas investigadas.



*Justificativa*

## 2 JUSTIFICATIVA

A dengue é considerada a mais importante arbovirose, constituindo um grave problema de saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A infecção pelo vírus dengue determina imunidade protetora de longa duração para sorotipos homólogos, mas de curta proteção para sorotipos heterólogos (KOH et al, 2008; WILDER-SMITH et al, 2005). O espectro clínico da infecção é bastante amplo, variando desde infecções inaparentes ou febre indiferenciada, as quais representam a maioria dos casos e mais raramente pelas formas graves, como a dengue hemorrágica ou a síndrome do choque da dengue (HALSTEAD, 2007). A circulação simultânea dos diferentes sorotipos do vírus é apontada como um importante fator de risco para determinação dos casos graves da doença, pois aumenta a probabilidade de ocorrência de infecções secundárias na população e o surgimento de genótipos com um maior potencial epidêmico.

A determinação do perfil imune sorotipo específico em uma população, permite caracterizar o padrão e a intensidade de transmissão desses sorotipos e identificar grupos vulneráveis à infecção a determinados sorotipos do vírus, bem como fornecer informações importantes sobre a dinâmica de circulação do vírus dengue na população e compreender a intensidade de transmissão da doença em determinados grupos populacionais. Essas informações podem servir de base para o desenvolvimento de estratégias de vigilância a doença e definição de meios mais efetivos para prevenir epidemias.

O Brasil tem registrado a circulação simultânea dos sorotipos DENV-1, 2 e 3, fator possivelmente envolvido na elevação da incidência de casos graves e fatais (TEIXEIRA et al, 2005). Um inquérito sorológico de base populacional realizado em Minas Gerais, que utilizou o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) para identificação dos sorotipos, mostrou que a maior parte dos soropositivos possuía marcadores de exposição prévia para infecção pelos sorotipos 1 e 2 (CUNHA et al, 2008). Entretanto, vale ressaltar que este estudo foi conduzido no ano de 2000, antes da introdução do sorotipo DENV-3 no país.

O PRNT é considerado o “padrão ouro” na detecção de anticorpos específicos para o vírus dengue, assim como na identificação dos sorotipos de infecções prévias por esse vírus em inquéritos epidemiológicos. Entretanto, por se tratar de uma técnica laboriosa, que requer tempo

para ser executada e pessoal técnico capacitado, torna-se difícil o seu emprego em estudos que testam um grande número de amostras. Devido a essa dificuldade, estudos populacionais que investigam a imunidade antidengue sorotipo específico em larga escala na população têm sido escassos (CUNHA et al, 2008; SÁNCHEZ-BURGOS et al, 2008). Conseqüentemente, as informações sobre a circulação do vírus disponíveis são oriundas de dados da vigilância epidemiológica ou do acompanhamento de pacientes internados com a doença, identificados por meio de isolamento do vírus e/ou detecção do genoma viral através da reação em cadeia da polimerase, havendo pouco conhecimento sobre o perfil de imunidade sorotipo-específico na população.

O Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, que possui equipe treinada e todos os equipamentos necessários para o cultivo e manejo de vírus, vem utilizando a técnica de PRNT de acordo com Morens e colaboradores (1985), com algumas modificações, em pesquisas desenvolvidas no serviço, obtendo resultados satisfatórios na identificação dos anticorpos para os sorotipos do vírus dengue.

Um estudo de base populacional realizado em uma amostra de aproximadamente 3.000 moradores de três áreas socioeconomicamente distintas da cidade do Recife (bairros de Brasília Teimosa, Engenho do Meio e Casa Forte/Parnamirim), entre 2005 e 2006, encontrou prevalências de soropositivos que variaram de 74% e 91% e uma associação inversa com o nível sócio-econômico da área (BRAGA et al, 2010). Nessa pesquisa, a presença de anticorpos contra o vírus dengue na população estudada foi confirmada pela detecção da imunoglobulina G (IgG) por ensaio imunoenzimático (ELISA) que não determina os sorotipos responsáveis pelas infecções passadas.

Considerando a importância de se identificar os sorotipos do dengue que infectaram esses indivíduos, a nossa pretensão foi ampliar essa pesquisa, estudando o perfil imune sorotipo específico em uma subamostra, aleatoriamente selecionada, dos indivíduos soropositivos identificados no bairro de Engenho do Meio, uma área com condições socioeconômicas intermediárias e níveis de soroprevalência de 87%.

*Objetivos*

### **3 OBJETIVOS**

#### ***3.1 Objetivo Geral***

Analisar o perfil epidemiológico de imunidade antidengue aos diferentes sorotipos do vírus na população residente no bairro de Engenho do Meio, na cidade do Recife, no ano de 2005.

#### ***3.2 Objetivos Específicos***

- a) Estimar a prevalência de anticorpos neutralizantes sorotipo específico na população segundo faixa etária e sexo;
- b) Descrever a frequência de infecções monotípicas e multítípicas e o percentual de susceptíveis aos diferentes sorotipos do vírus dengue na área de estudo;
- c) Investigar a relação entre a dengue auto-referida e o perfil imune sorotipo específico (quantidade de infecções, tipo de infecção, sorotipo viral) entre os soropositivos;
- d) Determinar os títulos de anticorpos neutralizantes sorotipo específico nos indivíduos com idade menor de 15 anos e imunidade aos três sorotipos virais.

*Materiais e métodos*

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da área e população de estudo

O presente estudo foi conduzido em uma amostra dos moradores do bairro de Engenho do Meio, zona oeste da cidade do Recife, Pernambuco, que participaram de um inquérito de base populacional de soroprevalência de dengue realizado em três áreas socioeconomicamente distintas do município, entre 2005 e 2006 (Figura 4). A seleção do bairro se deveu ao fato de possuir maior heterogeneidade quanto às características sócio-econômicas quando comparado às duas outras áreas investigadas (BRAGA et al, 2010).

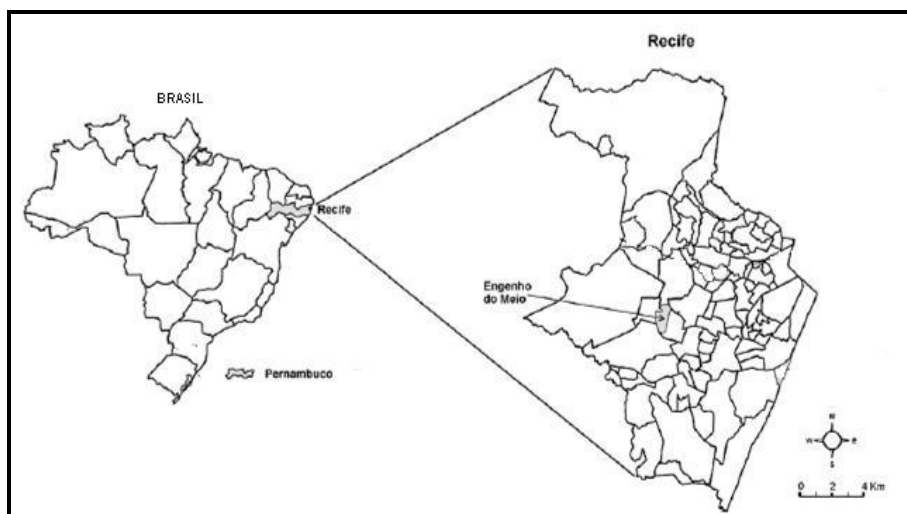


Figura 4 – Localização geográfica da área selecionada para o estudo.

FONTE: Braga et al. (2010).

NOTA: Traduzido e adaptado pela autora

A cidade do Recife, localizada na região Nordeste do Brasil, possui um perímetro de 219 Km<sup>2</sup>, dividido em 94 bairros e com uma população de 1.536.934 habitantes (IBGE, 2010). O

clima é tropical úmido, com temperatura média de 25°C e precipitação de cerca de 2.000 mm por ano (ITEP, 2009). Na cidade do Recife, os registros de ocorrência de dengue datam de 1987. Desde então, a cidade tem experimentado graves epidemias da doença, com registros de circulação dos sorotipos DENV-1, 2 e 3 (CORDEIRO et al., 2007a; MONTENEGRO et al., 2006). No ano de 2005, período no qual o inquérito epidemiológico de dengue foi conduzido no bairro de Engenho do Meio, foram notificados 4.796 casos de dengue na cidade do Recife (CORDEIRO et al., 2007a), dos quais apenas cerca de 500 foram confirmados laboratorialmente, com registros de circulação do sorotipo DENV-3.

O bairro do Engenho do Meio possui um perímetro de 4,58 km<sup>2</sup>, uma população residente de 10.560 habitantes e uma densidade demográfica de 2.306 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2000), sendo predominantemente composto por famílias de classe média cuja renda mensal do chefe da família é de cerca de cinco salários mínimos. Quase a totalidade dos domicílios é servida pela rede pública de abastecimento de água (99,7%) e por esgotamento sanitário (90,0%) RECIFE. (Prefeitura Municipal. 2005). Entre 2005 e 2010, mais de 80 casos de dengue foram confirmados laboratorialmente no bairro, não havendo informações sobre os sorotipos envolvidos (RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde, 2011).

