



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



Ana Maria da Silva

**ESTUDO DE CINÉTICA DE VIREMIA DO
VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3 EM FORMAS
CLÍNICAS DA DENGUE COM DIFERENTES
NÍVEIS DE GRAVIDADE**

RECIFE
2008

Ana Maria da Silva

**ESTUDO DE CINÉTICA DE VIREMIA DO VÍRUS DENGUE
SOROTIPO 3 EM FORMAS CLÍNICAS DA DENGUE COM
DIFERENTES NÍVEIS DE GRAVIDADE**

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

Orientadores: Ernesto Torres Azevedo Marques Júnior
Marli Tenório Cordeiro

RECIFE
2008

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S586e Silva, Ana Maria da.

Estudo de cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 em formas clínicas da dengue com diferentes níveis de gravidade. / Ana Maria da Silva. — Recife: A. M. da Silva, 2008.
158 f.: il.

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

Orientadores: Ernesto Torres Azevedo Marques Júnior, Marli Tenório Cordeiro.

1. Dengue. 2. Viremia. 3. Carga Viral. 4. PCR. 5. Febre Hemorrágica da Dengue. 6. Transaminases. 7. Plaquetas. 8. Hematócrito. I. Marques Júnior, Ernesto Torres Azevedo. II. Cordeiro, Marli Tenório. III. Título.

CDU 616.98

Ana Maria da Silva

**ESTUDO DE CINÉTICA DE VIREMIA DO VÍRUS DENGUE
SOROTIPO 3 EM FORMAS CLÍNICAS DA DENGUE COM
DIFERENTES NÍVEIS DE GRAVIDADE**

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

Aprovada em: 28/05/08

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ernesto Torres Azevedo Marques Júnior (Orientador)
CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva (Revisor/Titular)
CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Carlos Alexandre Antunes de Brito (Titular)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho ao
Dr. Frederico Abath
(1957-2007)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador , Dr. Ernesto Marques, pela confiança em meu trabalho, pelo apoio e pelo aprendizado.

À Dra. Marli Tenório, co-orientadora deste trabalho, pelo incentivo, dedicação, confiança e amizade; por sua postura prudente e coerente, compartilhando sua experiência em todos os momentos.

Ao Dr. Frederico Abath, orientador e incentivador deste projeto, que será sempre lembrado como um exemplo de dedicação e competência a seguir.

À Dra. Laura Gil, do LaViTE, pela amizade e apoio à realização deste trabalho.

Aos companheiros do LaViTE, pela amizade, solidariedade e cooperação.

Aos amigos Eduardo Nascimento e Patrícia Brotto, que mesmo distantes, não deixaram nunca de colaborar e incentivar a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria Acadêmica e da biblioteca do CPqAM, pela presteza e por toda boa vontade com que sempre se dispuseram a ajudar.

Aos professores da pós-graduação, particularmente ao professor Djalma Agripino, pelas orientações precisas e contribuição para a elaboração deste trabalho.

Ao professor Ulisses Montarroyos, pela colaboração nas análises estatísticas dos dados.

Aos colegas do Laboratório do Hospital Barão de Lucena, em particular à Dra. Amélia Lacerda, Dra. Ana Lima e aos companheiros da hematologia e bioquímica, Graça Vieira, Gustavo, Zélia, Nadja, Moaci, Graça Araújo, Lúcia, Geruza, Luciano e José Mercês pela compreensão, apoio e ajuda durante as ausências necessárias.

Aos colegas do curso do mestrado, em especial à Tereza, Flávio e Geórgia, por toda a cooperação e convivência.

Às amigas Ana Lisa e Marta Mônica, companheiras de todas as horas.

À minha mãe, pela confiança, otimismo, incentivo e amor, sempre.

Ao meu marido, Victor, por seu amor, compreensão e por ser “muito meu amigo”.

Minha sincera gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E a Deus, por tudo.

“ Deus quer,
o homem sonha,
a obra nasce.”

Fernando Pessoa

SILVA, Ana Maria da. **Estudo de cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 em formas clínicas da dengue com diferentes níveis de gravidade.** 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

Estudos que relacionam a cinética de viremia, o estado de imunidade do hospedeiro e as formas clínicas da dengue são importantes para uma melhor compreensão da patogênese da doença. A quantificação da magnitude da replicação viral é fundamental no entendimento da progressão da doença para formas clínicas mais graves. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 (DENV-3) nos diferentes tipos de infecção e formas clínicas. Dois kits (DSSS-P26 e DSSS-P29), específicos para detecção e determinação da carga viral do DENV-3 por PCR em tempo real, foram testados e validados, sendo escolhido e utilizado o kit DSSS-P29 que apresentou um limite de detecção de 10 cópias de RNA. Foram analisadas 314 amostras de soro seqüenciais de 85 pacientes, além de 209 primeiras amostras coletadas na fase aguda (período febril). Os níveis de viremia foram os mesmos em infecções primárias e secundárias e diferentes formas clínicas, quando analisadas amostras seqüenciais. O tempo mediano de duração da viremia foi de 10 dias. A carga viral máxima foi observada entre o primeiro e o terceiro dia após o início dos sintomas. Foi detectada viremia após a defervescência em todas as formas clínicas. A redução dos níveis de plaquetas foi mais acentuada nas infecções primárias, com valores mais baixos entre o quinto e o sétimo dia de início dos sintomas. Além disso, os valores de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) foram mais elevados que os de transaminase glutâmico pirúvica (TGP) em amostras coletadas até oito dias de início dos sintomas, em infecções secundárias e na forma clínica dengue clássica complicada, embora a TGP tenha permanecido alterada por mais tempo. Os níveis de viremia foram mais elevados nas formas mais graves (febre hemorrágica da dengue e dengue clássica complicada) que em dengue clássica ($p < 0,0001$), quando analisada a primeira amostra de cada paciente, coletada na fase febril. Os níveis de carga viral e cinética de viremia nas amostras analisadas não possibilitaram prever a gravidade da dengue.

Palavras-chave: Dengue. Viremia. Carga viral. PCR. Febre Hemorrágica da dengue. Transaminases. Plaquetas. Hematócrito.

SILVA, Ana Maria da. **Study of viraemia kinetics of serotype 3 dengue virus in dengue clinical forms with different severity levels** . 2008. Dissertation (Master of Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

ABSTRACT

Studies correlating viraemia kinetics, the host's immune status and clinical forms of dengue are important for a better understanding of the disease pathogenesis. The quantification of magnitude in viral replication is fundamental in the follow-up of disease progression into more severe forms. The present work was designed to study the viraemia kinetics of serotype 3 dengue virus (DENV-3) in different infection types and clinical forms. Two kits (DSSS-P26 and DSSS-P29), specific for viral load detection and determination of DENV-3 by real-time PCR were tested and validated. The kit DSSS-P29 with a lowest detection limit of 10 copies of RNA was chosen and used in all experiments. A total of 314 sequential serum samples from 85 patients were analyzed, in addition to another 209 first samples collected in acute phase (febrile period). In the sequential samples the levels of viraemia were similar in both primary and secondary infections, as well as in the different clinical forms. The median time of viraemia duration was ten days. The maximum viral load was observed between the first and third day of onset. It was detected viraemia after defervescence in all clinical forms. Platelet levels were lower in primary infections, with the lowest values between the fifth and the seventh day after the onset of symptoms. Moreover the aspartate amino transferase (AST) values were higher than alanine amino transferase (ALT) in samples collected until the eighth day, in secondary infections, and in the dengue fever complicated clinical form. ALT abnormal values were present for a longer period. In the first samples of each patient collected in the febrile period, the viraemia levels were higher in more severe forms (dengue hemorrhagic fever and dengue fever complicated) than in dengue fever ($p < 0.0001$). It wasn't possible to predict with accuracy the dengue severity through the viral load and viraemia in the analyzed samples.

Keywords: Dengue. Viraemia. Viral load. PCR. Dengue hemorrhagic fever. Transaminases. Platelet. Hematocrit.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Transmissão do vírus da dengue pelo <i>Aedes aegypti</i> .	21
Figura 2	Organização do genoma dos flavivírus e suas proteínas resultantes.	23
Figura 3A	Partícula imatura do vírus dengue.	24
Figura 3B	Representação esquemática do vírus dengue maduro.	24
Figura 4	Aumento da probabilidade de febre hemorrágica da dengue em áreas de hiperendemicidade.	30
Figura 5	Curva de Amplificação da PCR em tempo real.	39
Figura 6	<i>Molecular beacon</i> .	40
Figura 7	PCR em tempo real baseada no sistema TaqMan [®] .	41
Figura 8	Molécula de SYBR Green entre a fita dupla de DNA.	42
Figura 9	Curva padrão da reação de PCR em tempo real.	43
Figura 10	Curva de dissociação da PCR em tempo real com SYBR Green.	44
Figura 11	Curva padrão - kit DSSS-P26.	67
Figura 12	Curva padrão – kit DSSS-P29.	67
Figura 13	Curva de Amplificação – kit DSSS-P26.	68
Figura 14	Curva de Amplificação – kit DSSS-P29.	69
Figura 15	Curva de dissociação – kit DSSS-P26.	71
Figura 16	Curva de dissociação – kit DSSS-P29.	72
Figura 17	Curva de dissociação do kit DSSS-P26 mostrando amplificação de amostra negativa.	73
Figura 18	Curva de dissociação do kit DSSS-P29 mostrando ausência de amplificação na amostra negativa.	73
Figura 19	Probabilidade acumulada de tempo de duração da viremia estratificado por tipo de infecção.	77
Figura 20	Probabilidade acumulada de tempo de duração da viremia estratificado pelas formas clínicas da dengue.	77
Figura 21	Média do logaritmo da carga viral (cópias/ml) segundo os dias de início de sintomas.	78

Figura 22	Curva de cinética de viremia segundo o tipo de infecção.	78
Figura 23	Curva de cinética de viremia segundo as formas clínicas da dengue.	79
Figura 24	Acompanhamento do nível de plaquetas médio ao longo dos 15 dias de início dos sintomas.	80
Figura 25	Correlação da carga viral e níveis de plaquetas.	81
Figura 26	Acompanhamento dos níveis médios de plaquetas ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo o tipo de infecção.	81
Figura 27	Níveis de plaquetas iniciais segundo o tipo de infecção.	82
Figura 28	Acompanhamento dos níveis médios de plaquetas ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo as formas clínicas da dengue.	82
Figura 29	Níveis médios de plaquetas segundo as formas clínicas.	83
Figura 30	Acompanhamento do nível de hematócrito médio ao longo dos 15 dias de início dos sintomas.	84
Figura 31	Correlação da carga viral e níveis de hematócrito nas amostras coletadas na fase aguda da doença.	84
Figura 32	Acompanhamento do nível médio de TGO (transaminase glutâmico oxalacética) ao longo dos 15 dias de início dos sintomas.	85
Figura 33	Acompanhamento do nível médio de TGP (transaminase glutâmico pirúvica) ao longo dos 15 dias de início dos sintomas.	86
Figura 34	Correlação da carga viral e níveis de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) nas amostras coletadas na fase aguda.	86
Figura 35	Correlação da carga viral e níveis de transaminase glutâmico pirúvica (TGP) nas amostras coletadas na fase aguda.	87
Figura 36	Acompanhamento do nível médio de TGO ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo a forma clínica da doença.	88
Figura 37	Acompanhamento do nível médio de TGP ao longo dos 15 dias de início dos sintomas segundo o tipo de infecção.	88
Figura 38	Acompanhamento do nível médio de TGO ao longo dos 15 dias de início dos sintomas segundo a forma clínica da doença.	89
Figura 39	Acompanhamento do nível médio de TGP ao longo dos 15 dias de início dos sintomas segundo a forma clínica da doença.	89

Figura 40	Correlação da carga viral com o tipo de infecção.	91
Figura 41	Correlação da carga viral com as formas clínicas da doença.	92
Figura 42	Correlação da carga viral com as formas clínicas da doença, agrupando as formas mais graves.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das amostras quanto ao tipo de infecção e forma clínica da dengue.	56
Tabela 2	Características dos iniciadores utilizados para detecção do vírus dengue sorotipo 3 nos kits DSSS-P26 e DSSS-P29.	60
Tabela 3	Valores referenciais de transaminases de acordo com o laboratório onde a determinação foi realizada, o sexo e o método empregado.	62
Tabela 4	Especificidade e eficiência dos kits DSSS-P26 e P29.	66
Tabela 5	Amostras positivas para infecção pelo vírus dengue de acordo com o teste diagnóstico e sua correlação com o número de dias de início dos sintomas - kits DSSS-P26 e DSSS-P29.	70
Tabela 6	Cálculo da sensibilidade e especificidade clínicas para os kits DSSS-P26 e DSSS-P29.	71
Tabela 7	Amostras Positivas para infecção pelo Vírus Dengue de acordo com o teste diagnóstico e sua correlação com o número de dias de início dos sintomas – kit DSSS-P29.	74
Tabela 8	Distribuição dos indivíduos estudados segundo sexo, diagnóstico e tipo de infecção.	75
Tabela 9	Características dos pacientes no estudo (idade e tempo de início dos sintomas).	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i>
ALT	Alanina aminotransferase (transaminase glutâmico pirúvica/TGP)
AST	Aspartato aminotransferase (transaminase glutâmico oxalacética /TGO)
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
C _t	<i>Cycle Threshold</i>
D	Dengue
DALYs	<i>Disability-adjusted life years</i>
DC	Dengue clássica
DCC	Dengue clássica complicada
DENV	Dengue vírus
DENV-1	Dengue vírus sorotipo 1
DENV-2	Dengue vírus sorotipo 2
DENV-3	Dengue vírus sorotipo 3
DENV-4	Dengue vírus sorotipo 4
dNTP	Desoxinucleotídeo 5'-trifosfato
DSSS	<i>Dengue Serotype-Specific SYBR Green</i>
DTT	Ditiotreitol
ECP	Efeito citopático
ELISA	Enzimaimunoensaio
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
G	Guanina
HI	Inibição da hemaglutinação
IF	Imunofluorescência

IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMIP	Instituto Materno Infantil de Pernambuco
LaViTE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
MAC-ELISA	Enzimaímunensaio de captura para IgM
NPT	Núcleo de Plataforma Tecnológica
NTC	<i>Non template control</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RE	Retículo endoplasmático
RIA	Radioímunoensaio
RNA	Ácido ribonucléico
ROX	<i>6-carboxy-X-rhodamine</i>
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SCD	Síndrome do choque da dengue
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética (Aspartato aminotransferase/ AST)
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica (Alanina aminotransferase/ALT)
T _m	<i>Melting temperature</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos epidemiológicos da dengue	19
1.2 O vírus dengue	23
1.3 Patologia da dengue	26
1.4 Diagnóstico Laboratorial	31
1.4.1 Isolamento Viral	33
1.4.2 Detecção de Anticorpos	34
<i>1.4.2.1 Teste de Inibição da Hemaglutinação</i>	34
<i>1.4.2.2 Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT)</i>	34
<i>1.4.2.3 Enzaimunoensaio (ELISA)</i>	35
1.4.3 Detecção de antígenos	36
1.4.4 Detecção molecular do vírus dengue	36
<i>1.4.4.1 Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)</i>	37
<i>1.4.4.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	38
2 JUSTIFICATIVA	46
3. PERGUNTA CONDUTORA	48
4 HIPÓTESE	50
5 OBJETIVOS	52
5.1 Objetivo Geral	53
5.2 Objetivos específicos	53
6 MATERIAIS E MÉTODOS	54
6.1 Tipo de estudo	55
6.2 Seleção e processamento das amostras	55

6.3 Diagnóstico Sorológico	57
6.4 Purificação de RNA	58
6.5 Transcrição Reversa	58
6.6 PCR em tempo real	58
6.7 Isolamento viral	60
6.8 Transcrição Reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	60
6.9 Análise da associação entre o nível de carga viral e a forma clínica da doença	61
6.10 Análise da associação entre carga viral e contagem de plaquetas no sangue, percentual de hemoconcentração e níveis de transaminases	61
6.11 Análise Estatística	62
6.12 Considerações éticas	63
7 RESULTADOS	64
7.1 Validação dos kits de amplificação baseados em SYBR Green com iniciadores sorotipo-específicos para dengue	65
7.1.2 Determinação da especificidade, eficiência e limite de detecção dos kits DSSS-P26 e DSSS-P29	65
7.1.3 Determinação da especificidade e sensibilidade clínicas	70
7.1.4 Escolha do kit para o estudo da cinética de viremia	72
7.2 Determinação de carga viral com o uso do kit DSSS-P29	74
7.3 Análise descritiva do estudo da cinética de viremia	75
7.4 Determinação da cinética de viremia	76
7.5 Associação entre carga viral e tipo de infecção	78
7.6 Associação entre carga viral e formas clínicas	79
7.7 Associação entre carga viral e os níveis de plaquetas	80
7.8 Associação entre carga viral e os níveis de hematócrito (% de hemoconcentração)	83
7.9 Associação entre carga viral e os níveis de transaminases	85
7.10 Análise de correlação da carga viral das amostras utilizadas na validação do kit DSSS-P29 com o tipo de infecção e as formas clínicas	90
7.10.1 Análise de correlação da carga viral com o tipo de infecção	90

7.10.2 Análise de correlação da carga viral com as formas clínicas da doença	91
8 DISCUSSÃO	93
8.1 Viremia e plaquetas	99
8.2 Viremia e hematócrito	99
8.3 Viremia e transaminases	100
9 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICES	118
Apêndice A – Artigo de Revista 1 – (Em preparação) -Validation of Dengue Serotype Specific Sybr Green Kits DSSS-P26 and DSSS-P29 for the Diagnosis and Quantification of Dengue Virus Type 3 Infection.	119
Apêndice B – Artigo de Revista 2 – (Em preparação) – Estudo de Cinética de Viremia do Vírus Dengue Sorotipo 3 em Formas Clínicas da Dengue com Diferentes Níveis de Gravidade.	136
ANEXOS	157
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CPqAM/FIOCRUZ	158

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da dengue

A dengue é uma doença causada por um arbovírus que é transmitido ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* considerado seu principal vetor (LIGON, 2004).