A amostra populacional do inquérito de soroprevalência de dengue foi do tipo estratificada, segundo dois grupos etários (5-14 anos e 15-64 anos). O tamanho amostral em cada estrato foi calculado considerando como parâmetros uma soropositividade de 30%, na população < de 15 anos, e de 40%, na população ≥ 15 anos (SIQUEIRA et al., 2004); uma precisão de 5% e um intervalo de confiança (IC) de 95%. A seleção dos indivíduos foi realizada a partir da seleção sistemática dos domicílios, com base na informação do número médio de moradores e por estrato de idade (IBGE, 2000). A descrição do desenho amostral foi apresentada em artigo publicado por BRAGA e colaboradores (2010).

A coleta dos dados no bairro do Engenho do Meio foi realizada no período de agosto a setembro de 2005, tendo participado do inquérito 400 indivíduos na faixa etária de 05 a 14 anos e 523 na faixa etária entre 15 e 69 anos. Informações individuais e do domicílio foram obtidas, a partir da aplicação de questionários padronizados, e uma amostra de sangue venoso foi coletada para realização da dosagem de anticorpos IgG antidengue específicos (Dengue IgG-ELISA, PanBio, Ltd., Brisbane, Austrália), durante visita domiciliar. A prevalência de soropositividade



foi de 87,4%, níveis de endemicidade intermediários em relação às duas outras áreas estudadas (BRAGA et al, 2010). No presente estudo, estudou-se uma subamostra aleatória dos indivíduos soropositivos identificados no bairro.

#### ***4.2. Cálculo da amostra***

O tamanho da amostra foi calculado utilizando uma fórmula para cálculo de tamanho da amostra (SCHEAFFER; MENDENHALL; OTT, 1979) para a estimação de proporções em uma única amostra, admitindo um erro máximo de 5% e alfa de 5%, obtiveram-se um n de 323 indivíduos.

#### ***4.3 Procedimentos laboratoriais***

A determinação dos anticorpos antidengue específicos para cada um dos sorotipos do vírus circulantes foi realizada pela técnica de PRNT de acordo com a metodologia descrita por Morens e colaboradores (1985), com pequenas modificações, e seguindo também as recomendações da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007). O teste, bem como, a preparação de estoques de vírus e manutenção da cultura celular, etapas precedentes à execução do PRNT, foi desenvolvido no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

##### ***4.3.1 Manutenção da Cultura Celular***

Foram utilizadas células da linhagem Vero (Rim de macaco verde africano), propagadas em garrafas de cultivo de células (T175) a cada 5-6 dias, utilizando-se o meio de cultura MEM

(Minimal Essential Medium) (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) e antibióticos penicilina/estreptomicina a 1% (Invitrogen). As garrafas de células foram mantidas em estufa à 37°C, com atmosfera 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). As células Vero foram mantidas durante todo o experimento e utilizadas para o crescimento de vírus e preparação das placas para o teste de neutralização.

Para a preparação das placas, a contagem das células Vero foi efetuada em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante vital Trypan blue (SIGMA). Em seguida, suspensões de células Vero a uma densidade de 300.000 células/mL foram distribuídas em placas de 24 poços (NUNC), no volume de 0,5 mL por poço. As placas foram mantidas em estufa à 37°C, a uma atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 a 48 horas até a realização do teste PRNT.

#### ***4.3.2 Preparação dos Estoques dos Vírus: DENV-1, DENV-2 e DENV-3***

As amostras de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 pertencem à coleção de vírus do LaViTE e correspondem às amostras de vírus isolados nas epidemias ocorridas no estado de Pernambuco, doadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE). Os isolados utilizados foram: DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808) e DENV-3 (PE/02-95016).

Amostras de cada sorotipo foram inoculadas em células Vero, crescidas em garrafas T175, mantidas em meio MEM (GIBCO), suplementado com 2% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% penicilina/estreptomicina, e incubadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>, a uma multiplicidade de infecção (moi) de 0.1, por 5-6 dias a 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. As suspensões de células contendo os vírus foram submetidas ao congelamento e descongelamento e, em seguida, centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes contendo as partículas virais foram coletados e adicionado SFB na proporção de 20%, em seguida distribuídos em criotubos em alíquotas de 0,5 mL e estocadas à -80°C. Cada suspensão viral foi titulada por ensaio de placa, utilizando células da linhagem VERO, para determinar a diluição adequada para o teste devendo conter de 20 a 30 unidades formadoras de placa (UFP).

#### ***4.3.3 Neutralização por redução do número de placas (PRNT)***

Inicialmente, as amostras de soro dos indivíduos (20µl) foram inativadas por 30 minutos em banho-maria a 56°C, em seguida foi realizada a diluição do soro (1/20 e 1/80) em MEM utilizando-se microplacas de 96 poços (NUNC), no volume final de 100µl, sendo uma placa para cada sorotipo viral. Após a diluição, 100µl da suspensão viral de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, previamente titulados, com uma concentração de aproximadamente 30 UFP/mL foram adicionados nos locais correspondentes a cada um dos três sorotipos.

Após, incubação a 37°C, em 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub> por 1 hora, o meio das placas de 24 poços contendo as células Vero foi descartado e 50µL de cada diluição da mistura vírus-soro foi inoculado, em duplicata. As placas foram novamente incubadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora, para permitir a adsorção do vírus. Após, este período, as células foram cobertas com 500µL de meio semi-sólido: MEM 10X concentrado, 10% de SFB, 10% de carboximetilcelulose a 3%, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de Fungizon. Em seguida as placas foram incubadas por 6-7 dias, à 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, o meio semi-sólido foi descartado das placas de 24 poços e uma solução de formalina a 3,5M foi adicionada (2mL por poço, incubadas por 1 hora) para fixação das células e inativação das partículas virais. Após, descarte da formalina, as células foram coradas com solução (1:50) de cristal violeta (0,5mL/poço), lavadas em água corrente e, após, secagem as placas foram contadas manualmente.

#### ***4.3.4 Critérios de positividade e determinação dos títulos de anticorpos***

Amostras de soro que apresentaram redução de 50% ou mais no número de placas virais (PRNT<sub>50</sub>), em comparação com as amostras dos vírus inoculadas sozinho, foram consideradas positivas. Amostras que não apresentaram redução de, no mínimo, 50% das placas virais na menor diluição de soro utilizada (1:20) foram consideradas negativas.

O percentual de neutralização foi calculado utilizando a fórmula proposta por Vazquez e colaboradores (2003), apresentada a seguir:

$\% \text{Redução} = [1 - (P \text{ amostra} / P \text{ vírus controle})] \times 100$ , onde  $P$  significa contagem de placas.

Devido à complexidade da técnica, o título de anticorpos neutralizantes (maior diluição de soro que apresenta níveis de anticorpos neutralizantes sorotipo específico capazes de reduzir em 50% o número de placas virais) foi determinado apenas para os indivíduos com idade inferior a 15 anos que apresentaram imunidade aos três sorotipos virais. Essas amostras foram testadas nas diluições de soro 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280, seguindo o mesmo protocolo padronizado para a execução do PRNT. O título de anticorpos DENV sorotipo específico foi determinado pelo método de regressão Probit.

#### ***4.3.5 Validação dos resultados***

Para garantir a acurácia e diminuir as variações intra e inter teste, todos os procedimentos laboratoriais foram desenvolvidos pelo mesmo técnico. A técnica foi executada seguindo um protocolo padronizado e conduzida de maneira cega e independente, sem que o técnico tivesse conhecimento da caracterização sorológica prévia ou de informações como idade e sexo do indivíduo.

Controles positivos (vírus inoculado na ausência de soro) e negativos (soro de indivíduos sabidamente negativos) foram incubados para cada um dos vírus. Poços com células não-infectadas também foram utilizados como controle. Os critérios utilizados para validar o resultado do teste foram: integridade da monocamada de células não-infectadas, pouca ou nenhuma redução na contagem de placas dos soros negativos e apropriadas contagem de placas do controle positivo. Para melhor caracterização do perfil epidemiológico foram utilizadas cepas virais isoladas de epidemias ocorridas no Estado de Pernambuco.

Para avaliar a presença de reação cruzada com outros *Flavivirus*, as amostras de soro dos indivíduos com idade menor de 15 anos que obtiveram resultados positivos para os três sorotipos virais (DENV-1, 2 e 3) pelo PRNT (n=12) foram testadas para detecção da presença de anticorpos neutralizantes para o vírus da febre amarela (FA) (17DD). Nenhuma amostra testada apresentou níveis de anticorpos neutralizantes detectáveis para FA (títulos de anticorpos <1:20), sendo dessa forma consideradas negativas.

#### ***4.4 Definição e categorização das variáveis***

- a) **DENV-1:** presença de anticorpos neutralizantes (redução de, no mínimo, 50% das placas virais na diluição de soro 1:20) para o sorotipo DENV-1.
- b) **DENV-2:** presença de anticorpos neutralizantes (redução de, no mínimo, 50% das placas virais na diluição de soro 1:20) para o sorotipo DENV-2.
- c) **DENV-3:** presença de anticorpos neutralizantes (redução de, no mínimo, 50% das placas virais na diluição de soro 1:20) para o sorotipo DENV-3.
- d) **Idade:** categorizada em três grupos: 5 a 14, 15 a 49 e maiores de 50 anos.
- e) **Sexo:** masculino e feminino
- f) **Padrão de resposta imune:** categorizado em monotípicas (presença de anticorpos neutralizantes para um único sorotipo) e multítipicas (definida como a presença de anticorpos neutralizantes para mais de um sorotipo viral).
- g) **Susceptibilidade:** ausência de marcador sorológico para o sorotipo.
- h) **Dengue referida:** relato de dengue prévia no momento da entrevista.
- i) **Busca por atendimento:** definida como relato de procura por atendimento em serviços de saúde por aqueles que relataram ter contraído a doença em algum momento da vida. O relato

de busca por atendimento foi interpretado como proxy de gravidade de sinais e sintomas devido à dengue.

#### ***4.5 Tratamento e análise dos Dados***

A distribuição de frequência da imunidade aos diferentes sorotipos foi analisada de acordo com a idade, sexo, dengue auto-referida e busca a atendimento. As diferenças entre os grupos quanto à imunidade sorotipo específico foram verificadas pelo teste do qui - quadrado e o valor de  $p$  a um nível de significância de 5%. Os títulos de anticorpos neutralizantes (PRNT<sub>50</sub>) foram calculados pelo método de regressão de Probit e transformados para a escala logarítmica (log10). As diferenças entre as médias dos títulos de anticorpos para os diferentes sorotipos do vírus foram testadas usando análise de variância (ANOVA). As proporções de susceptíveis na população de estudo foram inferidas considerando-se os dois processos de amostrais (inquérito e subamostra para sorotipagem) por meio das estimativas pontuais e respectivos intervalos de confiança (IC 95%). As análises estatísticas foram realizadas nos Programas Epi Info, versão 6.04, GraphPad Prism, versão 4.0, e SPSS, versão 13.0.

#### ***4.6 Limitações Metodológicas***

O teste de neutralização é considerado uma técnica específica e de referência para identificação dos sorotipos do vírus dengue. No entanto, as complexidades inerentes à execução desse teste dificultam a sorotipagem de amostras significativas da população. Devido a essa limitação, não foi possível determinar o perfil de imunidade sorotipo específico nas três áreas do inquérito de soroprevalência, ficando a amostra do estudo restrita à área de condições sócio-econômicas e níveis de endemicidade intermediários. Outra limitação da técnica de PRNT se refere à possibilidade de reações cruzadas com outros *Flavivirus*, o que levaria a resultados falso-positivos. No entanto, vale ressaltar que não se tem registros de circulação de outros *Flavivirus*

na cidade do Recife. Além disso, algumas amostras de soro (n=12) foram testadas para febre amarela e nenhuma dessas amostras apresentou níveis de anticorpos neutralizantes para esse vírus, o que indica que não houve reações cruzadas entre os anticorpos antidengue sorotipo específico e o vírus FA.

#### ***4.7 Considerações éticas***

Os participantes da pesquisa assinaram um Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a identificação dos sorotipos do vírus dengue no material biológico coletado durante o inquérito. Os resultados do teste de soroneutralização foram fornecidos de forma confidencial e entregues aos participantes pessoalmente por um dos membros da equipe de pesquisadores. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ (CEP/CPqAM/FIOCRUZ- 19/08; CAAE-0019.0.095.000-08).

*Resultados*



## 5 RESULTADOS

### *5.1 Características da população de estudo*

Um total de 324 indivíduos soropositivos, identificados no inquérito através da detecção de IgG por ELISA, foi selecionado para o estudo e todos tiveram o perfil de anticorpos específicos determinado pela técnica de PRNT. Em 323 dos 324 indivíduos estudados foi detectada a presença de anticorpos antidengue sorotipo específico, tendo um indivíduo sido negativo para os três sorotipos virais.

A tabela 1 apresenta as principais características demográficas e clínicas da amostra de estudo. Houve maior proporção de indivíduos do sexo feminino (58,0%, 188/324). Com relação ao grupo etário, 109 (33,6%) pertencia a faixa etária entre 5 e 14 anos, 168 (51,9%) a faixa entre 15 e 49 anos e 47 (14,5%) na faixa com idade superior a 50 anos. Quanto ao nível de escolaridade, 118 (55,1%) possuíam o ensino médio completo/ incompleto. Em relação à história pregressa de dengue, 195 (60,9%) afirmaram nunca ter contraído a doença, sugerindo casos de infecção inaparente. Um total de 58 (40,8%) indivíduos informou ter procurado atendimento em serviços de saúde devido à doença. Um total de 14 indivíduos (4,4%) relatou vacinação prévia contra febre amarela, dos quais na maioria (n=13) a informação não foi confirmada pela apresentação do cartão (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas e clínicas da amostra de estudo. Engenho do Meio, Recife. 2005.

<b>Características</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b><i>Sexo</i></b>		
Masculino	136	42,0
Feminino	188	58,0
<b><i>Grupo etário</i></b>		
5-14	109	33,6
15-49	168	51,9
50 ou mais	47	14,5
<b><i>Escolaridade (≥15 anos)</i></b>		
Analfabeto	9	4,2
Ensino fundamental incompleto/ completo	65	30,4
Ensino médio incompleto/ completo	118	55,1
Superior incompleto	22	10,3
<b><i>Dengue referida</i></b>		
Sim	125	39,1
Não	195	60,9
<b><i>Busca por atendimento</i></b>		
Sim	58	40,8
Não	84	59,2
<b><i>Vacinação prévia por febre amarela</i></b>		
Sim	14	4,4
Não	301	95,6

### ***5.2 Perfil de anticorpos antidengue sorotipo específico***

Entre os 323 indivíduos que apresentaram anticorpos neutralizantes detectáveis, independentemente de apresentarem anticorpos para um ou mais sorotipos, 174 (53,8%) possuíam anticorpos para DENV-1, 104 (32,2%) para DENV-2 e 301 (93,2%) para DENV-3.

O gráfico 1 e tabela 2 mostram a distribuição da imunidade antidengue sorotipo específico segundo grupos etários. A frequência de indivíduos com anticorpos para os três sorotipos virais aumentou com a idade, sendo de 11,1%, no grupo de 5 a 14 e 21,0% na faixa etária entre 15 a 64.

Tabela 2. Perfil de anticorpos antidengue sorotipo específico segundo grupo etário. Bairro do Engenho do Meio, Recife. 2005.

Anticorpos sorotipo específico	Grupo etário (anos)				Total	
	5-14		15-64		N	%
	n	%	n	%		
DENV-1	2	1,8	4	1,9	6	1,9
DENV-2	2	1,8	1	0,5	3	0,9
DENV-3	38	34,9	77	36,0	115	35,6
DENV-1/DENV-2	5	4,6	8	3,7	13	4,0
DENV-1/ DENV-3	37	33,9	61	28,5	98	30,3
DENV-2/ DENV-3	13	11,9	18	8,4	31	9,6
DENV-1/ DENV-2/DENV- 3	12	11,1	45	21,0	57	17,7
Total	109	100,0	214	100,0	323	100,0

Teste Fisher ( $p=0,23$ )

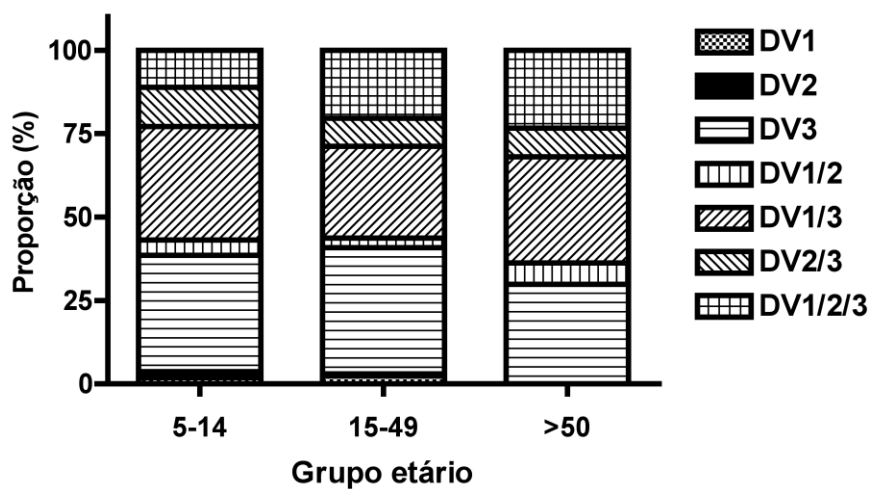


Gráfico 1 - Perfil de anticorpos antidengue sorotipo específico segundo grupo etário, Bairro do Engenho do Meio, Recife. 2005.