Infeções pelo vírus dengue (DENV) são responsáveis por altos índices de morbidade na maioria das áreas tropicais e subtropicais da Ásia, Oceania, África e Américas (GUBLER, 1997; GUZMÁN; KOURI, 2004), sendo um problema de saúde pública, distribuindo-se em mais de 100 países e acometendo cerca de 2,5 bilhões de pessoas. Estima-se que ocorram anualmente cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue clássica (DC) e centenas de milhares de casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) pelo mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). Em termos de anos potenciais de vida perdidos ajustados para incapacidade (*disability-adjusted life years*, DALYs), uma morte por dengue representa 28 DALYs (CATTAND et al., 2006).

Os relatos de uma epidemia semelhante à dengue por volta dos anos 1789 – 1790, ocorrida em Batavia (Jakarta), Cairo e Filadélfia, indicam que a distribuição global da dengue tem existido por mais de 200 anos (MAIHURU, 2004). Até a Segunda Guerra Mundial, as pandemias de dengue aconteciam a cada 10-30 anos e não era freqüente a ocorrência de epidemia em uma mesma localidade. Durante e após a Segunda Guerra Mundial, este padrão epidêmico sofreu alterações. Mudanças ecológicas decorrentes do incremento da atividade econômica e urbanização no sudeste da Ásia nesta época criaram condições ideais para o aumento da transmissão de doenças, cujos vetores são mosquitos, montando o cenário onde a pandemia global de dengue foi iniciada (GUBLER, 1998; RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

Apesar da elevada transmissão epidêmica e hiperendemicidade (co-circulação de múltiplos sorotipos da dengue), a epidemia de febre hemorrágica da dengue manteve-se localizada no Sudeste da Ásia, devido principalmente aos programas de erradicação do *Aedes aegypti* nas Américas, para controle da febre amarela urbana, nas décadas de 50 e 70 (GUBLER, 2002;

RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Esse programa, coordenado pela Organização Panamericana da Saúde (OPAS) foi finalizado no início dos anos 70. Ao final dessa década, o *Aedes aegypti* reinfestou a maioria dos países americanos (GUBLER, 2002). O número de países com epidemia de dengue aumentou significativamente entre os anos 80 e 90, à medida que novos sorotipos e diferentes genótipos do vírus foram introduzidos (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Essa reinfestação de regiões por *Aedes aegypti*, e a introdução de novos sorotipos em populações susceptíveis são claros presságios do aumento de transmissão (HALSTEAD, 1997). Atualmente a doença é mais prevalente do que em anos anteriores, e sua prevalência tem aumentado a cada ano (GIBBONS; VAUGHN, 2002). A dengue é considerada um dos melhores exemplos de doença infecciosa viral emergente e reemergente (GUZMÁN, 2005).

Na América Latina, a reemergência da dengue ocorreu durante os anos 60 no Caribe e Venezuela, e nos anos 70 na Colômbia (GUZMÁN; KOURI, 2003).

As áreas urbanas do Brasil permaneceram livres do *Aedes aegypti* até 1976. Com o ressurgimento do mosquito, deu-se início a uma onda de epidemias começando em 1981, em Roraima, com isolamento dos sorotipos 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4). Em 1986, ocorreu uma epidemia de DENV-1 no Rio de Janeiro, seguida da introdução do DENV-2 (1990) e DENV-3 (2000), resultando na circulação endêmica e epidêmica do vírus por todo o país. Atualmente, os sorotipos 1, 2 e 3 do vírus dengue circulam simultaneamente em 22 dos 27 estados do Brasil (SIQUEIRA, 2005).

Existe atualmente o risco da introdução do sorotipo 4 no Brasil (CORDEIRO, 2008). Esse risco é aumentado pela existência de DENV-4 em países da América do Sul, como Venezuela e a Colômbia (GUZMÁN; KOURI, 2002). Apesar de ter sido relatado por Figueiredo et al. (2008) a detecção de DENV-4 em três pacientes residentes na cidade de Manaus, Amazonas, no período de janeiro de 2005 a junho de 2007, estes achados não foram, até o momento, confirmados pelo Ministério da Saúde.

Em Pernambuco, o primeiro surto de dengue ocorreu em 1987, controlado no mesmo ano, graças às medidas de controle do vetor. Em 1995, uma nova epidemia ocorreu com a introdução do DENV-2. Em 2002, o DENV-3 foi introduzido, e atualmente, os três sorotipos estão circulando no estado (CORDEIRO, 2007b).

A incidência de dengue varia com o período chuvoso e aumento de temperatura. Historicamente, casos de dengue têm sido registrados, predominantemente, nas populações

urbanas, onde a alta densidade demográfica e a curta distância para vôo do vetor são condições que favorecem a transmissão viral (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005; HALSTEAD, 1997). Numerosos fatores têm sido propostos na iniciação e manutenção de uma epidemia: a cepa do vírus, a densidade vetorial, comportamento e competência da população do mosquito vetor, a susceptibilidade da população humana (fatores genéticos e imunidade pré-existente) e a introdução do vírus dentro de uma comunidade receptiva (MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000).

O *Aedes aegypti* está estreitamente ligado ao habitat humano. As larvas são encontradas principalmente em água estagnada contida em recipientes plásticos, pneus, vasos de plantas, latas, cisternas, bromélias, buracos em árvores, troncos de palmeiras (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). O mosquito é mais ativo durante o dia, com picos de atividade entre 2 e 3 horas após o nascer do dia e algumas horas antes do anoitecer. As fêmeas desse mosquito são as responsáveis pela transmissão e dispersão de vários sorotipos e um único mosquito, se infectado, pode infectar várias pessoas (GUBLER, 1998). O mosquito se infecta ao ingerir sangue de um indivíduo durante o período de viremia (cerca de 5 dias) e pode transmitir a doença para um indivíduo susceptível depois de um período de incubação extrínseca de 8 a 12 dias (Figura 1) (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Uma vez infectado, o mosquito transmite o vírus pelo resto de sua vida (HALSTEAD, 2008).

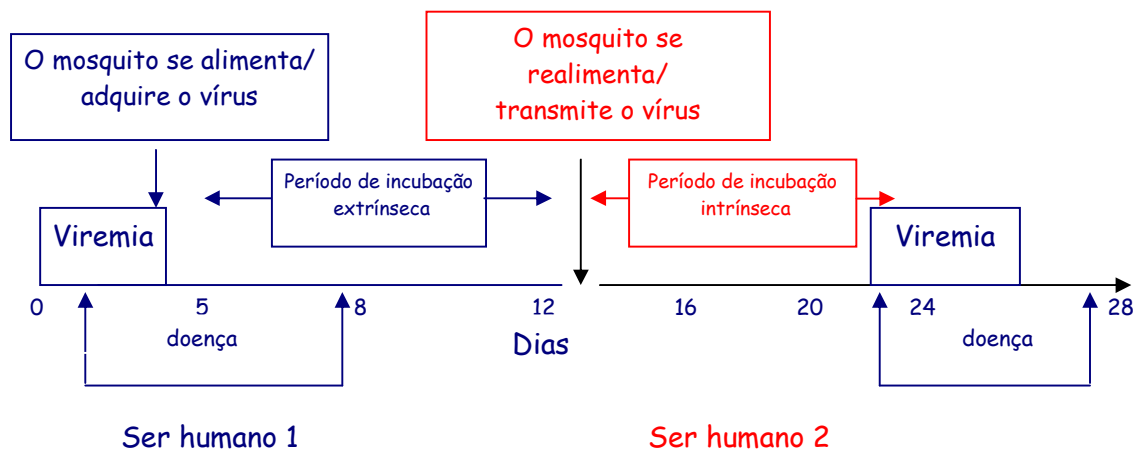


Figura 1 - Transmissão do vírus da dengue pelo *Aedes aegypti*.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2008).

Após um período de incubação intrínseca, que pode variar de 3 a 14 dias (média de 4 a 7 dias), uma pessoa picada por um mosquito infectante pode apresentar os sintomas agudos de febre, acompanhados por uma variedade de sinais e sintomas não específicos. Durante esse período febril agudo, que pode durar de 3 a 10 dias, os vírus dengue circulam no sangue periférico (GUBLER, 1998). A quantidade de vírus no sangue é crucial para o sucesso da infecção. No entanto, não se conhece o nível de viremia necessário para transmissão do vírus (HALSTEAD, 2008).

Não existe um tratamento específico para dengue. O tratamento recebido pelos pacientes é de suporte e inclui repouso, antipiréticos, analgésicos e antieméticos. Em casos mais graves deve ser adicionada a reposição de fluidos e eletrólitos para correção de fluidos perdidos e acidose (BRASIL, 2002).

O controle ou prevenção da dengue e febre hemorrágica da dengue envolve o combate ao mosquito vetor, que tem se mostrado ineficiente, sendo de difícil sustentação em longo prazo e de alto custo. A implementação de sistemas eficazes de vigilância e o desenvolvimento de uma vacina efetiva são consideradas ações prioritárias pela Organização Mundial da Saúde (LIGON, 2004).

A falta de um modelo animal para dengue tem sido um obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina (GIBBONS; VAUGHN, 2002). Embora alguns modelos estudados, como o modelo de rato “humanizado”, mostrem alguns sintomas da dengue, tais como, febre, exantema e trombocitopenia, eles falham em simular os sintomas da febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue (SCD) (PANG; CARDOSA; GUZMÁN, 2007). Vacinas contra dengue devem ser testadas quanto à segurança e eficácia, imunizando contra os quatro sorotipos (vacina tetravalente) e evitando o fenômeno de imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos, o que ainda demanda vários anos de pesquisa, inclusive o tempo necessário para a realização dos testes em seres humanos (CORDEIRO, 2008; FIGUEIREDO, 1999).

Enquanto não houver uma vacina efetiva disponível para a população, o controle efetivo do mosquito, envolvendo a comunidade e a vigilância epidemiológica laboratorial são as melhores estratégias para prevenir epidemias de dengue e reduzir o impacto social de FHD/SCD (DE SIMONE et al., 2004).

1.2 O vírus dengue

O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e é representado por quatro sorotipos antigênicos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). A partícula viral é icosaédrica, coberta por um envelope lipídico contendo proteínas do envelope e da membrana (ROTHMAN, 2004).

O vírus se liga às células hospedeiras permissivas via endocitose mediada por receptor. É consenso geral que células da linhagem fagocítica mononuclear (monócitos, macrófagos e células dendríticas) são alvos primários *in vivo*. A internalização e acidificação no endossomo e fusão das membranas viral e vesicular permitem a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma e desempacotamento do genoma. Em seguida, tem início a replicação do genoma e montagem de novas partículas virais (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

O genoma viral (RNA fita simples de polaridade positiva, com 10,2 kb) tem uma única janela aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), codificando uma poliproteína (Figura 2), que após processamento origina três proteínas estruturais (capsídeo, membrana e envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (ROTHMAN, 2004).

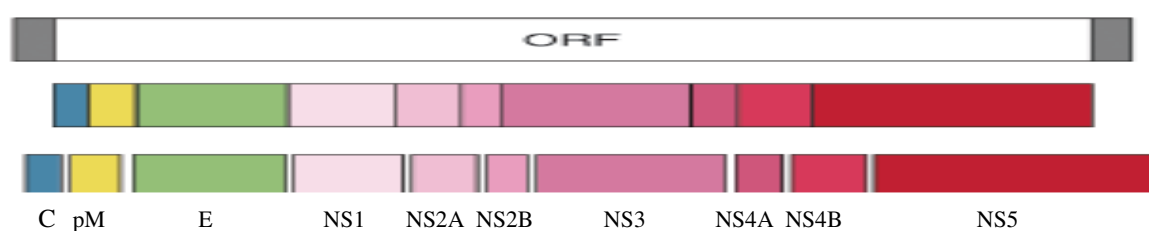


Figura 2 - Organização do genoma dos flavivírus e suas proteínas resultantes.

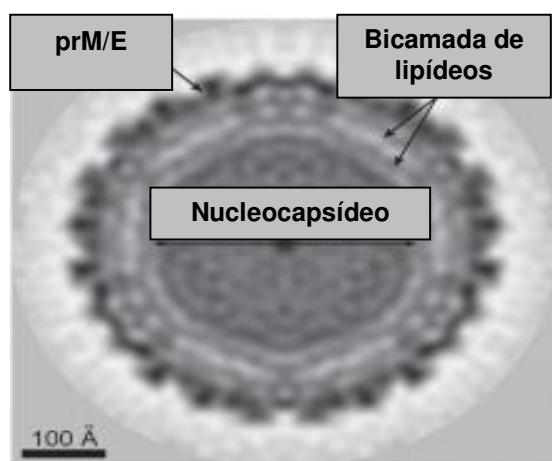
Fonte: Rothman (2004).

A proteína C (proteína do capsídeo) tem um peso molecular em torno de 13,5 kDa e é o primeiro polipeptídeo sintetizado durante a tradução. Possui uma alta proporção de aminoácidos básicos que parece neutralizar a carga negativa da molécula de RNA viral com a qual está associada (CHANG, 1997).

Duas formas de proteínas M têm sido caracterizadas: prM (pré-membrana) contida em vírions intracelulares imaturos (Figura 3a) e a proteína M (membrana) contida em vírions maduros

extracelulares (Figura 3b). A clivagem específica de prM (22 kDa) durante a maturação viral resulta na formação da proteína M (8 kDa). Esta clivagem parece preceder a liberação do vírus da célula e ser um evento terminal na morfogênese do vírion, resultando na reorganização da estrutura superficial do vírus para exposição do domínio de ligação do receptor E, e conseqüente aumento da infectividade viral (HENCHAL; PUTNAK, 1990; YU et al., 2008). Acredita-se que a prM proteja a proteína E da reorganização induzida por pH e fusão prematura durante a secreção, servindo, possivelmente, como uma chaperona para empacotamento apropriado e montagem da proteína E na superfície do vírus (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

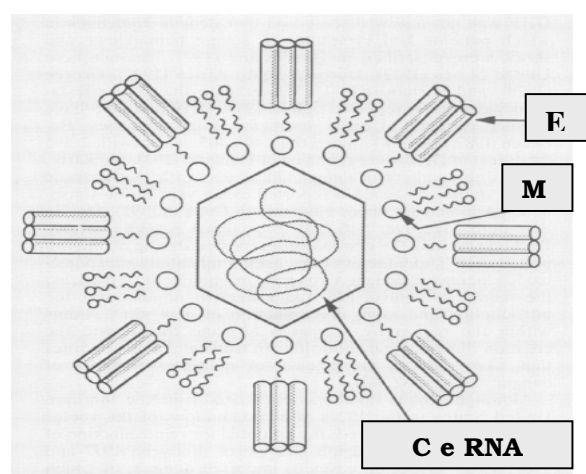
A glicoproteína do envelope (E) é a maior proteína do envelope do vírus (51-60 kDa), tem um papel chave em importantes processos, incluindo ligação ao receptor, hemaglutinação de células sanguíneas, indução de resposta imune protetora, fusão específica de membrana e montagem viral (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Todos os flavivírus têm um grupo de epítomos comum na proteína do envelope que resulta em reações cruzadas em testes sorológicos (GUBLER, 1998). Proteínas E do vírus dengue são glicosiladas diferentemente, de acordo com o sorotipo e as células em que o vírus é propagado. A glicosilação de E tem sido relacionada com a ligação ao receptor e fusão endossomal (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).



3A

Figura 3A – Partícula imatura do vírus dengue.

Nota: Crio-elétron microscopia, mostrando as glicoproteínas prM e E, a bicamada lipídica e o nucleocapsídeo. Fonte: Yu et al. (2008).



3B

Figura 3B - Representação esquemática do vírus dengue maduro.

Nota: E, proteína do envelope; M, proteína associada à membrana; C, proteína do capsídeo. Fonte: Henchal e Putnak (1990)

A glicoproteína NS1 (46 kDa) atua na fase precoce da infecção viral (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008) e é expressa em três formas: uma forma residente no retículo endoplasmático (RE) que co-localiza com o complexo de replicação viral, uma forma ancorada na membrana e uma forma secretada (sNS1) (LINDENBACH; RICE, 2003). Essa forma secretada, assim como a glicoproteína E, é um alvo dominante da imunidade humoral e pode ter um papel significativo na patogênese da doença (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A proteína NS2A (22 kDa), uma das pequenas proteínas não estruturais (NS2A, NS2B, NS4A e NS4B), é requerida para o apropriado processamento proteolítico de NS1. A proteína NS2B (14,5 kDa) está envolvida na função protease do complexo NS2B-NS3 (CHANG, 1997).

Das proteínas não estruturais, a melhor caracterizada é a NS3 (70 kDa). Ela tem sido implicada na interação com a proteína de ligação do receptor nuclear humano, que modula o tráfego intracelular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi; possui atividade de helicase e de protease. Epítomos de NS3 são comumente encontrados no repertório de linfócitos T citotóxicos específicos contra o vírus dengue (CHANG, 1997; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

As proteínas NS4A (16 kDa) e NS4B (27 kDa) estão implicadas na localização apropriada de proteínas virais e montagem do vírion (LINDENBACH; RICE, 2003). Tem sido citada a capacidade de NS4A, juntamente com NS2A, de bloquear a tradução de sinal mediada por interferon (IFN). NS4 é um potente inibidor de sinalização de interferon β (IFN- β) e interferon γ (IFN- γ) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Tem sido sugerido que NS2A, NS4A e NS4B servem para ancorar a replicase viral às membranas celulares (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008).

A proteína NS5 (105 kDa) é a maior e mais conservada proteína entre as proteínas dos *Flavivirus*. Ela serve como RNA polimerase viral RNA-dependente. NS5 também pode induzir a transcrição e tradução de interleucina-8 (IL-8) (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2003).

A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares. A montagem do vírion ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE) quando as proteínas estruturais e RNA recém sintetizados ocupam o lúmen do RE. As partículas virais imaturas e partículas subvirais, ambas não infecciosas, são transportadas pela rede trans-Golgi. Partículas virais imaturas são clivadas pela furina protease do hospedeiro, resultando em partículas maduras (infecciosas). Partículas subvirais também são clivadas pela furina e juntamente com as partículas maduras são subsequentemente liberadas por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Além de serem classificados em 4 sorotipos, de acordo com a variabilidade antigênica, baseada na capacidade de neutralização do vírus pelo soro, também é possível classificar o vírus dengue em genótipos, baseando-se na variação genômica entre os sorotipos. Essas diferenças genotípicas parecem estar associadas com a diferença na virulência (KURANE; TAKASAKI, 2001; PIRES NETO et al., 2005). A classificação genética depende da região do genoma estudada, do método e da análise utilizados no estudo (CORDEIRO, 2008).

Através de análises filogenéticas e epidemiológicas tem se buscado demonstrar se existem genótipos que possam estar associados às formas graves, enquanto outros causem apenas a forma clássica da doença (RICO-HESSE, 2003). A caracterização molecular de amostras virais associadas às epidemias, determinação da variabilidade genética, padrões de transmissão destas cepas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias efetivas no controle da doença (CORDEIRO, 2008).

1.3 Patologia da dengue

A infecção pelo vírus dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde formas clinicamente assintomáticas até quadros graves, acompanhados por hemorragias e choque, que podem evoluir para o óbito (LIGON, 2004). A dengue clássica caracteriza-se por uma febre abrupta, geralmente alta (39-40°C), associada à cefaléia, prostração, mialgia, artralgia, dor retroorbitária, exantema maculopapular acompanhado ou não, de prurido. Anorexia, náuseas, vômitos e diarreia também podem ser observados (RIGAU-PÉREZ, 2002).

A forma mais grave da doença é a febre hemorrágica da dengue / síndrome do choque da dengue, caracterizada pelo desenvolvimento de extravazamento plasmático, anormalidades de coagulação e comprometimento hepático (ROTHMAN, 2004).

Todos os quatro sorotipos do vírus dengue podem causar desde formas assintomáticas até as formas mais graves da doença. A infecção com um sorotipo induz imunidade permanente específica ao sorotipo infectante, conferindo apenas uma curta imunidade cruzada (heterotípica) para os outros sorotipos, o que possibilita às pessoas que vivem em áreas hiperendêmicas, onde

circulam múltiplos sorotipos do vírus dengue, serem infectadas com os quatro sorotipos durante sua vida (GUBLER, 1998; SABIN, 1952).

Três importantes sistemas do organismo (hematológico, vascular e hepático) estão envolvidos nas alterações patológicas da FHD/SCD. A disfunção desses sistemas induzida pela infecção pelo vírus dengue, tanto direta como indiretamente, causa as manifestações da FHD/SCD (LEI, 2001).

O extravazamento plasmático, conseqüência do aumento da permeabilidade vascular e evidenciado através da hemoconcentração e/ou derrame pleural ou peritoneal, é o principal fator patogênico, resultando nas formas mais graves, com hipotensão e choque, algumas vezes acompanhados de coagulação intravascular disseminada e hemorragia, o que caracteriza a síndrome de choque da dengue (LEI, 2001; ROTHMAN, 2004). O extravazamento plasmático geralmente se torna evidente entre o terceiro e o sétimo dia da doença. Estudos histológicos de vasos sangüíneos de casos fatais não revelam destruição de células endoteliais, demonstrando que o extravazamento plasmático é provavelmente provocado mais por danos funcionais do que anatômicos nestas células (ROTHMAN; ENNIS, 1999).

A tendência a sangramentos está relacionada com fragilidade capilar e acentuada trombocitopenia (ROTHMAN; ENNIS, 1999). Os valores mais baixos de plaquetas são tipicamente coincidentes com extravazamento plasmático; trombocitopenia também ocorre em significativa porcentagem de pacientes com DC. Como o declínio na contagem de plaquetas geralmente ocorre antes do extravazamento plasmático, esse parâmetro tem sido muito útil na decisão de hospitalizar o paciente predisposto à FHD (ROTHMAN, 2004; SRICHAIKUL NIMMANNITYA, 2000).

A patogênese da trombocitopenia observada em DC e FHD é explicada pela produção diminuída (supressão da medula óssea), destruição periférica aumentada (mediada pelo sistema imune) e utilização aumentada das plaquetas (consumo na coagulopatia). Além da trombocitopenia, uma outra importante alteração observada na FHD é a disfunção das plaquetas, devido ao acionamento do mecanismo de agregação plaquetária na fase aguda da doença (SRICHAIKUL; NIMMANNITYA, 2000). Também tem sido sugerida a existência de anticorpos direcionados contra a proteína NS1 do vírus dengue que reagiriam com plaquetas e células endoteliais (hipótese auto-imune). Essa hipótese é corroborada pelo achado de maiores títulos de anticorpos anti-plaquetas em pacientes com FHD do que em pacientes com DC (HALSTEAD, 2007).

As alterações hepáticas observadas na dengue podem ser resultadas de um efeito direto do vírus sobre as células hepáticas ou consequência de uma resposta imune do hospedeiro contra o vírus (SENEVIRATNE; MALAVIGE; SILVA, 2006).

O envolvimento hepático na dengue é demonstrado por hepatomegalia e níveis de transaminases elevados (ROTHMAN; ENNIS, 1999). Embora o fígado não seja o órgão alvo principal do vírus dengue, alterações importantes como necrose focal central e paracentral, hipertrofia das células de Kupffer e corpúsculos de Councilman, que parecem corresponder à necrose dos hepatócitos, têm sido relatadas em pacientes com FHD/SCD (DANTAS; PASSONI, 2003; KUO, 1992). Insuficiência hepática tem sido citada como uma das causas de encefalopatia e mortes causadas pelo vírus dengue (NGUYEN; NGUYEN; TIEU, 1997).

A hepatomegalia é mais frequente em pacientes com FHD do que naqueles com DC. A determinação dos níveis de transaminases é utilizada como marcador de avaliação de gravidade (SOUZA et al., 2007). Esses níveis também são mais elevados em pacientes com FHD e tendem a retornar ao normal dentro de 14 a 21 dias após a infecção (SENEVIRATNE; MALAVIGE; SILVA, 2006). Em infecções por dengue, elevações nos níveis de transaminase glutâmico oxaloacética (TGO, AST) têm sido maiores do que nos níveis de transaminase glutâmico pirúvica (TGP, ALT). Este padrão é diferente do encontrado nas hepatites virais, mas semelhante ao que é observado na hepatite alcoólica. O significado desse padrão de elevação de transaminases tem sido discutido. É sugerido por alguns autores que o excesso de TGO é devido ao dano aos miócitos durante a infecção (KUO, 1992).

É importante distinguir as formas benignas da dengue daquelas de maior gravidade, que requerem tratamento diferenciado. O diagnóstico precoce e o pronto atendimento são essenciais para a redução do índice de mortalidade por FHD/SCD (LIGON, 2004; ROTHMAN, 2004). Casos fatais de pacientes com síndrome do choque de dengue podem ocorrer em mais de 10% dos casos (RIGAU-PÉREZ et al., 2002).

O fato de o vírus ter provavelmente como células alvo para a replicação os monócitos, macrófagos e células dendríticas, assume relevante importância no esclarecimento dos fatores determinantes para a ocorrência da febre hemorrágica da dengue (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; HALSTEAD, 1997). Não se conhece bem a patogênese da FHD/SCD nem que condições do hospedeiro favorecem a gravidade da doença. Fatores epidemiológicos e virológicos, fatores de risco do hospedeiro, como idade, estado nutricional, sexo, doenças crônicas e raça, são fatores

de risco que fazem a doença mais freqüente em um determinado grupo (LEI, 2001; SIERRA; KOURI; GUZMÁN, 2007). O risco de FHD é mais alto quando dois ou mais sorotipos do vírus estão circulando simultaneamente (RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

Duas teorias tentam explicar a ocorrência de febre hemorrágica da dengue: a teoria da modificação de virulência, que sugere que os fatores de risco para a FHD estão mais relacionados com os genótipos oriundos de mutações e os sorotipos do vírus envolvidos na infecção (ROSEN, 1977); e a teoria das infecções seqüenciais heterotípicas, a mais aceita atualmente, que preconiza que a probabilidade de ocorrência de FHD/SCD é maior no indivíduo que sofre uma infecção secundária (seqüencial) com um sorotipo diferente de uma infecção prévia (HALSTEAD, 1970). Um dos mecanismos propostos é o favorecimento da infecção dependente de anticorpos (antibody-dependent enhancement/ADE), ou imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos, que supõe que anticorpos pré-existent reagindo cruzadamente, não neutralizariam a infecção, mas facilitariam a entrada viral em células que possuem receptores para a porção Fc da molécula de imunoglobulina. Isso pode resultar em um aumento mais rápido da intensidade da carga viral e uma maior propensão ao desenvolvimento de FHD (HALSTEAD, 1997; ROTHMAN, 2004; STEPHENSON, 2005). Estudos correlacionando a cinética de viremia, o estado de imunidade do hospedeiro e as formas clínicas da dengue são, portanto, importantes e necessários para o entendimento da patogênese da doença.

Ainda segundo Halstead (1997), a presença de anticorpos anti-dengue, adquiridos passivamente por anticorpos maternos, IgG heterotípicos, em crianças menores de um ano com infecção primária poderão predispor-las ao processo de imunoamplificação, aumentando o risco de desenvolver a forma mais grave da doença.

Em áreas de hiperendemicidade, a circulação de múltiplos sorotipos e a maior probabilidade de infecções secundárias são fatores reconhecidos de aumento da probabilidade de febre hemorrágica da dengue (Figura 4). Nessas áreas, os mecanismos propostos nas duas teorias citadas acima têm maior probabilidade de acontecer (GUBLER; TRENT, 1994).

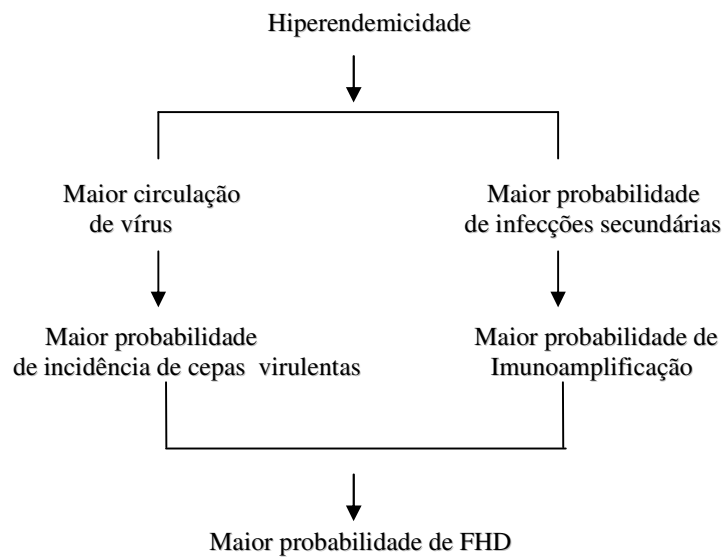


Figura 4 – Aumento da probabilidade de febre hemorrágica da dengue em áreas de hiperendemicidade.

Fonte: Gubler e Trent (1994) (traduzido).

Os critérios utilizados para a definição da forma clínica da dengue foram definidos pela Organização Mundial da Saúde (1987,1999):

a) Dengue Clássica

É uma doença febril aguda de dois a sete dias de duração (às vezes com dois picos de febre) com duas ou mais das seguintes manifestações: dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia/artralgia, erupções na pele, manifestação hemorrágica (petéquias e prova do laço positiva) e leucopenia.

b) Febre hemorrágica da dengue

Apresenta tendência hemorrágica evidenciada por uma ou mais das seguintes manifestações: prova do laço positiva, petéquias, equimose ou púrpura, sangramento de mucosa (principalmente epistaxe ou sangramento de gengivas), hematêmese ou melena, trombocitopenia (contagem de plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$) e evidência de extravazamento plasmático devido ao aumento de permeabilidade capilar, representado por hemoconcentração, que corresponde a um aumento relativo do hematócrito maior ou igual a 20% ou presença de derrame cavitário ou hipoalbuminemia.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica ainda os casos de FHD de acordo com a gravidade, em graus I a IV, como descrito a seguir:

Grau I - febre com dois ou mais dos seguintes sinais: dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia e artralgia, prova do laço positiva, contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$ e um aumento de hematócrito, maior ou igual a 20%.

Grau II - os mesmos sinais e achados laboratoriais do grau I, mais sangramentos espontâneos.

Grau III - os mesmos sinais e achados laboratoriais do grau II, mais falhas circulatórias (pulso fraco, hipotensão e agitação).

Grau IV - os mesmos sinais e achados laboratoriais, mais choque profundo com pulso e pressão indetectáveis.

A FHD de grau III e IV é também chamada de Síndrome do Choque de Dengue.

Essa classificação tem sido alvo de discussões, uma vez que foi baseada em estudos pioneiros realizados no Hospital de Crianças em Bangkok, na Tailândia, Sudeste da Ásia, nos anos 60, que definiu os padrões da doença naquela época (BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2006). Estudo realizado por Balmaseda et al. (2005) demonstrou que mais de dois terços de todos os adultos analisados, com manifestações graves da dengue, não foram classificados como febre hemorrágica da dengue, como consequência da dificuldade de atender os critérios adotados pela Organização Mundial da Saúde. Sugestões de reavaliação dos critérios, principalmente com relação à hemoconcentração para demonstração de alterações de permeabilidade têm sido propostas (RIGAU-PÉREZ, 2006).

1.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de dengue, preciso e eficiente, é importante para o cuidado clínico, suporte à vigilância, estudos de patogênese e pesquisas de vacinas, bem como confirmação de casos (DC ou FHD/SCD) e para o diagnóstico diferencial com outras doenças, como leptospirose e rubéola. O diagnóstico da infecção pelo vírus dengue é feito com base em dados clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais para detecção do vírus, de antígeno ou RNA viral e anticorpos específicos (GUZMÁN; KOURÍ, 2004).