As frequências de imunidade monotípica e multitípica foram de 124 (38,4%) e 199 (61,6%), respectivamente. Entre as monotípicas, o marcador mais frequente foi o do DENV-3 (92,7%), enquanto que entre as multitípicas, a combinação de anticorpos para DENV-1 e DENV-3 predominou (49,2%), seguida pelas infecções prévias pelos três sorotipos (28,6%).

A tabela 3 apresenta as frequências de infecções monotípicas e multitípicas segundo características demográficas e clínicas. O sexo masculino apresentou maior frequência de infecções multitípicas (67,4%) em relação ao sexo feminino (57,4%), com associação estatisticamente significativa ( $\chi^2=2,88$ ;  $p=0,035$ ). A frequência de infecções multitípicas não diferiu entre os grupos etários ( $\chi^2=1,85$ ;  $p=0,395$ ).

A frequência de infecções multitípicas foi maior entre aqueles com relato de dengue prévia do que entre os que não haviam referido ter tido dengue, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significante ( $\chi^2=1,80$ ;  $p=0,073$ ). Não houve associação entre relato de procura por atendimento em serviços de saúde devido à dengue com o padrão de infecção (monotípica versus multitípica) ( $\chi^2=0,03$ ;  $p=0,361$ ). Apenas 14 indivíduos referiram vacinação prévia contra febre amarela, tendo-se observado maior frequência de infecções multitípicas entre aqueles com história de vacinação prévia ( $\chi^2=2,64$ ;  $p=0,027$ ).

Tabela 3 – Padrão de resposta imune sorotipo específico segundo características demográficas e clínicas. Engenho do Meio, Recife. 2005.

Variáveis	Padrão de resposta imune				$\chi^2$	p valor
	Monotípica		Multitípica			
	n	%	n	%		
<b>Sexo</b>						
Masculino	44	32,6	91	67,4	2,88	0,035
Feminino	80	42,6	108	57,4		
<b>Grupo etário</b>						
5-14	42	38,5	67	61,5	1,85	0,395
15-49	68	40,7	99	59,3		
50 ou mais	14	29,8	33	70,2		
<b><sup>1</sup>Dengue referida</b>						
Sim	42	33,6	83	66,4	1,80	0,073
Não	81	41,8	113	58,2		
<b><sup>2</sup>Busca por atendimento</b>						
Sim	19	32,8	39	67,2	0,03	0,361
Não	30	35,7	54	64,3		
<b><sup>3</sup>Vacinação febre amarela</b>						
Sim	2	14,3	12	85,7	2,64	0,027
Não	119	39,7	181	60,3		

Nota: <sup>1</sup>Relato de dengue prévia no momento da entrevista.

<sup>2</sup>Relato de procura de atendimento médico entre aqueles que referiram dengue sintomática.

<sup>3</sup>Relato de vacinação prévia contra febre amarela no momento da entrevista.

A determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes (log10) nas amostras das 12 pessoas com idade inferior a 15 anos e que apresentavam anticorpos neutralizantes aos três sorotipos virais, mostrou maiores valores médios de títulos de anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV-3 ( $4,57 \pm 1,05$ ), quando comparado às médias de títulos de anticorpos para os sorotipos DENV-1 ( $2,06 \pm 0,5$ ) e DENV-2 ( $2,16 \pm 0,49$ ) (Gráfico 2). O valor médio do título de anticorpos para o sorotipo DENV-3 diferiu dos valores médios para os demais sorotipos ( $p < 0,001$ ).

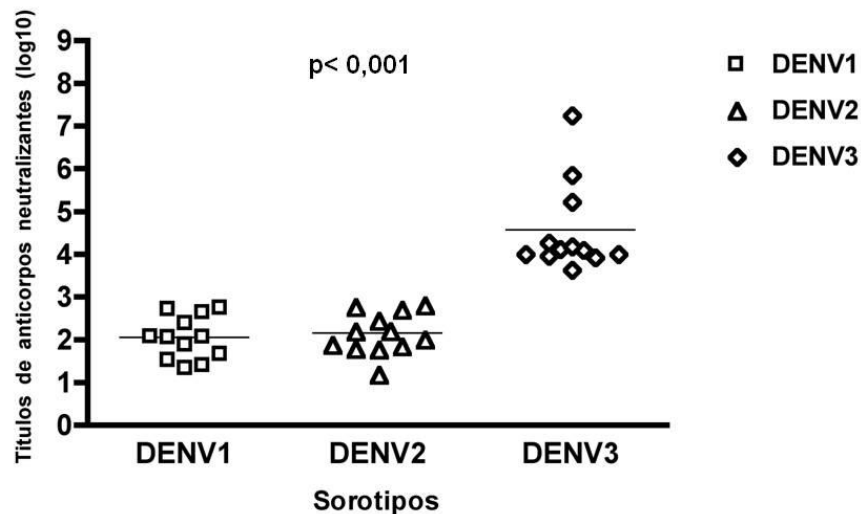


Gráfico 2 - Título de anticorpos neutralizantes (log10) antidengue sorotipo específico no soro de indivíduos com resposta múltiplica para os três sorotipos virais (n=12). Bairro do Engenho do Meio, Recife. 2005.

A tabela 4 e o gráfico 3 apresentam a proporção estimada de indivíduos susceptíveis à infecção pelos diferentes sorotipos de vírus dengue circulantes (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) na área de estudo, com base na extrapolação dos dados das amostras do presente estudo e do inquérito sorológico. A população residente no bairro, na faixa etária situada entre 5 a 64 anos, era de 8.964 indivíduos. A amostra estimada para o inquérito de soroprevalência de dengue na faixa etária entre 5 a 14 anos foi de 560 indivíduos, dos quais 400 foram examinados no inquérito, sendo 315 (78,8%) positivos para dengue. Na faixa situada entre 15 a 64 anos um total de 523 indivíduos foi examinado, dos quais, 94,1% foram positivos para dengue. A extrapolação dos dados foi realizada com base no percentual de susceptíveis aos diferentes sorotipos do vírus, identificados pelo teste de PRNT, e no percentual de negativos e, portanto susceptíveis a infecções pelo vírus dengue, identificados durante o inquérito de soroprevalência.

O percentual estimado de moradores susceptíveis a infecção pelo sorotipo DENV-2 foi de cerca de 80%, enquanto que o percentual de susceptíveis à infecção pelo DENV-1 foi em torno de 60%. Menos de 30 % da população era susceptível à infecção pelo DENV-3. Um percentual

inferior a 15% dos moradores com idade acima de 15 anos era vulnerável à infecção pelo sorotipo DENV-3.

Tabela 4. População, positivos examinados e proporção estimada de vulneráveis à infecção pelos sorotipos de vírus dengue circulantes (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) com base na extrapolação das amostras do inquérito sorológico de dengue. Bairro de Engenho do Meio, Recife, 2005.

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo etário (anos)</b>	
	<b>5 - 14</b>	<b>15- 64</b>
<i>População residente (n)</i>	1641	7323
<i>Dados do inquérito</i>		
Amostra (n)	560	640
Examinados (n)	400	523
Soropositivos, n (%)	315 (78,8%)	492 (94,1%)
<i>Proporção de vulneráveis na população (IC de 95%)</i>		
DENV-1	59,5 (49,4-69,1)	48,2 (55,7-40,8)
DENV-2	76,9 (84,4-67,9)	68,4 (74,9-61,3)
DENV-3	27,8 (37,0-20,3)	11,6 (17,4-7,5)

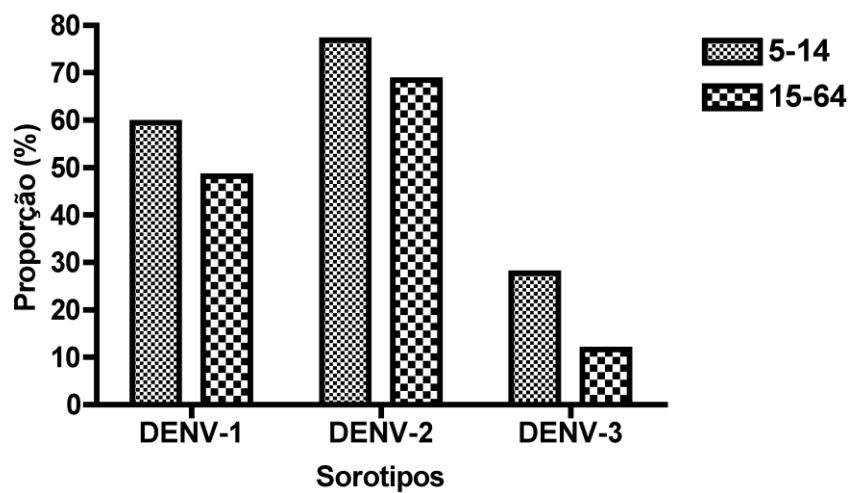


Gráfico 3. Proporção estimada de vulneráveis à infecção pelos sorotipos de vírus dengue circulantes (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) segundo grupo etário na área de estudo. Bairro de Engenho do Meio, Recife, 2005.



*Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo determinou o perfil de imunidade sorotipo específico em soropositivos de uma área endêmica da cidade do Recife, utilizando o teste de soroneutralização. Nossos achados mostram que uma parcela substancial da população de estudo possui imunidade ao sorotipo DENV-3, bem como evidências sorológicas de ter sido previamente infectado por mais de um sorotipo do vírus dengue, tendo esse perfil sido observado inclusive, na população mais jovem.

O elevado número de indivíduos imunes ao DENV-3 encontrado no nosso estudo sugere que, esse sorotipo foi o que se transmitiu com maior intensidade na população. Esses dados concordam com algumas evidências de que o sorotipo DENV-3, principalmente o genótipo Índia subcontinental, quando introduzido em uma nova região, é capaz de predominar sobre os demais sorotipos circulantes (GUZMÁN; KOURI, 2003; NOGUEIRA et al., 2007). Esse genótipo tem sido igualmente associado a epidemias de FHD em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (BRISENO et al., 1996; CORDEIRO et al., 2007b; NOGUEIRA et al., 2007).

Na cidade do Recife a introdução do genótipo Índia subcontinental do sorotipo DENV-3 em 2002, ocasionou a mais grave epidemia de dengue observada até o momento na cidade (MONTENEGRO et al., 2006). Após a sua introdução, o DENV-3 foi o sorotipo predominantemente isolado nos anos subseqüentes, de 2002 a 2006 (CORDEIRO et al., 2007b; RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde, 2011). Além disso, o seguimento de uma corte de casos de dengue hemorrágica constatou que mais de 50% eram decorrentes de infecções primárias causadas por esse sorotipo (BRITO, 2007), sugerindo a maior virulência desse sorotipo quando comparado aos demais vírus que circularam na região.

Nossos dados mostram menor frequência de indivíduos imunes a infecções monotípicas pelo DENV-2, assim como as infecções duais (DENV-1/ DENV-2 e DENV2/ DENV-3) por esse sorotipo. Na cidade do Recife, o sorotipo DENV-2 circulante pertence ao genótipo Sudeste Asiático, que tem sido associado a epidemias de dengue hemorrágico em diversas regiões do mundo (CORDEIRO et al, 2007a). Embora apresente elevada virulência (RICO-HESSE, 2003), o poder de penetração do DENV-2 na população da área pode possivelmente ter sido menor quando comparado aos demais sorotipos do vírus, principalmente ao DENV-3. Alternativamente, apesar, de haver registros de casos de dengue em todas as áreas da cidade, existe a possibilidade

de que o vírus DENV-2 tenha circulado com menor intensidade na área estudada em relação às demais.

Uma elevada proporção dos indivíduos estudados em todas as faixas etárias (~ 60%) apresentava anticorpos para mais de um sorotipo do vírus, sugerindo a elevada exposição à infecção na área de estudo. Este resultado é semelhante aos encontrados em diversos estudos conduzidos em áreas endêmicas dos continentes Asiático e Américas, os quais têm documentado a circulação de mais de um sorotipo viral e a elevada frequência de infecções multítipicas tanto na população adulta, quanto em crianças e adolescentes (CUNHA et al., 2008; SANCHEZ-BURGOS et al., 2008; WILDER-SMITH et al., 2005; YAMASHIRO et al., 2004).

Inquéritos soropidemiológicos conduzidos em regiões onde há registros de circulação dos quatro sorotipos do vírus, como em Singapura, Ásia, e São Domingo, República Dominicana, mostram que a maior parte dos indivíduos possui marcadores de infecção prévia para mais de um sorotipo do vírus, sugerindo que as infecções pelos diferentes sorotipos têm ocorrido seqüencial e simultaneamente na população dessas regiões (WILDER-SMITH et al., 2005; YAMASHIRO et al., 2004). No Brasil, a determinação de anticorpos sorotipo específico para dengue em dois inquéritos de soroprevalência realizados em Belo Horizonte, Minas Gerais, um dos quais, desenvolvido antes da introdução do sorotipo DENV-3 no país, igualmente observou maior proporção de indivíduos imunes a mais de um sorotipo (CUNHA et al., 2008; PESSANHA et al., 2010). Esse padrão possivelmente é um dos fatores responsáveis pelo aumento do número de casos de dengue grave na população, particularmente na população mais jovem.

Elevada frequência de infecções multítipicas foi observada também entre os jovens, nos quais mais de 10% dos soropositivos menores de 15 possuíam anticorpos para os três sorotipos do vírus. Resultados semelhantes foram observados em estudo prospectivo desenvolvido na Tailândia que incluiu crianças com idades entre menos de um e 10 anos, no qual a prevalência de infecções multítipicas (31,0%) foi maior do que a de infecções monotípicas (28,7%). Neste estudo, a presença de imunidade heterotípica foi um dos principais fatores de risco associado ao desenvolvimento de FHD/ SCD (SANGKAWIBHA et al., 1984). Na Venezuela, estudo prospectivo conduzido em escolares com idade entre 05 e 13 anos mostrou que cerca de 40% das crianças com sorologia indicativa de infecção prévia por dengue possuía anticorpos neutralizantes para mais de um sorotipo viral (COMACH et al., 2009).

A elevada freqüência de infecções multítípicas encontrada na amostra estudada, inclusive entre os indivíduos mais jovens, mostra a elevada intensidade de transmissão do vírus na área estudada e ao mesmo tempo, a alta vulnerabilidade à infecção, independentemente da idade. Além disso, ressalta-se o fato de cerca de 40% dos indivíduos soropositivos (que representa mais de 90% dos moradores da área) possuírem anticorpos para um único sorotipo viral, a maior parte para DENV-3, o que chama a atenção para o risco de ocorrência de infecções secundárias e, conseqüente, para o surgimento das formas graves da doença nessa população.

A ocorrência de infecções multítípicas foi discretamente maior entre os indivíduos do sexo masculino, sugerindo, possivelmente, maior exposição dos homens à infecção em relação às mulheres na área de estudo. No entanto, não há registros na literatura de diferença entre sexos quanto ao padrão de infecção (multítípica versus monotípica)

Um indivíduo da amostra, identificado como soropositivo para dengue pela técnica de ELISA, não apresentou anticorpos neutralizantes detectáveis para nenhum sorotipo de vírus dengue, sugerindo ter-se tratado de resultado falso-positivo pelo método utilizado no inquérito. Resultados sorológicos falso-positivos pelo teste de ELISA tendo o PRNT como padrão ouro, tem sido observados em outros estudos soroepidemiológicos (REISKIND et al., 2001; WILDER-SMITH et al., 2005), porém são usualmente pouco freqüentes. Além disso, maior freqüência de infecções multítípicas foi constatada entre àqueles que relataram vacinação prévia contra o vírus da febre amarela, o que sugere a possibilidade da presença de reações cruzadas pela técnica do PRNT. Apesar da elevada sensibilidade do teste de neutralização, a possibilidade de reações cruzadas em infecções seqüenciais ou entre aqueles que possuem imunização vacinal contra algum *Flavivirus* não deve ser descartada (MAKINO et al., 1994). No entanto, ressalta-se que em todas as amostras de indivíduos com anticorpos neutralizantes para os três sorotipos do vírus dengue, não se detectou a presença de reação cruzada com o vírus da febre amarela, fato que sugere que tal problema não tenha ocorrido.

No Recife, a vacinação para febre amarela não é rotina uma vez que não há registros de circulação autóctone desse vírus na cidade. Além disso, deve-se ressaltar que as informações a respeito de vacinação prévia contra febre amarela foram relatadas pelos indivíduos sem a devida comprovação pela verificação no cartão de vacinação, fato que de certo modo compromete a validade da informação. Em Belo Horizonte, a análise das amostras do inquérito sorológico conduzido na cidade mostrou que, apesar, de cerca de 80% dos indivíduos terem relatado

vacinação prévia contra febre amarela, a soropositividade ao teste de neutralização não esteve associada à história de vacinação previa por febre amarela (PESSANHA et al., 2010). Assim, conclui-se que, possivelmente a associação encontrada tenha sido decorrente de viés de memória relacionada à informação sobre vacinação previa para febre amarela. Estudos que investiguem a presença de reações cruzadas entre os *Flavivirus* utilizando o teste de neutralização são necessários para o melhor entendimento da influência da imunização para febre amarela nos resultados do PRNT.