O diagnóstico da dengue é feito em dois estágios: estágio I, com febre e viremia acompanhados de antígenos NS1 no sangue; e estágio II, o período pós-febril precoce, durando poucas semanas, quando os níveis de IgM e IgG estão elevados (HALSTEAD, 2007).

Durante a infecção primária, após início dos sintomas da doença, o vírus pode ser encontrado no soro ou plasma por aproximadamente 2 a 7 dias, correspondendo ao período de febre, fase aguda da doença (HALSTEAD, 2007; SHU; HUANG, 2004). Na infecção secundária, a duração da viremia pode ser de 2 ou 3 dias, enquanto a presença de antígenos NS1 no sangue dura mais tempo (HALSTEAD, 2007). A viremia rapidamente desaparece, seguindo-se o aparecimento de anticorpos anti-dengue (IgM), geralmente a partir do quinto dia da doença, na maioria dos pacientes, e podem persistir por 60 a 90 dias após o início da doença (CORDEIRO, 2008; KAO et al., 2005). Essa permanência de anticorpos IgM por cerca de três meses ou mais, em alguns indivíduos e o fato da maioria dos testes sorológicos não serem tipo específicos, faz com que o diagnóstico baseado na detecção de IgM em uma única amostra não seja definitivo (VORNDAM; KUNO, 1997).

Na infecção primária, anticorpos IgG surgem em poucos dias após o aparecimento de IgM (7 a 10 dias após início da doença). Em infecções secundárias, níveis elevados de IgG podem ser detectados já na fase aguda e sobem consideravelmente nas duas semanas seguintes, permanecendo elevados na maioria dos pacientes. Os níveis de IgM são mais baixos e em alguns casos durante a infecção secundária, podem estar ausentes. Os anticorpos IgM indicam uma infecção recente, enquanto altos títulos de IgG em amostras de fase aguda são um critério de infecção secundária (GUZMÁN; KOURÍ, 2002; KAO et al., 2005; VÁZQUEZ et al., 2005).

É importante considerar o período da doença em que o paciente se encontra para com isso se decidir qual o tipo mais apropriado de teste a ser utilizado e se fazer uma correta interpretação dos resultados obtidos (KAO et al., 2005).

Os métodos usuais para confirmar as infecções por dengue são isolamento viral, transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e detecção de anticorpos (IgG e IgM) anti-vírus dengue por ensaio imunoenzimático (ELISA) (KAO et al., 2005; SHU; HUANG, 2004). Também tem sido cada vez mais utilizada a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), que permite a detecção e determinação da carga viral em amostras de soro coletadas na fase aguda da doença (SHU; HUANG, 2004).

1.4.1 Isolamento Viral

O isolamento viral em cultura de células de mosquitos é largamente utilizado como método padrão ouro para o diagnóstico da infecção pelo vírus dengue, sendo considerado o mais confiável, uma vez que é a evidência direta da infecção viral (KAO et al., 2005; YAMADA et al., 2002).

Quatro sistemas de isolamento do vírus dengue têm sido utilizados: inoculação intra-cerebral em camundongos com 1 a 3 dias de nascidos; cultura de células de mamíferos (como as linhagens de células LLC-MK₂, Vero e BHK21); inoculação intra-torácica em mosquitos adultos e cultura de células de mosquito (como células AP-61, Tra-284, C6/36, AP64 e CLA-1). A inoculação de amostras diretamente em mosquitos *Toxorhynchites splendens* adultos é considerada o melhor sistema de isolamento, em termos de sensibilidade, mas infelizmente não está disponível na maioria dos países endêmicos (GUBLER, 1998; GUZMÁN; KOURÍ, 2002; SHU; HUANG, 2004).

A inoculação do soro, coletado na fase aguda, em linhagens celulares de mosquito, tais como *Aedes albopictus* (C6/36), *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) é comumente empregada para o isolamento viral (GUZMÁN; KOURÍ, 2002). Atualmente, o isolamento viral com linhagem de células C6/36 de *Aedes albopictus* tem sido o método de escolha para a rotina, por sua facilidade de manutenção e sensibilidade (IGARASHI, 1978; VORNDAM; KUNO, 1997). Neste método o soro é inoculado em cultura de células e incubado por cerca de 10 dias, período durante o qual é observada a produção de efeito citopático (ECP), como formação de sincício. Esse efeito citopático, no entanto, pode ser discretamente produzido por alguns sorotipos do vírus dengue, sendo por isso indicada a detecção do vírus através da reação de imunofluorescência com anticorpos monoclonais sorotipo-específicos (GUBLER et al., 1984; HENCHAL et al., 1982). Esse método é capaz de isolar vírus em, aproximadamente, 36% dos casos confirmados (VORNDAM; KUNO, 1997). Modificações no método, incluindo a realização do isolamento em placas de 24 poços e centrifugação têm sido utilizadas com o objetivo de aumentar essa sensibilidade, sobretudo em amostras de pacientes com baixos títulos do vírus (CACEDA; KOCHER, 2007).

1.4.2 Detecção de Anticorpos

1.4.2.1 *Teste de Inibição da Hemaglutinação*

O teste de hemaglutinação é o teste padrão utilizado pela OMS para a confirmação e classificação sorológica da infecção pelo vírus dengue (VORNDAM; KUNO, 1997). O ensaio é baseado na habilidade dos anticorpos de inibir a aglutinação de hemácias de ganso ou hemácias humanas do grupo sanguíneo “O” pela glicoproteína do vírus dengue (CLARK; CASALS, 1958).

Baseando-se no teste de inibição da hemaglutinação, a infecção é caracterizada como primária na ausência de anticorpos inibidores da hemaglutinação ($<1:20$) na amostra de soro de fase aguda, coletada antes do quarto dia de doença e presença de anticorpos na amostra de soro da fase de convalescença com título $< 1:1280$; e é considerada como secundária, quando há presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação ($>1:20$) na amostra de soro de fase aguda, coletada antes do quarto dia de doença e detecção de anticorpos com títulos $\geq 1:2560$ na amostra de soro da fase de convalescença, com aumento de, no mínimo, quatro vezes no título de anticorpos inibidores da hemaglutinação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987). Entretanto, esse teste apresenta reações cruzadas com outros flavivírus e são necessárias duas amostras obtidas nas fases aguda e de convalescença (KAO et al., 2005; YAMADA et al., 2002).

1.4.2.2 *Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT)*

O teste de neutralização por redução de placa (PRNT) é o ensaio sorológico mais sensível e específico utilizado para o diagnóstico do vírus dengue (DE PAULA; FONSECA, 2004). É usado, principalmente, para determinar o sorotipo do vírus dengue responsável pela infecção e para medir a imunidade após a vacinação contra vírus em geral. Nesse teste, diluições da amostra de soro do paciente são incubadas com quantidades definidas do vírus. O resultado é dado com referência ao título onde há a mais alta diluição do soro que reduz o número de placas de 50 a

90% (VORNDAM; KUNO, 1997). Um aumento de 4 vezes, ou mais, nos títulos entre as fases aguda e de convalescença indica uma infecção corrente (KAO et al., 2005).

O teste de neutralização por redução de placa é especialmente útil em infecções primárias de dengue, durante o início da convalescença, porque os anticorpos neutralizantes detectados são relativamente monotípicos para o vírus infectante. Em infecções secundárias, são produzidos altos títulos de anticorpos neutralizantes para dois ou mais dos quatro sorotipos de dengue. Em algumas combinações de infecções sequenciais, o título mais alto de anticorpos neutralizantes no soro do paciente convalescente é dirigido contra o vírus que infectou o paciente anteriormente (não o vírus da infecção atual), fenômeno denominado de “pecado original antigênico” (HALSTEAD; ROJANASUPHOT; SANGKAWIBHA, 1983; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

1.4.2.3 Enzimaimunoensaio (ELISA)

O método enzimaimunoensaio (ELISA) é o mais amplamente utilizado na rotina para detecção de imunoglobulinas IgG e IgM pela alta sensibilidade apresentada e facilidade de uso.

A técnica imunoenzimática de captura de IgM (MAC-ELISA) é o teste mais útil para a vigilância epidemiológica da dengue e FHD/SCD (DE PAULA; FONSECA, 2004). Em casos suspeitos de dengue, a presença de anticorpos IgM anti-dengue indica infecção recente. A detecção de IgM não é útil para a determinação do sorotipo devido à reação cruzada com outros sorotipos do vírus dengue e Flavivírus (GUZMÁN; KOURÍ, 2002).

O método ELISA para detecção de anticorpos anti-IgG é comumente usado para diferenciar os casos quanto ao tipo de infecção, primária ou secundária. Não é muito específico, apresenta reações cruzadas com outros Flavivírus e como o IgM, não permite a determinação do sorotipo. É útil em estudos soro-epidemiológicos (DE PAULA; FONSECA, 2004; KAO et al., 2005).

1.4.3 Detecção de antígenos

Apesar da possibilidade do uso de radioimunoensaio (RIA) e imunofluorescência (IF) para detecção de antígenos do vírus dengue, os mesmos não tiveram aplicação na rotina devido à baixa sensibilidade (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Alguns testes baseados em ELISA utilizando anticorpos monoclonais NS1 específicos da dengue têm sido desenvolvidos com o objetivo de detectar antígenos NS1 no sangue (DUSSART et al., 2006; SHU et al., 2003; XU et al., 2006). Através desses testes é possível estudar a cinética do aparecimento de antígenos NS1 no sangue (pico de títulos entre 6 a 10 dias após a febre), bem como a caracterização eficiente de infecções primárias e secundárias (HALSTEAD, 2007). Foi demonstrado que níveis de NS1 no plasma correlacionaram com níveis de viremia e foram mais altos em pacientes com febre hemorrágica da dengue que naqueles com dengue clássica (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Kits para determinação de NS1 encontram-se disponíveis comercialmente, com a proposta de diagnóstico precoce da dengue e tem sido usado em países como México, Colômbia e Paraguai, apesar de não ter sido adotado como padrão pela Organização Mundial de Saúde.

1.4.4 Detecção molecular do vírus dengue

Antes do emprego de técnicas moleculares, como a PCR, o diagnóstico da infecção pelo vírus dengue apresentava o problema relacionado ao tempo requerido para os resultados laboratoriais serem adquiridos: anticorpos IgM não são geralmente detectados nos primeiros dias da infecção e para o isolamento viral é necessário mais que uma semana de incubação (VORNDAM; KUNO, 1997). A PCR permite a detecção mais rápida e sensível que os métodos de isolamento viral tradicionais, uma vez que amplifica ácido nucléico mesmo de vírus inativado e não depende nem do crescimento viral nem do desenvolvimento de anticorpos (KAO et al., 2005). Várias abordagens da técnica de PCR têm sido desenvolvidas, tais como RT-PCR, *nested*-PCR e PCR em tempo real, e estão sendo utilizadas no diagnóstico da dengue.

1.4.4.1 Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Diversos protocolos de PCR têm sido descritos para a detecção do vírus dengue. Estes protocolos variam entre si quanto à localização genômica dos iniciadores, especificidade, sensibilidade e métodos para detectar os produtos da PCR e identificar os sorotipos. Dentre eles, o descrito por Lanciotti et al. (1992) tem sido largamente utilizado (GUZMÁN; KOURÍ, 2002).

Lanciotti et al. (1992) desenvolveram um ensaio de RT-PCR que permite a detecção do vírus na amostra utilizando iniciadores de consenso localizados nos genes C e prM, amplificando um fragmento de 511 pb na primeira rodada de PCR (RT-PCR convencional). Uma segunda PCR (semi-nested-PCR) com iniciadores específicos possibilita a identificação do sorotipo através da formação de produtos de DNA com tamanhos diferentes. Esta RT-PCR tem sido aplicada no diagnóstico da dengue utilizando amostras como soro, tecidos de casos fatais, *pool* de mosquitos, culturas de células infectadas e larvas de mosquitos (GUZMÁN; KOURÍ, 2002). Este sistema de RT-PCR é capaz de detectar pelo menos 100 cópias do vírus dengue presente na amostra e apresenta sensibilidades de 94% com DENV-1, 93% com DENV-2 e 100% com DENV-3 e DENV-4 quando comparado com o método de isolamento viral (KAO et al., 2005; LANCIOTTI et al., 1992).

A maior desvantagem da PCR é que ela está sujeita à contaminação com *amplicons*, podendo apresentar resultados falso-positivos. Para garantir resultados corretos, procedimentos apropriados de controle de qualidade devem ser utilizados (GUZMÁN; KOURÍ, 2002).

Tendo em vista a possibilidade de contaminação na realização da PCR devidas ao manuseio dos tubos nas duas reações, modificações na técnica de Lanciotti et al. (1992) têm sido propostas. Dentre elas pode ser citada a nested-PCR em tubo único (GOMES et al., 2007), onde os iniciadores específicos para cada sorotipo são imobilizados dentro da tampa de tubos de reação por adsorção seguida de solubilização após a primeira reação. Este formato é menos susceptível à contaminação, uma vez que elimina a necessidade de transferência de *amplicons* para um segundo tubo de reação com novos iniciadores e reagentes.

Os métodos moleculares baseados em RT-PCR têm sido ainda combinados com a cultura de células para aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo necessário para identificar os vírus cultivados (SHU; HUANG, 2004).

1.4.4.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

O método de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), uma variante da PCR, permite a detecção do número de *amplicons* gerado durante cada ciclo de amplificação no momento de sua formação (PCR cinética quantitativa) através do acompanhamento da fluorescência de corantes ou sondas específicos. Esta técnica elimina a necessidade de manipulação dos produtos gerados após amplificação e permite a utilização de sistemas automatizados de detecção, podendo detectar menos que 10 cópias de um determinado transcrito (WATZINGER; EBNER; LION, 2006). A qPCR oferece significativa melhoria em relação à PCR convencional, uma vez que os dados são coletados na fase exponencial de crescimento da reação, onde as condições são ótimas, ao invés de coletá-los no final da reação onde a quantidade de *amplicon* pode ser afetada por inibidores ou saturação por produtos de PCR (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

Na qPCR, os valores de fluorescência são registrados em cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado naquele ponto da reação de amplificação (Figura 5). O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de C_t (Cycle Threshold) e permite a quantificação exata e reprodutível. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. O C_t é proporcional ao número de cópias do alvo presente na amostra (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Quanto mais alta é a quantidade inicial do alvo, mais cedo o produto acumulado é detectado no processo de PCR, e mais baixo é o valor do C_t (DORAK, 2006).

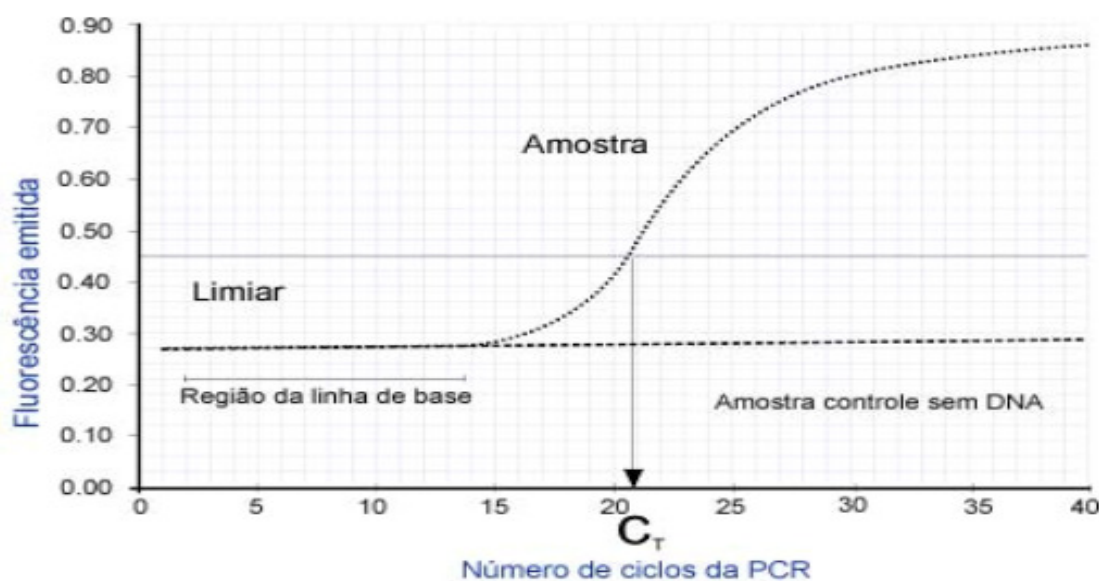


Figura 5 - Curva de Amplificação da PCR em tempo real.

Nota: C_T = Cycle Threshold.

Fonte: Novais e Pires-Alves (2004).

Existem quatro técnicas utilizadas na qPCR para detectar o produto amplificado: *molecular beacons*, sondas de hidrólise, sondas de hibridização e corantes intercalantes (BUSTIN, 2000; WATZINGER; EBNER; LION, 2006).

Molecular beacons são oligonucleotídeos usados como sondas de fita simples com seqüências flanqueadoras de 5 a 7 nucleotídeos, que formam uma estrutura secundária entre as extremidades 5' e 3', chamada de haste-e-volta (*stem-loop*). O *loop* contém uma seqüência que é complementar à seqüência-alvo e a haste é formada pelo anelamento das seqüências complementares que estão localizadas nas extremidades (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Um marcador fluorescente (fluoróforo) é ligado à uma extremidade e um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor) na outra extremidade. Quando *molecular beacons* se encontram livres em solução, não emitem fluorescência (figura 6A). No entanto, quando hibridizam com a fita de DNA contendo a seqüência-alvo, as sondas assumem uma mudança conformacional, onde o fluoróforo se dissocia do *quencher*, tornando-a capaz de emitir fluorescência (figura 6B) (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; WATZINGER; EBNER; LION, 2006). O uso de *molecular beacons* tem sido descrito com

o objetivo de diagnóstico da infecção pelo vírus dengue e de identificar a fita de RNA de polaridade negativa do vírus dengue como um indicativo de replicação molecular ativa (ANWAR; AUGUST; TOO, 2006; PARIDA et al., 2005).

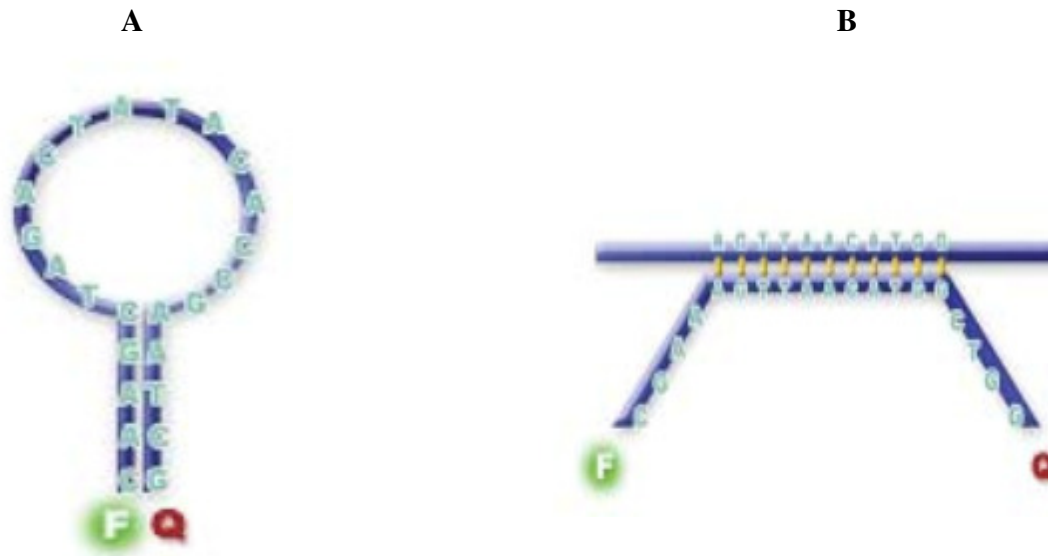


Figura 6 – Molecular Beacon.

Nota: A. Oligonucleotídeo usado como sonda é sintetizado de modo a possibilitar a formação de uma estrutura secundária nas extremidades 5' e 3'. B. Com a mudança conformacional, o fluoróforo se dissocia do quencher, ocorrendo a emissão de fluorescência.

Fonte: Novais e Pires-Alves (2004).

As sondas de hidrólise também denominadas de TaqMan[®] (Applied Biosystems) ou sondas 5' nuclease, são os ensaios mais descritos para detecção de DNA ou RNA viral (WATZINGER; EBNER; LION, 2006). TaqMan[®] é uma sonda utilizada para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade (5') um fluoróforo (molécula repórter), e na outra extremidade (3') um *quencher*, covalentemente ligados (figura 7). Quando a molécula repórter na sonda TaqMan[®] é estimulada por uma fonte de luz apropriada para emitir fluorescência, a energia é transferida para o *quencher*, suprimindo a fluorescência do repórter. Este princípio físico é conhecido como transferência de energia de fluorescência por ressonância (*Fluorescence resonance energy transfer*, FRET). Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan[®] é degradada devido à atividade exonuclease 5' → 3' da *Taq*

DNA polimerase, separando o quencher da molécula fluorescente durante a extensão. (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; WATZINGER; EBNER; LION, 2006). A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento de intensidade da fluorescência, ocorrendo a emissão de luz aumentada exponencialmente e que ocorre somente quando a sonda hibridiza e a amplificação da seqüência alvo é estabelecida (BUSTIN, 2000; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Vários ensaios de PCR em tempo real utilizando sonda TaqMan[®] têm sido desenvolvidos para o diagnóstico molecular da dengue (GOMES-RUIZ et al., 2006; ITO et al., 2004).

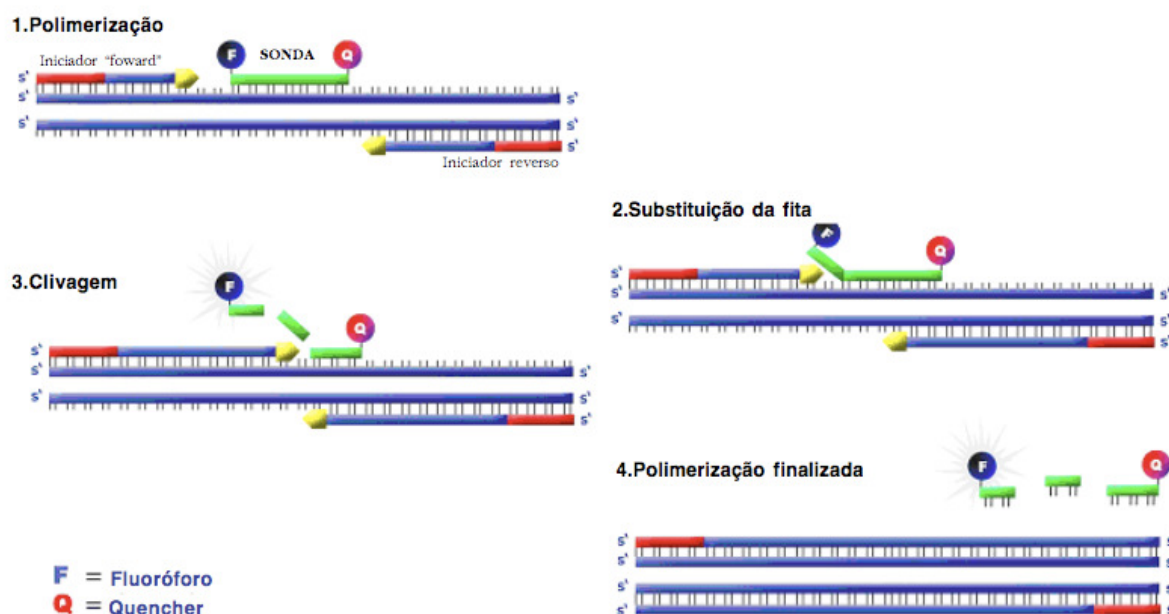


Figura 7 – PCR em tempo real baseada no sistema TaqMan[®].

Fonte: Novais e Pires-Alves (2004).

O método de hibridização de sondas, também chamado de sondas lineares, usa duas sondas de hibridização. Uma das sondas possui em sua extremidade 3' um doador de fluorescência, que emite luz verde fluorescente quando excitado por uma fonte de luz. Esta emissão de luz provoca a excitação de um fluoróforo ligado à extremidade 5' da segunda sonda. A excitação do doador resulta na transferência de energia de fluorescência por ressonância (FRET) para o aceptor e a emissão de luz vermelha fluorescente. Neste método, o sinal fluorescente é detectado apenas como um resultado da hibridização independente das duas sondas à seqüência-alvo correta e as

sondas não são hidrolisadas (BUSTIN, 2000). O desenvolvimento de sondas de hibridização para o diagnóstico da dengue tem sido citado na literatura (HOUNG; HRITZ; KANESA-THASAN, 2000), porém estas sondas não têm sido correntemente utilizadas.

Dos corantes intercalantes, o mais empregado no diagnóstico por PCR em tempo real é o SYBR Green (figura 8) devido ao seu baixo custo, uma vez que não necessita do desenho de sondas específicas, e facilidade de uso. Apesar de intercalar na molécula de fita dupla de DNA de maneira não específica, elevada especificidade é conseguida pela análise da curva de dissociação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; WATZINGER; EBNER; LION, 2006).

O SYBR Green emite 100 vezes mais luz quando excitado por uma fonte de luz apropriada. Durante as fases da PCR de anelamento e extensão, as moléculas de SYBR Green vão se ligando à fita dupla de DNA recém sintetizada. O aumento de fluorescência gerado por essa ligação é detectado em tempo real, sendo essa fluorescência proporcional à quantidade do segmento de DNA amplificado (BUSTIN, 2000; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

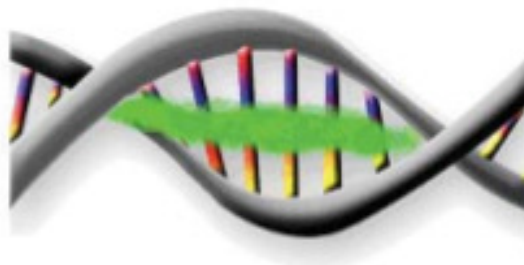


Figura 8 – Molécula de SYBR Green entre a fita dupla de DNA.

Fonte: Applied Biosystems (2003).

O ensaio de RT-PCR em tempo real utilizando SYBR Green tem a vantagem da simplicidade no desenho do iniciador e usa protocolos RT-PCR adequados para a detecção de múltiplas seqüências-alvo, embora seja teoricamente menos específico que as sondas TaqMan[®] (SHU; HUANG, 2004). Vários autores têm referido o uso de qPCR utilizando o SYBR Green no diagnóstico da dengue (CHUTINIMITKUL et al., 2005; SHU et al., 2003; YONG et al., 2007). Um estudo realizado por Gomes-Ruiz et al. (2006) demonstrou não haver diferença no desempenho do ensaio de qPCR utilizando SYBR Green e sondas TaqMan[®] para o diagnóstico de infecções pelo vírus dengue sorotipo 3.

A eficiência da amplificação da reação de PCR em tempo real deve ser de 90 a 100%, podendo ser calculada usando-se dados coletados de uma curva padrão com a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência} = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

O *slope* é o indicador da amplificação real, representa o coeficiente angular da reta composta pelos pontos da curva padrão. Uma alta eficiência está associada à inclinação de aproximadamente 3,32 para cada diluição do alvo de 10 vezes – fator 10 (GOMES, 2008).

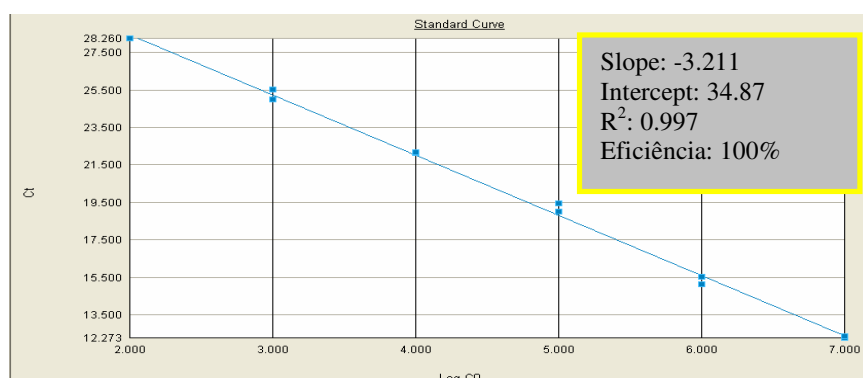


Figura 9 - Curva padrão da reação de PCR em tempo real.

Fonte: dados da autora.

Alguns fatores tais como tamanho do *amplicon*, estrutura secundária e qualidade dos iniciadores podem afetar a eficiência da reação de PCR (DORAK, 2006).

O problema de formação de dímeros de iniciadores pode ser resolvido utilizando-se softwares capazes de realizar análises da curva de dissociação (*melting curve*) (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). A análise da especificidade do produto formado é aplicável aos ensaios de qPCR baseados no uso de corantes intercalantes, sondas de hibridização ou *molecular beacons* (BUSTIN, 2000; WATZINGER; EBNER; LION, 2006).

Na análise da curva de dissociação, medidas de fluorescência são feitas no final da reação de PCR. A temperatura na reação é gradualmente aumentada até que ocorra a completa desnaturação das moléculas de fita dupla de DNA. Os híbridos, alvo-sonda, se dissociam em uma temperatura

de dissociação específica (*melting temperature*, T_m , temperatura em que 50% dos híbridos alvo-sondas são dissociados) de acordo com sua sequência, comprimento e conteúdo GC (guanina/citosina), o que leva a padrões característicos de cinéticas de fluorescência. A análise da curva de dissociação é feita através de um gráfico com a intensidade de fluorescência contra o gradiente de temperatura em uma escala logarítmica (Figura 10). Os perfis da curva de dissociação podem ser usados para discriminar o tamanho completo dos *amplicons* de produtos mais curtos como dímeros de iniciadores, pela sua reduzida temperatura de desnaturação. Logo, produtos não específicos podem ser diferenciados de *amplicons* específicos (BUSTIN, 2000; GOMES, 2008; WATZINGER; EBNER; LION, 2006; WONG; MEDRANO, 2005).

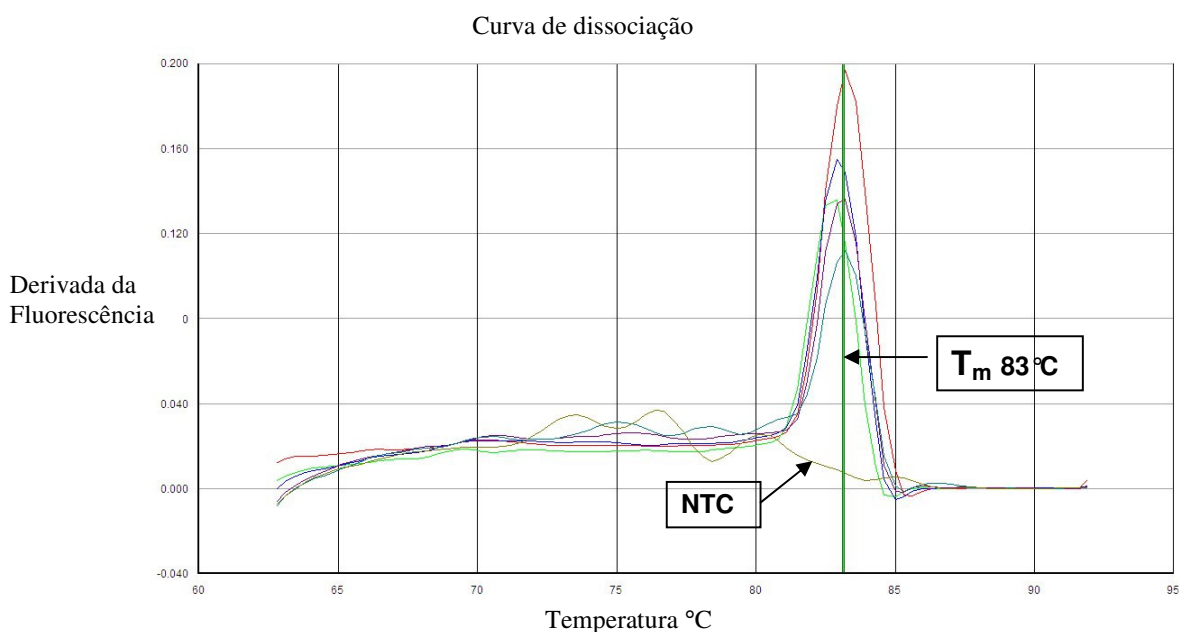


Figura 10 – Curva de dissociação da PCR em tempo real com SYBR Green.

Nota: na figura é mostrado um produto específico com $T_m = 83^\circ\text{C}$ e uma amostra negativa (NTC, *no template control*).

Fonte: dados da autora.