Os elevados títulos de anticorpos para o sorotipo DENV-3 verificados no estudo, possivelmente, refletem a circulação recente desse sorotipo entre os indivíduos da área (CORDEIRO et al, 2007a). Apesar, de os anticorpos neutralizantes persistirem por diversos anos no soro de indivíduos que experimentaram infecções prévias pelo vírus dengue, os seus níveis declinam com o passar do tempo (IMRIE, 2007). Como os sorotipos DENV-1 e DENV-2 circularam mais precocemente na população da área, os títulos de anticorpos para esses sorotipos se encontram mais baixos, quando comparados ao DENV-3.

Robustas respostas de anticorpos neutralizantes sorotipo específico são desenvolvidas após a infecção com o vírus dengue e fornece imunidade permanente de longa duração para reinfeção com o mesmo sorotipo do vírus. A persistência de anticorpos antidengue sorotipo específico pode ser um significativo fator de risco para desenvolvimento de doença grave em países endêmicos com circulação de diferentes sorotipos do vírus (IMRIE, 2007). No nosso estudo uma considerável parcela dos indivíduos possuía marcadores de infecção monotípica pelo DENV-3, possivelmente, com altos títulos de anticorpos neutralizantes para esse sorotipo, devido a sua recente circulação na área. Esse fato alerta para o risco de ocorrência das formas graves da doença em virtude da recente retomada da circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 na cidade do Recife.

A extrapolação dos dados da amostra permitiu estimar a proporção de vulneráveis aos diferentes sorotipos na população residente na área de estudo, evidenciando o elevado percentual de indivíduos susceptíveis a infecções pelos sorotipos DENV-2, seguido pelo DENV-1. Ao mesmo tempo mostra que, quase a totalidade da população é resistente a infecção pelo sorotipo DENV-3.

A substituição de um sorotipo por outro, usualmente observada durante epidemias, pode ser explicada pela elevação do número de indivíduos imunes ao sorotipo anteriormente

predominante (GUZMÁN; KOURI, 2003). O elevado percentual de indivíduos imunes ao DENV-3 justifica a baixa circulação desse sorotipo nos últimos anos e a retomada da circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 na população (RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde, 2011). Dados de um estudo desenvolvido na cidade do Recife, que detectou os sorotipos circulantes nas populações de mosquitos *Aedes aegypti* entre 2005-2006, reforçam os nossos achados. Nesse estudo, foram detectadas a presença de DENV-1 e DENV-2 nas amostras de mosquitos analisados, o que indica que a ressurgência desses sorotipos na cidade se iniciou nesse período (GUEDES et al., 2010). Dados do monitoramento da circulação viral na cidade do Recife mostram que entre 2007 e 2008, apesar de ter havido isolamento dos três sorotipos do vírus na cidade, pode-se observar a re-circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 e a substituição do sorotipo anteriormente predominante, o DENV-3, pelo DENV-2 que passou a predominar nos anos subsequentes (2009 e 2010) (RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde, 2011).

O conhecimento da imunidade sorotipo específico na população nos permitiu avaliar a vulnerabilidade dessa população à ocorrência de epidemias da doença. No entanto, o reduzido tamanho amostral constitui uma limitação do nosso estudo. As dificuldades inerentes à execução da técnica de soroneutralização impossibilitaram a determinação do perfil de imunidade sorotipo específico em uma amostra que fosse representativa das três áreas de estudo do inquérito sorológico anteriormente realizado. Essa dificuldade limitou a realização do estudo a uma subamostra da área com condições sócio-econômicas e níveis de prevalência intermediários. Em contrapartida, a utilização do PRNT, que apresenta elevada sensibilidade, nos permitiu obter resultados mais acurados sobre a imunidade antidengue sorotipo específico da área. A possibilidade de viés de memória nos relatos dos indivíduos que referiram vacinação prévia contra febre amarela consiste em uma limitação metodológica que deve ser considerada.

Esse estudo analisou o perfil de imunidade antidengue sorotipo específico em uma área hiperendêmica da cidade do Recife, nordeste do Brasil. O elevado percentual de imunidade a mais de um sorotipo do vírus sugere a intensidade e potencial de transmissão desses vírus na cidade, inclusive entre a população infanto-juvenil. Em virtude dos elevados índices de registros de casos de dengue em todos os bairros da cidade, é possível que esse perfil reflita aquele das demais áreas do Recife, podendo a circulação viral ser ainda mais intensa nos bairros com piores condições sócio-econômicas e ambientais. O alto percentual de susceptíveis aos sorotipos

DENV-1 e DENV-2 alerta para a necessidade de instituição de medidas mais efetivas de controle vetorial e de vigilância epidemiológica.

Apesar, da dificuldade de identificação dos vírus dengue em infecções prévias, devido às limitações das ferramentas diagnósticas disponíveis, mais estudos que investiguem a imunidade sorotipo específico a nível populacional são necessários.

*Conclusões*



## 7 CONCLUSÕES

- a) Observou-se maior frequência de indivíduos imunes ao sorotipo DENV-3, em todas as faixas etárias, sugerindo intensa circulação desse sorotipo entre os moradores da área.
- b) A frequência de indivíduos com anticorpos neutralizantes sorotipo específico para mais de um sorotipo do vírus dengue foi bastante elevada, inclusive na população mais jovem.
- c) A presença de marcadores de infecções multitépicas esteve associada ao sexo masculino e ao relato de vacinação contra Febre Amarela.
- d) A extrapolação dos resultados mostrou maior percentual de susceptíveis no bairro aos sorotipos DENV-1 e DENV-2, justificando a retomada recente da circulação desses vírus na população.

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

ACOSTA-BAS, C.; GOMEZ-CORDERO, I. *Biología y métodos diagnósticos del dengue*. Revista Biomédica, Yucatán, v. 16, n. 2, p. 113-137, 2005.

BECKETT, C. G. et al. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in phase 1 clinical trial. Vaccine, Guildford, v. 29, p. 960-968, 2010.

BRAGA, C. et al. Seroprevalence and risk factors for dengue infection in socio-economically distinct areas of Recife, Brazil. Acta Tropica, Basel, v. 113, p. 234–240, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe epidemiológico da dengue. Análise de situações e tendências. Brasília, DF, 2010a. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>>. Acesso em: 08 dez. 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica: isolamento do vírus DENV-4 em Roraima, Brasil. Brasília, DF, 2010b. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>>. Acesso em: 08 dez. 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Manaus/AM. Brasília, DF, 2011a. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Belém/PA. Brasília, DF, 2011b. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>>. Acesso em: 25 fev. 2011.

BRISEÑO, B. et al. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of dengue serotype 3 in Mexico. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v.2, p. 133-135, 1996.

BRITO, C. A. A. Dengue em Recife, Pernambuco: padrões clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e fatores de risco associados á forma grave da doença. 2007. 80f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

- COMACH, G. et al. Dengue virus infections in a cohort of schoolchildren from Maracay, Venezuela: a 2- year prospective study. Vector-borne and zoonotic diseases, New York, v. 9, n. 1, p. 87-92, 2009.
- CORDEIRO, M. T. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 40, n. 6, p. 605-611, 2007a.
- CORDEIRO, M. T. et al. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 3328-3334, 2007b.
- CORWIN, A. L. et al. Epidemic dengue transmission in southern Sumatra, Indonesia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 95, p. 257-265, 2001.
- CUNHA, M. M. et al. Fatores associados à infecção pelo vírus dengue no município de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, Brasil: características individuais e diferenças intra-urbanas. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 17, n. 3, p. 217-230, 2008.
- DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, Salvador, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.
- DUTRA, N. R. et al. The laboratorial diagnosis of dengue: applications and implications, Journal of Global Infectious Diseases, Florida, v. 1, p. 38-44, 2010.
- ENDY, T. P. et al. Spatial and temporal circulation of dengue serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. American Journal of Epidemiology, Baltimore, v. 156, n. 1, p. 52-59, 2002.
- IBGE. Censo demográfico 2000: Características populacionais e domiciliares. Disponível em: < [www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/default\\_censo\\_2000.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/default_censo_2000.shtm)>. Acesso em: 12 jan. 2011.
- IBGE. IBGE-cidades@. Disponível em: < [www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php) > Acesso em: 12 jan. 2011.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/ dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21<sup>st</sup> century. TRENDS in Microbiology, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GUEDES, D. R. D. et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. Journal of Vector borne disease, New Delhi, v. 47, p. 67-75, 2010.