A qPCR permite a utilização de múltiplas sondas de oligonucleotídeos, sendo nesse caso denominada de multiplex, utilizada para a discriminação de múltiplos *amplicons*. Esta técnica é de grande utilidade no diagnóstico da dengue, uma vez que permite a identificação dos quatro sorotipos em uma única reação (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). Diversos protocolos

que permitem a detecção e sorotipagem do vírus dengue através da PCR em tempo real multiplex têm sido descritos com diferentes sensibilidade, especificidade e eficiência (CALLAHAN et al., 2001; CHIEN et al., 2006; JOHNSON; RUSSEL; LANCIOTTI, 2005; KONG et al., 2006; LAUE; EMMERICH; SCHMITZ, 1999).

A quantificação de RNA do vírus dengue fornece informações para estudos da patogênese, monitoração da carga viral e a cinética de proliferação do vírus. O acompanhamento da carga viral é um útil indicador de infecção ativa e interação vírus-hospedeiro (KAO et al., 2005; WATZINGER; EBNER; LION, 2006). Espera-se que, com a possibilidade de determinação da carga viral, seja possível identificar marcadores de diferenciação entre a forma benigna e a forma mais grave da doença.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que a febre hemorrágica da dengue é a forma clínica mais grave da doença, é relevante que se identifiquem marcadores de prognóstico desta forma clínica. A teoria mais difundida sobre os mecanismos de imunopatogenia da dengue é o aumento de infecção celular mediado por anticorpos não neutralizantes, que resultaria em níveis virais mais elevados e patologia vascular. Portanto, para entender a progressão da doença para as formas mais graves, a quantificação da magnitude da replicação viral tem um papel fundamental. Para isso, faz-se necessário um estudo da cinética de viremia em pacientes com diferentes formas clínicas da dengue (Dengue Clássica, Dengue Clássica Complicada e Febre Hemorrágica da Dengue), buscando avaliar se existe algum padrão característico que possa estar associado com essas formas clínicas, bem como com infecções primárias e secundárias (seqüenciais), utilizando um teste diagnóstico, com alta sensibilidade, que seja aplicável durante a fase precoce sintomática.

Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de identificar padrões clínico-epidemiológicos e laboratoriais preditivos de gravidade da dengue. No entanto, os estudos sobre a cinética de viremia em pacientes com as diferentes formas clínicas da dengue são relativamente escassos, e entre esses poucos, somente uma fração bem menor deles, utiliza-se de métodos quantitativos precisos.

No estado de Pernambuco, em 2002, ocorreu uma epidemia de dengue causada pelo sorotipo 3 que passou a circular simultaneamente com os sorotipos 1 e 2, com predomínio do sorotipo 3. Uma coorte de pacientes residentes em Recife e em municípios da Região Metropolitana, infectados pelo sorotipo 3, foi composta pelo Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ, para propósitos que cobrem desde o desenvolvimento de vacinas contra a dengue até o presente trabalho.

PERGUNTA

CONDUTORA

3 PERGUNTA CONDUTORA

Existe correlação entre a cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 e os diferentes tipos de infecção e formas clínicas?

HIPÓTESE

4 HIPÓTESE

A cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 está correlacionada com os diferentes níveis de gravidade das formas clínicas da dengue.

OBJETIVOS

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Estudar a cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 nos diferentes tipos de infecção e formas clínicas da dengue.

5.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a cinética de viremia de pacientes com diferentes formas clínicas de dengue,
- b) Investigar possíveis associações entre o nível de carga viral e o tipo da infecção (primária ou secundária),
- c) Investigar possíveis associações entre o nível de carga viral e a forma clínica da doença,
- d) Investigar possíveis associações entre carga viral e contagem de plaquetas no sangue, percentual de hemoconcentração e níveis de transaminases,
- e) Mensurar o poder preditivo da carga viral em relação à gravidade da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Tipo de Estudo

Estudo observacional, envolvendo um componente descritivo de uma série de casos provenientes de uma coorte prospectiva e um componente de natureza laboratorial.

6.2 Seleção e processamento das amostras

Foram utilizados neste estudo soros de pacientes de um banco de amostras provenientes de um estudo de coorte sobre dengue desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, descrito por Cordeiro et al. (2007a). Essas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) através de um convênio com os Hospitais Santa Joana, Esperança e Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP), onde pacientes com suspeita clínica de infecção pelo vírus dengue foram atendidos. As amostras estão identificadas de acordo com a ordem de coleta, da primeira à quinta, sendo a primeira amostra aquela correspondente ao dia do primeiro atendimento hospitalar e início da participação do voluntário no projeto, quando o mesmo assinou o termo de consentimento livre e esclarecido. Amostras de sangue colhidas sem anticoagulante foram utilizadas para a obtenção de soro, após centrifugação, e armazenadas a -70°C .

Para definição laboratorial do diagnóstico (sorotipo e tipo da infecção), as amostras de soro foram analisadas pelos procedimentos: RT-PCR sorotipo específica (LANCIOTTI et al., 1992); ELISA- IgM (kit ELISA- IgM, PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália), IgG anti-dengue (kit ELISA- IgG, PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália), isolamento viral em cultura de células de mosquito *A. albopictus*, C6/36 (IGARASHI, 1978) e identificação dos vírus isolados através da técnica de imunofluorescência indireta (HENCHAL et al., 1982).

Os soros identificados como positivos para o vírus 3 da dengue (RT-PCR positivos) foram utilizados para a quantificação da carga viral por PCR em tempo real. O tamanho da amostra (de

conveniência) para o estudo de cinética de viremia foi de 85 pacientes, sendo utilizadas de três a cinco amostras de cada paciente, coletadas sequencialmente (com o limite máximo de 15 dias do início de sintomas), totalizando 317 amostras. O pico de viremia foi definido como o nível de viremia mais alto durante a doença, expresso em número de cópias/ml.

A distribuição das amostras utilizadas em relação ao tipo de infecção (primária e secundária) e à forma clínica (dengue clássica, dengue clássica complicada, febre hemorrágica da dengue e dengue) encontra-se apresentada na Tabela 1. Os critérios utilizados para definição do tipo de infecção e da forma clínica encontram-se nos itens 6.3 e 6.9, respectivamente.

Tabela 1 – Distribuição das amostras quanto ao tipo de infecção e forma clínica da dengue

Forma Clínica	Tipo de Infecção		Total
	Primária	Secundária	
Dengue	10	03	13
Dengue Clássica	06	13	19
Dengue Clássica Complicada	17	21	38
Febre Hemorrágica da Dengue	08	07	15
Total	41	44	85

Além das amostras sequenciais utilizadas no estudo de cinética de viremia, foram testadas 51 amostras de pacientes com infecção pelo vírus dengue sorotipo 3, coletadas na fase aguda da doença (período febril), com diagnóstico confirmado por RT-PCR (LANCIOTTI et al., 1992), com ou sem isolamento viral positivo, para teste e validação dos kits DSSS-P26 e DSSS-P29. Também foram incluídas 10 amostras de pacientes com RT-PCR e isolamento viral negativos, mas com pesquisa de anticorpos IgM positiva. Como controles negativos, foram incluídas 10 amostras de indivíduos saudáveis, ou não infectados pelo vírus dengue. Após seleção do kit a ser utilizado no estudo de cinética de viremia, foi analisado um total de 209 amostras positivas para infecção do vírus dengue sorotipo 3, coletadas na fase aguda da doença (período febril).

6.3 Diagnóstico Sorológico

Para definição laboratorial do diagnóstico quanto ao tipo de infecção (secundária ou primária), foram testadas amostras seriadas para verificação da cinética de anticorpos IgM e IgG. Também foi utilizada a técnica de Inibição da Hemaglutinação (HI) em placas de microtitulação (CLARKE e CASALS, 1958) para confirmar a classificação dos casos de febre hemorrágica da dengue, através da quantificação de anticorpos inibidores da hemaglutinação (anticorpos totais).

Os anticorpos IgM foram detectados pela técnica imunoenzimática de captura de IgM, utilizando-se o kit ELISA-IgM anti-dengue (PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália). Para a detecção dos anticorpos IgG foi empregado o kit ELISA IgG-dengue (PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália).

O critério utilizado para definição do tipo da infecção foi uma combinação baseada nos resultados da RT-PCR, isolamento viral e cinética de anticorpos IgM e IgG realizada em amostras seriadas. A RT-PCR e o isolamento viral são mais sensíveis nos primeiros cinco a seis dias de infecção, enquanto os testes imunológicos (ELISA-IgM) são mais sensíveis após esse tempo de sintomas (POERSCH et al., 2005). Se anticorpos IgG estavam presentes já na primeira amostra, com ausência ou presença de anticorpos IgM e com resultados positivos de RT-PCR e/ou isolamento viral, confirmando infecção aguda, a infecção foi caracterizada como secundária. Na ausência de anticorpos IgG, com IgM e/ou RT-PCR e/ou isolamento viral positivo na primeira amostra e observação de soroconversão, a infecção foi caracterizada como primária (CORDEIRO et al., 2007a; 2004; SCHILLING, 2004).

Baseando-se no teste de inibição da hemaglutinação, a infecção foi caracterizada como primária na ausência de anticorpos inibidores da hemaglutinação (<1:20) na amostra de soro de fase aguda, coletada antes do quarto dia de doença e presença de anticorpos na amostra de soro da fase de convalescença com título < 1:1280; e foi considerada como secundária quando houve presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação (>1:20) na amostra de soro de fase aguda, coletada antes do quarto dia de doença e detecção de anticorpos com títulos \geq 1:2560 na amostra de soro da fase de convalescença, com aumento de, no mínimo, quatro vezes no título de anticorpos inibidores da hemaglutinação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

6.4 Purificação de RNA

A purificação de RNA foi realizada através dos kits QIAamp Viral RNA Mini Kit/QIAamp MiniElute Vírus Spin (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, 140µl amostra é lisada sob condições de desnaturação para inativar RNAses e assegurar o isolamento de RNA viral intacto e em seguida carregada por uma coluna spin. O RNA se liga a uma membrana de sílica-gel, e os contaminantes são removidos através de duas lavagens por dois tampões de lavagem diferentes. O RNA é eluído da coluna, com 60µl de solução aquosa livre de RNase, sendo armazenado a -70°C até o momento do uso.

6.5 Transcrição Reversa

Para a transcrição reversa foi seguido o protocolo estabelecido pelo fabricante dos reagentes utilizados (Invitrogen). Brevemente, uma mistura composta por 5µl do RNA purificado, 1µl de iniciadores, 1µl de dNTP e 6µl de água foi aquecida a 65°C por cinco minutos e incubada em gelo por, pelo menos, um minuto. Em seguida, foram adicionados a essa mistura 4µl de tampão *first-strand* 5 vezes, 1µl de ditioneitol (DTT), 1µl de inibidor de RNase e 1µl da enzima Superscript III. A reação foi incubada a 25°C por cinco minutos e, posteriormente, a 50°C por 45 minutos. Ao final, a reação foi aquecida a 70°C por 15 minutos. O DNA complementar gerado foi armazenado a -20°C até o momento de sua utilização na PCR em tempo real.

6.6 PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada utilizando-se kits de amplificação baseados em SYBR Green com iniciadores sorotipo-específicos para dengue (DSSS-P26 e DSSS-P29). Esses kits foram desenvolvidos pelo pesquisador Hen Phon-Too, no contexto do projeto financiado pelo

National Institutes of Health intitulado "Novel Assays for Dengue Differential Diagnosis", que resultou de um acordo de cooperação técnica entre The Johns Hopkins Singapore Biomedical Centre, National University of Singapore e o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz. Cada reação foi composta de 32 µl de mix do kit DSSS contendo iniciadores (0.2 µM final), tampão PCR Xtensa®, triton X-100, dNTPs e MgCl₂ (2.5 mM final), 0.5 µl Platinum polimerase "hot-start" (5U/µl; Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen, código 10966-030), 2 µl da mistura de transcrição reversa e água para um volume final de 50 µl. As condições de amplificação foram 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto, precedidos por 95°C por 3 minutos.

Em cada corrida foram incluídos padrões quantitativos (10⁷ a 10¹ cópias), uma amostra negativa (não dengue), um controle positivo proveniente de um isolado local de DENV-3 propagado em células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36, com 10⁶ cópias de RNA do vírus dengue e controles negativos sem o cDNA alvo (NTC). Todas as amostras foram testadas em duplicata.

Os iniciadores foram desenhados para amplificar fragmentos das regiões NS1 (kit DSSS-P26) e NS4A (kit DSSS-P29), suas características se encontram resumidas na Tabela 2.

Os kits foram padronizados para os equipamentos ABI Prism 7000 e 7500 (Applied Biosystems), instalados no Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz. Os sistemas de detecção em tempo real foram validados em fase pré-clínica (limite de detecção e especificidade) pelo grupo do Dr. Phon-Too (National University of Singapore). Para a realização deste trabalho, os kits foram revalidados e otimizados. Após análise dos resultados obtidos nos ensaios, um deles foi escolhido para a determinação da carga viral das amostras selecionadas para o estudo.

A reação de PCR em tempo real foi realizada medindo-se a intensidade de fluorescência do SYBR Green, utilizando-se o fluoróforo ROX (6-carboxi-X-rodamina) como referência passiva. Os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software* ABI PRISM (versão 1.4) da Applied Biosystems.

Os resultados foram analisados considerando-se a curva de dissociação (*melting curve*), curva de amplificação e desvio-padrão entre as duplicatas para quantificação. A eficiência de amplificação foi calculada para cada placa usando-se o *slope* da curva-padrão.

Tabela 2 – Características dos iniciadores utilizados para detecção do vírus dengue sorotipo 3 nos kits DSSS-P26 e DSSS-P29.

Iniciador	Seqüência	Posição de Anelamento	Tamanho do Produto amplificado
DSSS-P26 -Direto	5'- CAGAAA (A/G) TGTGGACAAGAG-3'	3275 - 3296	104pb
DSSS-P26- Reverso	5'- TCGCA (G/A)GGG (A/G)GGAAGTG-3'	3363 - 3379	
DSSS-P29-Direto	5'- GTCAGAA(C/G)ATGGCGGTAGG-3'	6469 - 6487	142pb
DSSS-P29-Reverso	5'- CTTTCCAATCCCTTTACCTGATAT-3'	6587 - 6611	

6.7 Isolamento viral

O isolamento do vírus foi realizado através da inoculação da primeira amostra de soro do paciente, coletada na fase aguda, em tubo de cultura contendo células C6/36 (IGARASHI, 1978) e observado, diariamente, em microscópio invertido para visualização de efeito citopático (ECP). As células infectadas pelos vírus foram fixadas em lâminas de vidro para imunofluorescência. O vírus foi então detectado através de uma reação antígeno-anticorpo, utilizando-se anticorpos monoclonais para DENV-1, 2, 3 e 4 (Bio-Manguinhos, Fiocruz) e uso de fluoresceína que apresenta uma luz verde, no microscópio de imunofluorescência, quando a amostra é positiva (HENCHAL et al., 1982).

6.8 Transcrição Reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A detecção dos vírus dengue baseia-se no protocolo descrito por Lanciotti (LANCIOTTI et al., 1992), onde a transcrição reversa e subsequente produção de *amplicons* externos ocorrem na presença de iniciadores consenso externos, localizados nos genes C e prM, após 35 ciclos de PCR. Os *amplicons* desta reação são utilizados em uma segunda rodada de amplificação por PCR

(*Nested-PCR*) com iniciadores internos sorotipo-específicos, gerando produtos com tamanhos característicos para cada sorotipo do vírus dengue. Os produtos gerados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, demonstrados por coloração com brometo de etídio em um transiluminador ultravioleta (UV), e digitalizado.

6.9 Análise da associação entre o nível de carga viral e a forma clínica da doença

A carga viral e a cinética de viremia foram determinadas através de PCR em tempo real. Em seguida, foram realizadas análises estatísticas com o objetivo de verificar a associação dos padrões de viremia com as formas clínicas da doença.

Os critérios utilizados para a definição da forma clínica foram essencialmente os definidos pela Organização Mundial da Saúde (1999, 1987). Além dessa classificação, foi incluída a forma clínica denominada neste estudo de Dengue Clássica Complicada (DCC). Essa forma utilizada no estudo de corte do qual as amostras analisadas são provenientes, representa uma forma intermediária entre DC e FHD, e inclui os casos que apresentam plaquetopenia (maior que $50.000/\text{mm}^3$) ou hemorragia, mas que não preenchem os critérios da OMS para FHD. Também foi incluída a forma clínica denominada apenas de Dengue (D), que se refere aos casos cuja classificação não foi possível por falta de exames laboratoriais complementares, porém apresentando quadro clínico compatível com dengue clássica.

6.10 Análise da associação entre carga viral e contagem de plaquetas no sangue, percentual de hemoconcentração e níveis de transaminases

A contagem de plaquetas, percentual (%) de hemoconcentração (medido através da determinação do hematócrito) e níveis de transaminases refletem a propensão hemorrágica, grau de extravasamento plasmático e acometimento hepático, respectivamente. Portanto, refletem a gravidade da doença. Esses parâmetros foram correlacionados com os padrões de viremia

encontrados. Para isso foram utilizados os resultados obtidos no estudo desenvolvido no LaViTE, anteriormente mencionado (Página 55). As determinações de plaquetas, hematócrito e transaminases foram realizadas nos laboratórios dos hospitais colaboradores (Esperança, Santa Joana e IMIP) utilizando métodos automatizados. Os valores referenciais e os métodos utilizados em cada um dos laboratórios para as determinações de transaminases encontram-se resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores referenciais de transaminases de acordo com o laboratório onde a determinação foi realizada, o sexo do paciente e o método empregado.

Laboratório	TGO		TGP		Método
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	
Hospital Santa Joana	<43	<40	<43	<40	Cinético UV
Hospital Esperança	17 – 59	14 – 36	21 – 72	9 – 52	Química Seca
IMIP	<37	<42	<31	<32	Cinético UV

Nota: TGO= Transaminase glutâmico oxalacética; TGP= Transaminase glutâmico pirúvico. Valores expressos em U/L.

6.11 Análise Estatística

A análise estatística consistiu em uma descrição das características biológicas e clínicas dos pacientes em estudo. Para a análise de sobrevida, utilizada para estimar o tempo de indetecção da carga viral, foi aplicado o modelo de Kaplan-Meier, utilizando o teste estatístico de log-rank quando inserido um fator de comparação das sobrevidas. Para estudo da cinética de viremia foram utilizados os modelos gerais linearizados para medidas repetidas. Na busca de associações entre os níveis de viremia e os testes laboratoriais (transaminases, plaquetas e hematócrito), foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson com seus respectivos testes de significância. Quando analisados os testes laboratoriais, estratificados em normais e alterados, e avaliados seus comportamentos no decorrer do estudo, segundo o dia de início de sintomas, foi feito o teste de significância do Qui-quadrado de Pearson para tendência e calculado a *odds ratio*

(OR). O erro máximo adotado para os testes estatísticos foi de $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$). Foram utilizados os programas estatísticos EPI-INFO, versão 2000, o SPSS-PC, versão 8.0 e o Prism, versão 4.0a.

6.12 Considerações éticas

Este estudo utilizou amostras de soro provenientes de um banco de amostras de um projeto mais amplo, intitulado “Vacina de dengue baseada em epítomos, tetravalente e direcionada ao compartimento MHCII”, registrado no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães com o número 68/02 e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com o número 4909. As metodologias aqui descritas já fazem parte desse projeto maior, ao qual está vinculado. O presente estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, em 26/11/2007, Registro 056/2007, CAAE 0074.0.095.000-07, de acordo com a Resolução CNS 196/96 (Anexo A).

RESULTADOS

7 RESULTADOS

7.1 Validação dos kits de amplificação baseados em SYBR Green com iniciadores sorotipo-específicos para dengue

Dois kits de amplificação, baseados em SYBR Green para detecção e determinação da carga viral do vírus dengue sorotipo 3, foram otimizados quanto à eficiência, especificidade e limite de detecção. Estes kits denominados DSSS-P26 (Dengue Serotype-Specific SYBR Green- P26) e DSSS-P29 (Dengue Serotype-Specific SYBR Green- P29) foram desenvolvidos por Dr. Hen Phon-Too (National University of Singapore).

Para a validação dos kits foram utilizadas 51 amostras de pacientes com infecção pelo vírus dengue sorotipo 3, com diagnóstico confirmado por RT-PCR (LANCIOTTI et al, 1992), com ou sem isolamento viral positivo. Também foram incluídas 10 amostras de pacientes com RT-PCR e isolamento viral negativos, mas com pesquisa de anticorpos IgM positiva. Como controles negativos, foram incluídas 10 amostras de indivíduos saudáveis, ou não infectados pelo vírus dengue.

7.1.2 Determinação da especificidade, eficiência e limite de detecção dos kits DSSS-P26 e DSSS-P29

Foi verificado, através da utilização de padrões quantitativos de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que os kits eram mais específicos para amplificação do vírus DENV-3 do que para os outros sorotipos (Tabela 4). Para cálculo da especificidade (σ) foi utilizada a equação descrita por Too et al (2003):

$\sigma = (1 + \epsilon^{\Delta C_t})^{-1}$, onde $(1 + \epsilon)$ representa $10^{1/\text{slope}}$, e ϵ é igual a eficiência.

Quanto maior o valor de σ , mais específico é o ensaio no sentido de discriminar o alvo definido frente aos alvos testes.

A eficiência calculada a partir da curva padrão foi de 100% para o kit DSSS-P26 e de 94% para o kit DSSS-P29 (Tabela 4). A curva padrão foi construída com a utilização de plasmídeos de DENV-3 com 10^7 a 10^1 cópias (Figuras 11 e 12). Os kits foram capazes de detectar até 10 cópias quando estes padrões foram usados (Figuras 13 e 14).

Tabela 4 – Especificidade e eficiência dos kits DSSS-P26 e P29.

KIT	Especificidade (1+ Eficiência)^{Ct1-Ct2}	Eficiência	Slope
DSSS		$10^{(-1/slope)-1}$	
P26	32.768 vezes mais específico para DENV3 do que para DENV1 262.144 vezes mais específico para DENV3 do que para DENV2 524.288 vezes específico para DENV3 do que para DENV4	100%	- 3.21
P29	40.255 vezes mais específico para DENV3 do que para DENV1 570.209 vezes mais específico para DENV3 do que para DENV2 40.255 vezes mais específico para DENV3 do que para DENV4	94%	- 3.45

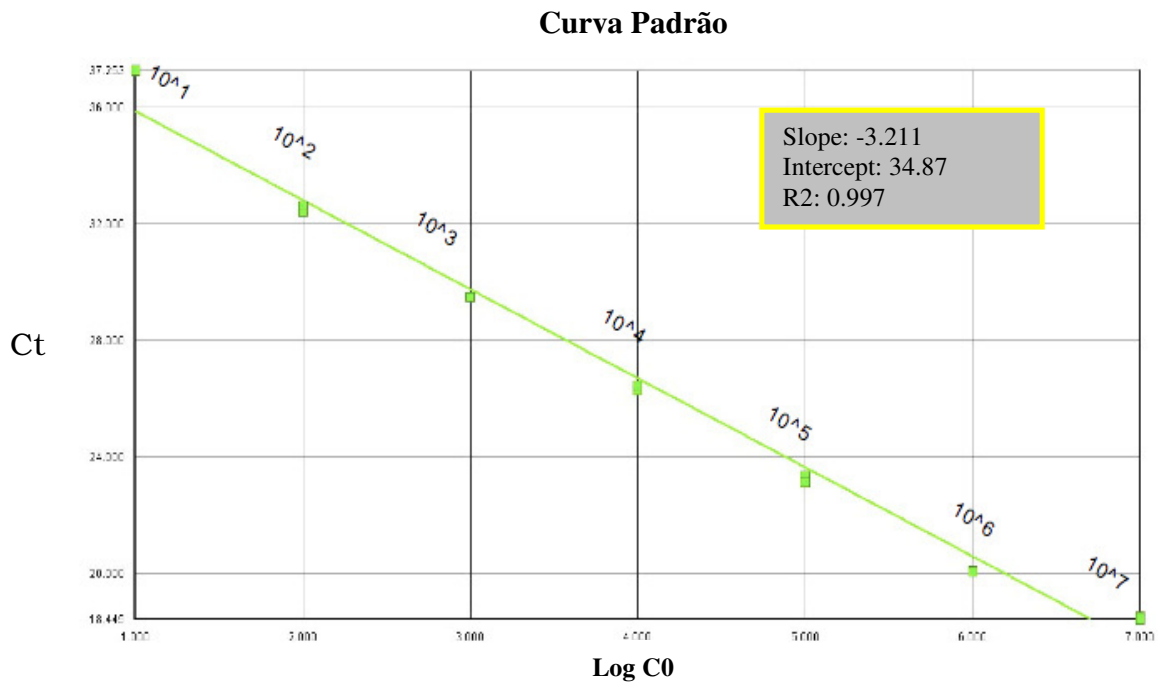


Figura 11 – Curva padrão kit DSSS-P26

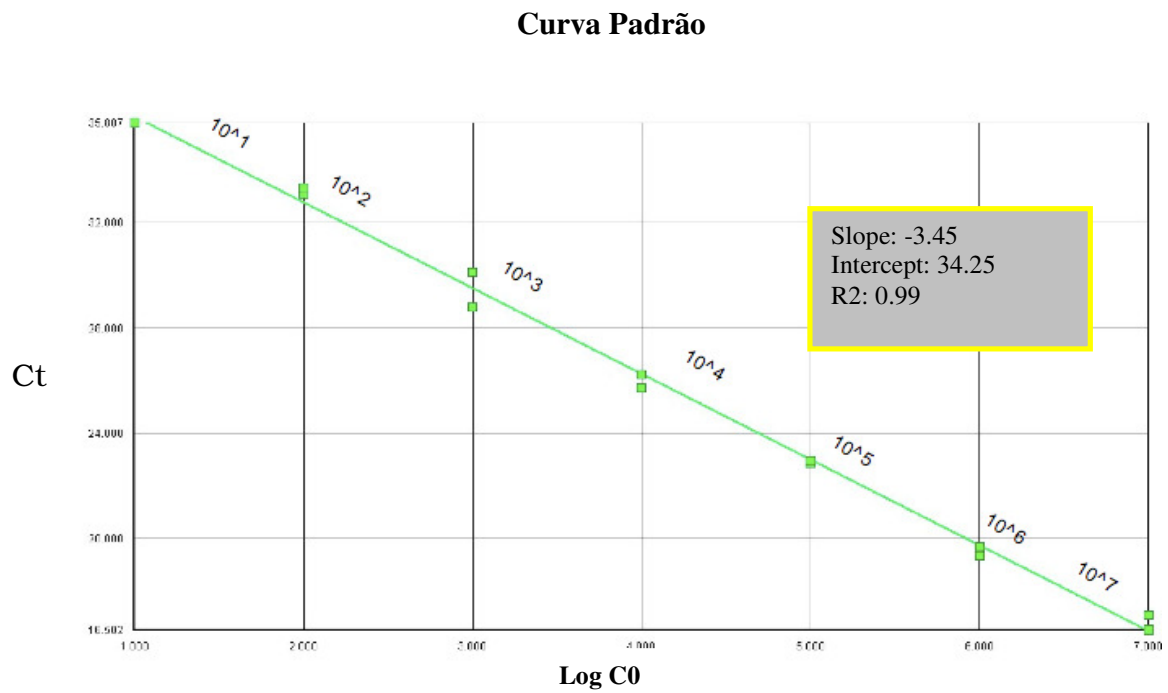


Figura 12 – Curva padrão – kit DSSS-P29

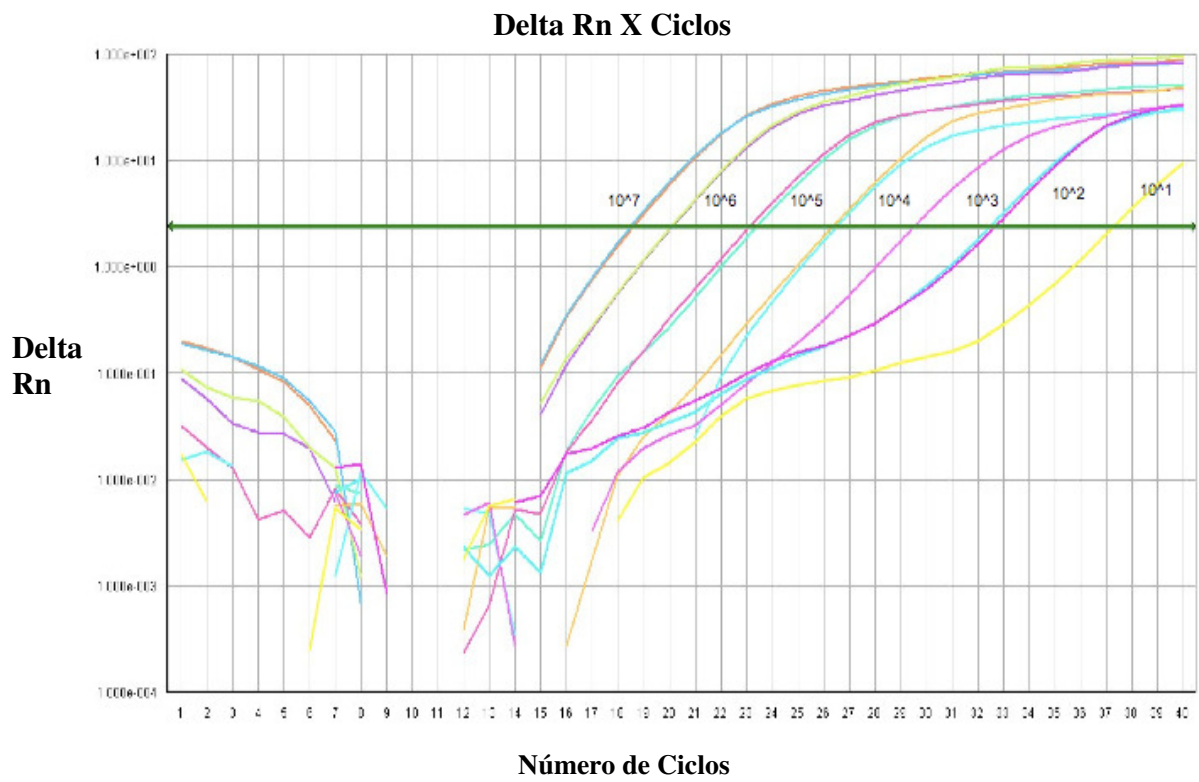


Figura 13 – Curva de Amplificação – kit DSSS-P26

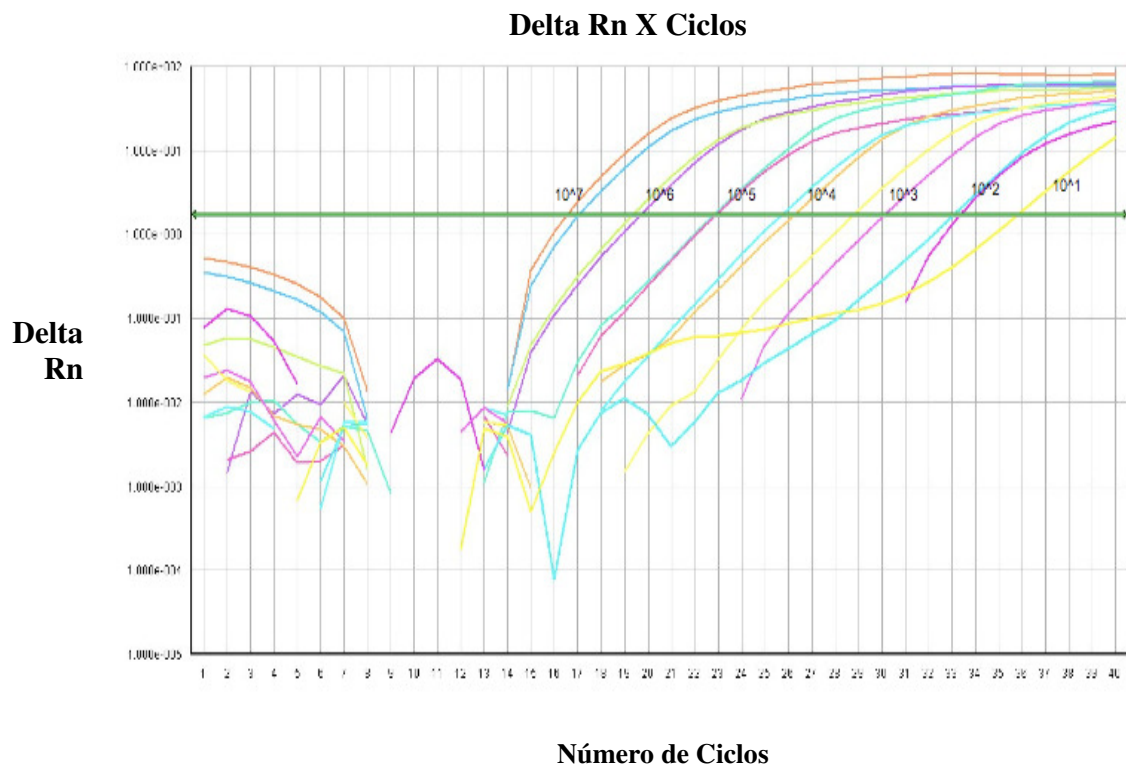


Figura 14 – Curva de Amplificação – kit DSSS-P29

7.1.3. Determinação da especificidade e sensibilidade clínicas

Para determinar a sensibilidade dos kits, os resultados obtidos com os mesmos foram comparados com os resultados da RT-PCR e isolamento viral (Tabela 5). O isolamento viral foi positivo em 25, das 51 amostras (49%), apresentando 100% de positividade apenas nas amostras coletadas com um dia de início dos sintomas, quando comparado com os resultados dos métodos moleculares. Nas amostras estudadas, o tempo limite de detecção através do isolamento viral foi de sete dias de início dos sintomas, com uma amostra positiva dentre as quatro analisadas (25%). A pesquisa de anticorpos IgM foi positiva em 16, das 51 amostras (31%), começando a apresentar resultados positivos a partir do quarto dia de sintomas. Nestas amostras IgM positivas, o isolamento viral foi negativo.