GUILARDE, A. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. The Journal of Infectious Disease, Arlington, v. 197, p. 817-824, 2008.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. Journal of Clinical Virology, Washington, v. 27, p. 1-13, 2003.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. International Journal of Infectious diseases, Hamilton, v. 8, p. 69-80, 2004.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. Nature Reviews Microbiology, London, v. 8, n. 12, p. S7-S16, 2010.

HALSTEAD, S. B. et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. The American Journal Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 65, n. 3, p. 180-183, 2001.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. Advances in virus research, New York, v. 60, p. 421-467, 2003.

HALSTEAD, S. B. Dengue. The Lancet, London, v. 370, p.1644-1652, 2007.

IMRIE, A. et al. Antibody to dengue 1 detected more than 60 years after infection. Viral immunology, New York, v. 20, n. 4, p. 672-675, 2007.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO. Climatologia. Disponível em: <

<http://www.itep.br/LAMEPE.asp>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

JOHNSON, B. W. et al. Evaluation of Chimeric Japanese Encephalitis and dengue viruses for use in diagnostic Plaque reduction Neutralization Tests. Clinical and vaccine Immunology, Washington, v. 16, n. 7, p. 1052-1059, 2009.

KAO, C. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, Taipei, v. 38, n. 1, p. 5-16, 2005.

KOH, BENJAMIN K. W. et al. The 2005 dengue epidemic in Singapore: Epidemiology, prevention and control. Annals Academy of Medicine, Singapore, v. 37, p. 538-45, 2008.

KUNO, G. Review of the Factors Modulating Dengue Transmission. Epidemiologic Reviews, Baltimore, v. 17, n. 2, p. 321-335, 1995.

MAKINO, Y et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. Microbiology and Immunology, Tokio, v. 38, n. 12, p. 951-955, 1994.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. Immunological Reviews, Copenhagen, v. 225, p. 300-313, 2008.

MELO, P. R.S. et al. The dynamics of dengue virus serotype 3 introduction and dispersion in the state of Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 8, p. 905-912, 2007.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 307-313, 2006.

MONTENEGRO, D. et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da epidemia de dengue no Recife, PE, em 2002. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 09-13, 2006.

MORENS, D. M. Simplified Plaque Reduction Neutralization Assay for dengue viruses by semimicro Methods in BHK-21 cells: comparision of BHK suspension test with standard Plaque

reduction neutralization. Journal of clinical Microbiology, Washington, v. 22, n. 2, p. 250-254, 1985.

NISALAK, A. et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 68, n. 2, p. 191-202, 2003.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1991: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. Epidemiology and Infection, Cambridge, v. 111, n. 1, p. 163-170, 1993.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue Virus Type 3, Brazil, 2002. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 11, n. 9, p. 1376-1381, 2005.

NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. Pan American Journal of Public Health, Washington, v. 22, n. 5, p. 358-363, 2007.

OCAZIONEZ, R. E., et al. Serotipo, patron de infección y dengue hemorrágico em área endêmica Colombiana. Revista de Salud Publica, Bogotá, vol. 9, n. 2, p. 262-274, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Fact sheet, n. 117. Geneva, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 08 dez. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Geneva, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/>>. Acesso em: 08 dez. 2010.

OSANAI, C. H. et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 25, p. 53-54, 1983.

PANHUIS, W. G. et al. Inferring the serotype associated with dengue virus infections on the basis of pre- and postinfection neutralizing antibody titers. The Journal of Infectious Diseases, Atlanta, v. 202, n. 7, p. 1002-1010, 2010.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nature Reviews Microbiology, London, v. 8, n. 12, p. S30-S38, 2010.

PESSANHA, J. E. M. et al. Dengue em três distritos sanitários de Belo Horizonte, Brasil: inquérito soropidemiológico de base populacional, 2006 a 2007. Pan American Journal of Public Health, Washington, v. 27, n. 4, p. 252-258, 2010.

PINHEIRO, F. P.; CHUIT, R. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. Infections in Medicine, New York, v. 15, n. 4, p. 244-251, 1998.

RECIFE. Prefeitura Municipal. Atlas de desenvolvimento humano do Recife. Recife. 2005.

PUTNAK, J. R. et al. Comparative evaluation of three assays for measurement of dengue virus neutralizing antibodies. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 79, n. 1, p. 115-122, 2008.

RECIFE. Secretaria Municipal de Saúde. Boletim epidemiológico semanal de dengue. Recife, 2011.

REISKIND, M. H. et al. Epidemiological and ecological characteristics of past dengue virus infection in Santa Clara, Peru. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 6, n. 3, p. 212-218, 2001.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. Advances in Virus Research, New York, v. 59, p. 315-341, 2003.

RICO-HESSE, R. Dengue virus virulence and transmission determinan. Current Topics in Microbiology and Immunology, Berlin, v. 338, p. 45-55, 2010.

RODRIGO, W. W. S. I. et al. Dengue virus neutralization is modulated by IgG antibody subclass and Fcγ receptor subtype. Virology, New York, v. 394, p. 175-182, 2009.

ROEHRING, J. T.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. D. T. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Viral immunology, New York, v. 21, n. 2, p. 123-132, 2008.

ROSS, T. M. Dengue virus. Clinics in Laboratory Medicine, Philadelphia, v. 30, p. 149-160, 2010.



RUSSELL, P. K.; NISALAK, A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. The Journal of Immunology, Bethesda, v. 99, p. 291-296, 1967.

SANCHEZ-BRUGOS, G. G., et al. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra los serotipos del virus dengue em universitários de Tabasco, México. Salud Publica de Mexico, Cuernavaca, v. 50, n. 5, p. 362-366, 2008.

SANGKAWIBHA, N. et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. American Journal of Epidemiology, Baltimore, v. 120, n. 5, p. 653-669, 1984.

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

SIMASATHIEN, S. et al. Safety and immunogenicity of a trivalent live-attenuated dengue vaccine in Flavivirus naive children. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.78, n. 3, p. 426-433, 2008.

SIQUEIRA, J. B. et al. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. The American Journal and Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 71, p. 646–651, 2004.

SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 11, n. 1, p. 48-53, 2005.

SIQUEIRA, J. B et al. Spatial point analysis based on dengue surveys at household level in central Brazil. BMC public Health, London, v. 8, n. 361, 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2458-8-361.pdf>> Acesso em: 29 jan. 2011.

SCHEAFFER, R. L.; MENDENHALL, W.; OTT, L. Simple Random Sampling. In: SCHEAFFER, R. L. (Org.). Elementary Survey Sampling. 2 ed. Boston: Duxbury, 1979.p. 48-49.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro-1986. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 245-246, 1986.

SUWANDONO, A. et al. Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 100, p. 855-862, 2006.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue in Brazil: situation-2001 and trends. Dengue Bulletin, New Delhi v. 26, p. 70-76, 2002.

TEIXEIRA, M. G., et al. Dinâmica de circulação do vírus da dengue em uma área metropolitana do Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 12, n. 2, p.87-97, 2003.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 25, supl. 1, p. 7-18, 2009.

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

THOMAS, L. et al. Influence of the dengue serotypes, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. The American Journal Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 78, n. 6, p. 990-998, 2008.

THOMAS, S. J. et al. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: how alterations in assay conditions impact performance. The American Journal Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 81, n. 5, p. 825-833, 2009.

VALDES, L. et al. La epidemiologia del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. Pan American Journal of Public Health, Washington, v. 6, n. 1, p. 16-25, 1999.

VASCONCELOS, P.F.C. et al. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito sorológico aleatório. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.32, n.5, p. 447-454, 1998.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and Virus serotype correlate with disease severity. The Journal of Infectious Diseases, Atlanta, v. 181, p. 2-9, 2000.

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





WHALA, W. M. P. B. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. Virology, New York, v. 392, p. 103-113, 2009.

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

YAMASHIRO, T. et al. Seroprevalence of IgG specific for dengue virus among adults and children in Santo Domingo, Dominican Republic. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 71, n. 2, p. 138-143, 2004.

*Apêndices*

## APÊNDICE A – Questionário padronizado do inquérito

 <b>SAUDAVEL</b> <small>Sistema de Apoio Unificado para a Detecção e Acompanhamento em Vigilância Epidemiológica</small>		  	
<b>Soroepidemiologia do dengue em áreas do Recife</b>			
<b>DADOS DO INDIVÍDUO</b>			
<b>1. Data da entrevista</b> / /		<b>2. Número da Família (Preenchido pelo coordenador)</b> <input type="text"/>	
<b>3. Número de registro para a coleta de sangue (Colar etiqueta)</b> <input type="text"/>		<b>4. Identificação do morador no domicílio</b> <input type="text"/>	
<b>5. Nome</b> _____		<b>6. Sexo</b> 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino <input type="checkbox"/>	
<b>7. Qual a sua idade ?</b> _____ anos		<b>8. Qual a data do seu nascimento?</b> / /	
<b>DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS</b>			
<b>9. Freqüenta escola?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não (Siga para a questão 17)			
<b>10. Em que bairro a sua escola se localiza?</b> 1. Mesmo bairro onde mora <input type="checkbox"/> 2. Outro bairro. Especificar: _____ 3. outro município 9. não se aplica		<b>11. Código do bairro em que a escola se localiza</b> <input type="text"/>	
<b>12. Nome da escola</b>		<b>13. Código da escola</b> <input type="text"/>	
<b>PARA A PESSOA QUE FREQUENTA ESCOLA</b>			
<b>14. Qual é o curso que frequenta ?</b> 1. Creche 2. Pré-escolar 3. Classe de alfabetização 4. Ensino Fundamental ou 1º Grau – Regular seriado 5. Ensino Fundamental ou 1º Grau – Regular não-seriado 6. Supletivo (Ensino Fundamental ou 1º Grau) 7. Alfabetização de adultos		8. Ensino médio ou 2º Grau – Regular seriado 9. Ensino médio ou 2º Grau – Regular não-seriado 10. Supletivo (Ensino Fundamental ou 2º Grau) 11. Pré-vestibular 12. Superior – Graduação 13. Especialização/Residência 14. Mestrado ou Doutorado 99. Não se aplica	
<b>15. Qual é a série que frequenta ?</b> 1. Primeira 2. Segunda 3. Terceira 4. Quarta 5. Quinta		6. Sexta 7. Sétima 8. Oitava 9. Curso não seriado 99. Não se aplica	
<b>PARA A PESSOA QUE NÃO FREQUENTA ESCOLA MAIS JÁ FREQUENTOU</b>			
<b>16. Qual é a espécie do curso mais elevado concluído ?</b> 1. Alfabetização de adultos 2. Antigo primário 3. Antigo ginásio 4. Antigo Clássico, Científico, ETC. 5. Ensino Fundamental ou 1º Grau		6. Ensino médio ou 2º Grau 7. Pré-vestibular 8. Superior – Graduação 9. Mestrado ou Doutorado 10. Não concluiu nenhum curso 99. Não se aplica	
<b>17. Na semana passada, você trabalhou em alguma atividade remunerada ?</b> (Inclusive a atividade de preparação de algum produto, venda ou prestação de algum serviço no próprio domicílio)		1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não (Siga para questão 22) _____ 9. Não se aplica	
<b>18. Qual era a ocupação que você exercia no trabalho principal na semana passada?</b> Atenção : Critérios para definir o trabalho principal na semana : a. Maior número de horas normalmente trabalhadas por semana; b. Trabalho que possui há mais tempo; e c. Maior rendimento mensal.		9999. não se aplica <input type="text"/>	

<b>19. Em qual bairro do Recife se localiza o seu trabalho principal?</b>	
1. Mesmo bairro da residência	
2. Outro bairro. Especificar: _____	
3. Outro município	
9. Não se aplica	
<input type="checkbox"/>	
<b>20. Código do bairro em que seu trabalho se localiza</b>	
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
<b>Dados clínicos e epidemiológicos</b>	
<b>21. Tomou vacina contra febre amarela nos últimos 12 meses?</b>	<b>22. Observação do cartão vacinal contra febre amarela</b>
1. Sim	1. Não apresentou o cartão
2. Não (siga para a questão 26)	2. Uma dose
8. Não sabe informar	3. Duas ou mais doses
<input type="checkbox"/>	4. Apresentou cartão mas não consta essa vacina
<b>23. Data da última dose da vacina contra febre amarela</b>	<b>24. Teve dengue nos últimos 12 meses ?</b>
____/____/____	1. Sim (siga para a questão 28)
	2. Não
	8. Não sabe informar
	<input type="checkbox"/>
<b>25. Na ocasião, procurou atendimento em algum serviço de saúde?</b>	
1. Sim	
2. Não (siga para a questão 32)	
8. Não sabe informar (siga para a questão 32)	
<input type="checkbox"/>	
<b>26. Em qual setor do serviço de saúde foi atendido ? (1 – Sim 2 – Não 8 – Não sabe)</b>	
Ambulatório/consultório <input type="checkbox"/>	Emergência <input type="checkbox"/>
	Internação <input type="checkbox"/>
<b>26. Qual foi o tipo de serviço de saúde que você foi atendido ? (1 – Sim 2 – Não 8 – Não sabe)</b>	
SUS (público) <input type="checkbox"/>	Privado/conveniado SUS <input type="checkbox"/>
	Privado/plano de saúde <input type="checkbox"/>
<b>28. Sentiu ou vem sentindo algum(s) desses sintomas nos últimos oito dias? (1 – Sim 2 – Não 8 – Não sabe)</b>	
___Febre <input type="checkbox"/>	___Dor de cabeça <input type="checkbox"/>
___Dores no corpo <input type="checkbox"/>	___Dor nos olhos <input type="checkbox"/>
___Moleza <input type="checkbox"/>	___Manchas róseas na pele <input type="checkbox"/>
<b>29. Coleta de sangue:</b>	<b>30. Resultado da sorologia</b>
1. Realizada	1. Positivo
2. Recusa	2. Negativo
<input type="checkbox"/>	3. Indeterminado
	4. Material danificado
	5. Extravio
	9. Não se aplica
	<input type="checkbox"/>

<b>Entrevistador :</b>	<b>Assinatura</b>
_____	_____



Centro de Pesquisas

AGGEU MAGALHÃES

## APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido



Ministério da Saúde

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Pesquisa:** “Perfil epidemiológico sorotipo específico da infecção pelo vírus dengue em uma área endêmica da cidade do Recife-Pernambuco”

**Instituição:** Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ.

Eu, \_\_\_\_\_, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado: “**Perfil epidemiológico sorotipo específico da infecção pelo vírus dengue em uma área endêmica da cidade do Recife-Pernambuco**”, desenvolvido pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ.

Recebi a informação que o propósito principal deste projeto é identificar qual o tipo de vírus da dengue que se encontra circulando na área onde vivo. Também fui informado (a) que fui convidado (a) a participar dessa pesquisa porque o resultado do meu exame para dengue foi positivo em uma pesquisa anterior que participei. Nessa pesquisa, intitulada “Soroepidemiologia da dengue em diferentes áreas do Recife e sua relação com fatores ambientais e entomológicos”, após minha prévia autorização, fui submetido a uma coleta de sangue para realização de exame para dengue, cujo resultado deu positivo. Parte desse material biológico (amostra de soro) foi estocado, com meu consentimento, e encontra-se sob a guarda do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ.

Para minha participação nesta pesquisa, permito que seja realizado neste material estocado o exame para identificar o tipo de vírus que eu fui infectado. Estou ciente de que o resultado desse exame será entregue pessoalmente na minha casa e que meu nome e o resultado não serão revelados a outras pessoas. Também tenho conhecimento de que esse procedimento não implicará qualquer risco a minha saúde e que serei beneficiado em saber o tipo de vírus dengue o qual estou imune.

Permito o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães utilizar as informações médicas obtidas sobre minha pessoa em reuniões, congresso e publicações científicas preservando, neste caso, minha identidade. Fui esclarecido (a) também, que caso outra pesquisa venha a ser realizada com o material estocado, eu serei contatado para autorização do seu uso.

Finalmente, me foi informado que caso eu não queira participar ou se quiser desistir a qualquer momento, isso não vai implicar em nenhum prejuízo de qualquer natureza para minha pessoa ou de meus familiares. Esse termo de consentimento me foi totalmente explicado e eu entendi seu conteúdo.

Caso eu deseje mais esclarecimentos ou caso eu tenha qualquer dúvida sobre a pesquisa, poderei entrar em contato com a coordenadora da pesquisa, Dra. Cynthia Braga, que me esclarecerá as dúvidas pelo telefone (81) 21012577, no horário das 8:00 as 12:00 horas. Eu concordo em participar deste estudo, assinando esse termo em duas vias, ficando uma cópia comigo.

Recife, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, residente à Rua \_\_\_\_\_, tendo recebido as informações e esclarecimentos necessários, ciente da utilização de meu material biológico, concordo em participar do estudo.

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

**Autorização do responsável por menores de 18 anos:**

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Informações sobre o andamento da pesquisa podem ser encontradas no site do Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP): <http://portal.saude.gov.br/sisnep/pesquisador/menuusuario.cfm>

*Anexos*



## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



**Título do Projeto:** Perfil epidemiológico sorotipo-específico da infecção pelo vírus dengue em uma área endêmica da cidade do Recife

**Pesquisador responsável:** Maria Cynthia Braga

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/FIOCRUZ

**Data de apresentação ao CEP:** 19/04/2008

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 19/08

**Registro no CAAE:** 0019.0.095.000-08

### PARECER Nº 030/2008

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 10 de junho de 2011. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 10 de junho de 2008.



Dr<sup>a</sup> Zulma Maria de Azevedos  
Biólogica  
Coordenadora  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 10/06/2009.