Tabela 5 - Amostras positivas para infecção pelo vírus dengue de acordo com o teste diagnóstico e sua correlação com o número de dias de início de sintomas – Kits DSSS-P26 e DSSS-P29

Dias de início dos sintomas	Número de amostras	IgM Positivo	RT-PCR Lanciotti (%)	DSSS-P26 (%)	DSSS-P29 (%)	Isolamento (%)
1	02		02 (100)	02 (100)	02 (100)	02 (100)
2	07		07 (100)	07 (100)	07 (100)	06 (86)
3	08		08 (100)	08 (100)	08 (100)	04 (50)
4	13	03(23)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	06 (46)
5	11	05(45)	11 (100)	11 (100)	11 (100)	04 (36)
6	03	02(67)	03 (100)	03 (100)	03 (100)	02 (67)
7	04	03(75)	04 (100)	04 (100)	04 (100)	01(25)
8	03	03(100)	03 (100)	03 (100)	03 (100)	
Total	51	16 (31)	51 (100)	51 (100)	51 (100)	25 (49)

Os dois kits apresentaram 100% de concordância com os resultados obtidos com a RT-PCR. A sensibilidade e a especificidade encontram-se resumidas na Tabela 6. A análise das curvas de dissociação obtidas com os kits mostrou que os alvos amplificados tinham uma temperatura de dissociação variando entre 83.6 a 85.6°C para DSSS-P26 e entre 82.7 a 84°C para DSSS-P29 (Figuras 15 e 16). Ambos os kits foram capazes de quantificar com precisão o controle positivo de 10^6 cópias.

Tabela 6 – Cálculo da sensibilidade e especificidade clínicas para os kits DSSS-P26 e DSSS-P29

RT-PCR	DSSS – P26		DSSS – P29	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Teste Positivo	51	0	51	0
Teste Negativo	0	20	0	20
Total	51	20	51	20
Sensibilidade (%)	100		100	
Especificidade (%)	100		100	

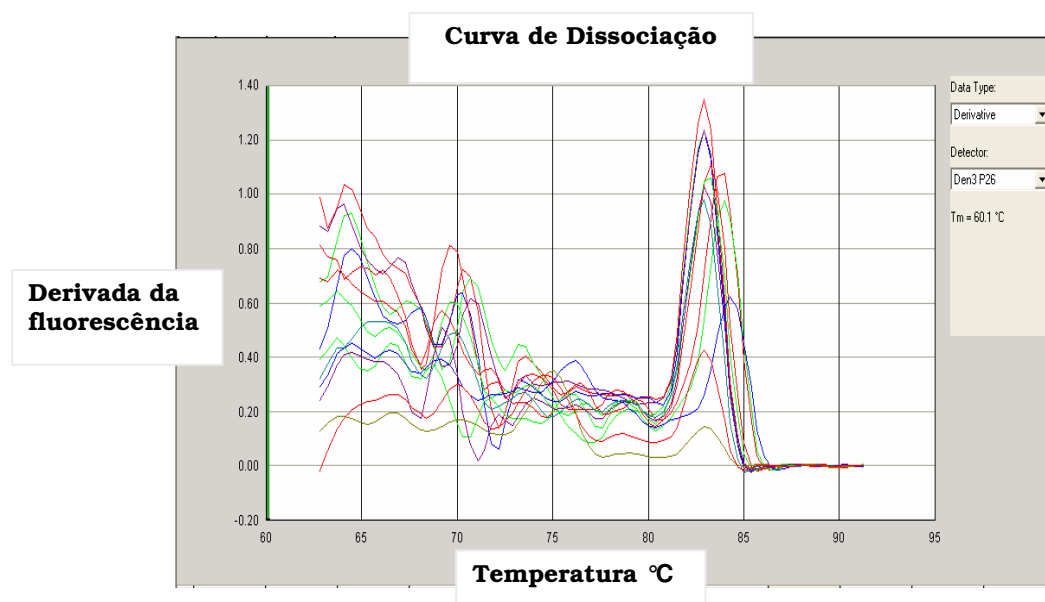


Figura 15 – Curva de dissociação – kit DSSS-P26.

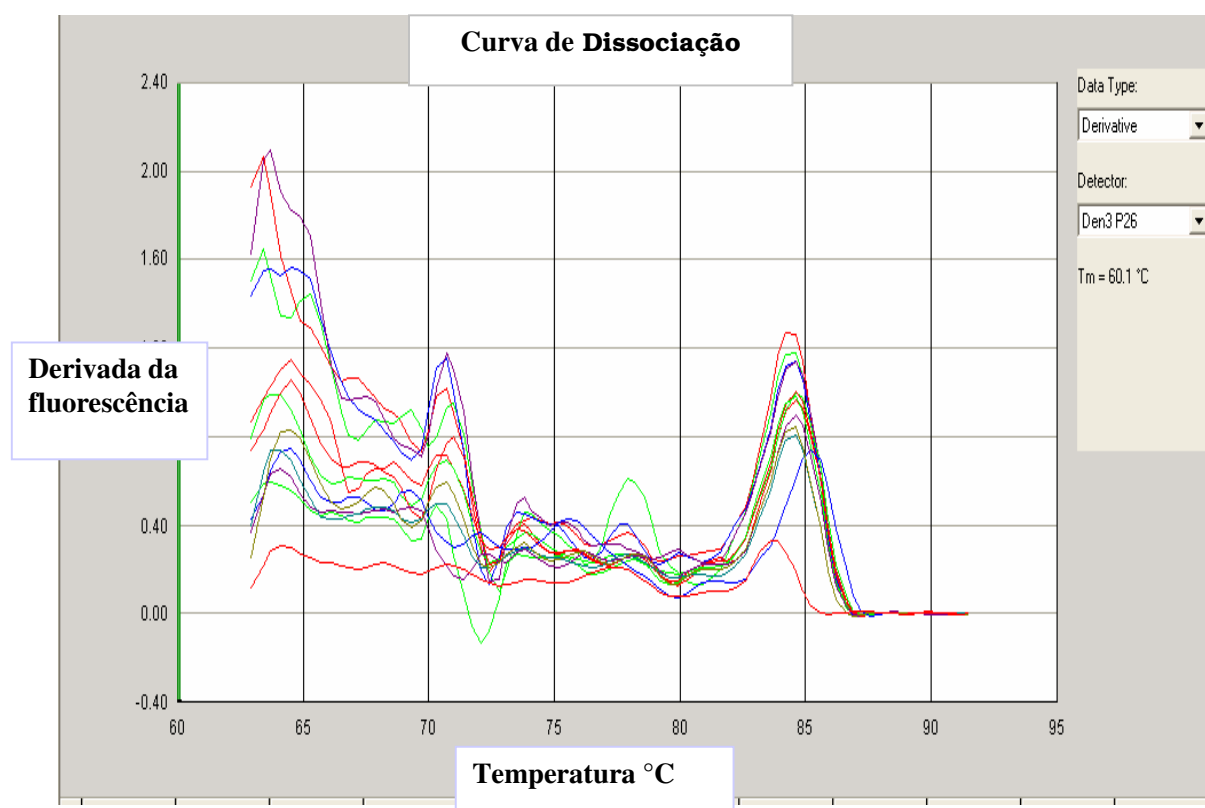


Figura 16 – Curva de dissociação – kit DSSS-P29

7.1.4. Escolha do kit para o estudo da cinética de viremia

Apesar dos resultados serem semelhantes em amostras negativas, com ambos os kits, as quantificações com o kit DSSS-P26 só foram possíveis com amostras contendo mais de 10^2 cópias. Ainda em relação ao kit DSSS-P26, foi verificado que, enquanto o kit DSSS-P29 apresentou uma curva de dissociação de fácil análise dos resultados das amostras, o kit DSSS-P26 apresentou amplificação no NTC e amostras negativas, porém sem possibilidade de quantificação, com picos de amplificação pouco definidos, dificultando a análise (Figuras 17 e 18). O desvio-padrão entre as amostras também foi maior quando utilizado o kit DSSS-P26.

Mesmo com o kit DSSS-P29, não foi possível quantificar com exatidão amostras com menos de 10 cópias, sendo considerado este valor (10 cópias) como o limite de detecção.

Com base nesses resultados, o kit escolhido para determinação da cinética de viremia foi o DSSS-P29.

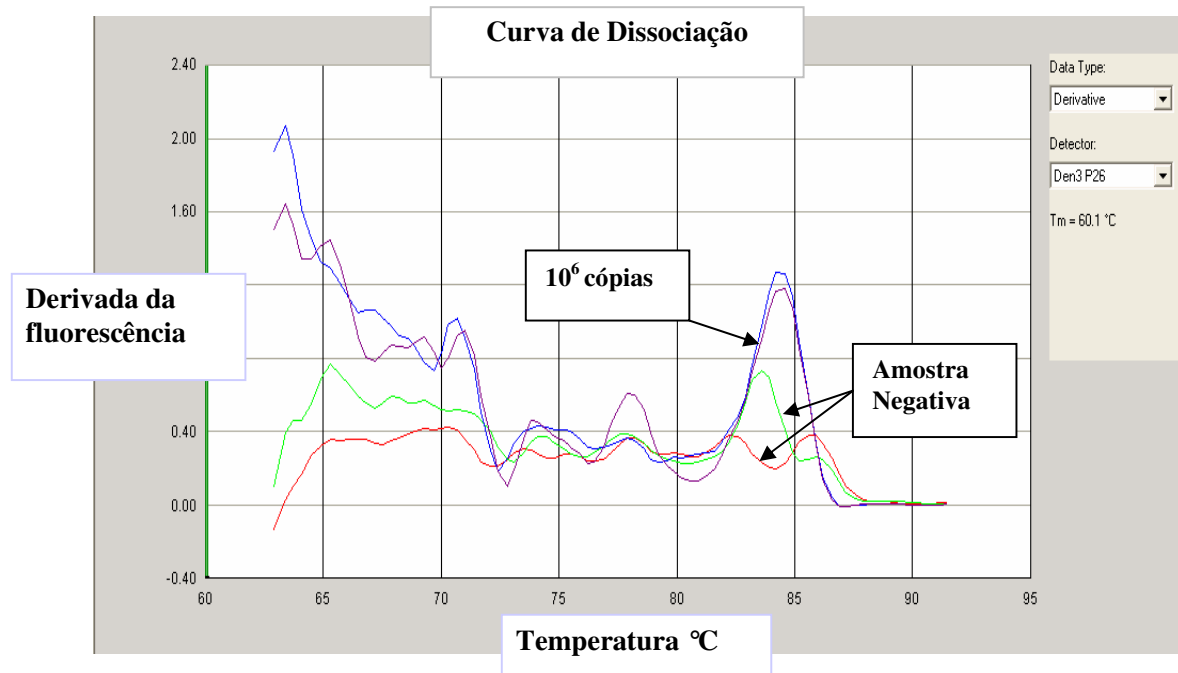


Figura 17 - Curva de dissociação do kit DSSS-P26 mostrando amplificação de amostra negativa.

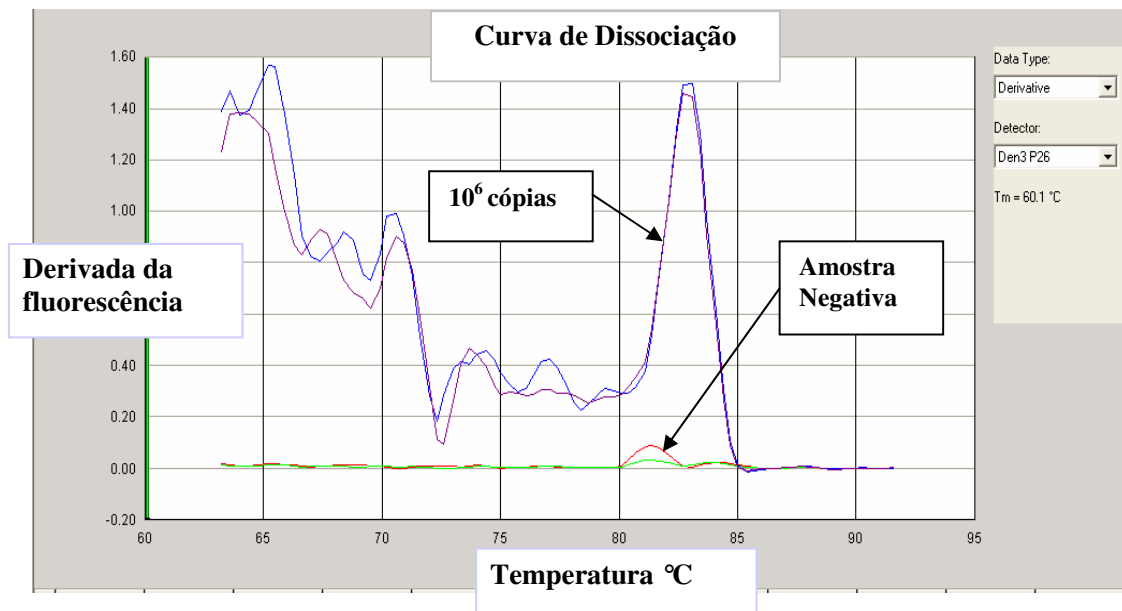


Figura 18 - Curva de dissociação do kit DSSS-P29 mostrando ausência de amplificação na amostra negativa.

7.2 Determinação de carga viral com o uso do kit DSSS-P29

Uma vez escolhido o kit para a determinação de cinética de viremia, foi realizada a quantificação de todas as amostras que fazem parte do estudo realizado no LaViTE e que apresentaram RT-PCR positiva. Foi testado um total de 209 amostras. A sensibilidade e especificidade do kit foram de 100%. A tabela 7 abaixo mostra a comparação entre os resultados obtidos por esse kit e os resultados de RT-PCR, isolamento viral e pesquisa de anticorpos IgM. O percentual médio de positividade do isolamento viral foi de 36%, com percentual máximo de 67% em amostras coletadas com um dia de início dos sintomas.

Tabela 7 - Amostras positivas para infecção pelo vírus Dengue de acordo com o teste diagnóstico e sua correlação com o número de dias de início dos sintomas – kit DSSS-P29

Dias de início dos sintomas	Número de amostras	IgM Positivo	RT-PCR Lanciotti (%)	DSSS-P29 (%)	Isolamento (%)
1	06		06 (100)	06 (100)	04 (67)
2	20		20 (100)	20 (100)	11 (55)
3	41	02(05)	41 (100)	41 (100)	19 (46)
4	58	13(22)	58 (100)	58 (100)	18 (31)
5	44	18(41)	44 (100)	44 (100)	17 (39)
6	13	08(61)	13 (100)	13 (100)	04 (31)
7	12	08(67)	12 (100)	12 (100)	02(17)
8	12	11(92)	12 (100)	02 (100)	01(08)
9	02	01(50)	02 (100)	02 (100)	
10	01	01(100)	01(100)	01(100)	
Total	209	62(30)	209 (100)	209 (100)	76 (36)

7.3 Análise descritiva do estudo da cinética de viremia

Foram avaliados 85 pacientes submetidos a quatro coletas (a quinta foi retirada da análise, pois só foi possível determinar a carga viral nesta amostra em três pacientes), em um total de 314 amostras. Foram analisados os níveis de carga viral, plaquetas, hematócrito, transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP). De acordo com a Tabela 8, 50,6% dos pacientes eram do sexo masculino. Em relação ao diagnóstico, 45,8% dos pacientes tiveram dengue clássica complicada, 22,4% dengue clássica, enquanto que 16,5% foram diagnosticados com febre hemorrágica da dengue e 15,3% com dengue. Em 48,2% dos pacientes, o tipo de infecção foi primária e em 51,8% dos casos, secundária.

Tabela 8 - Distribuição dos indivíduos estudados segundo sexo, diagnóstico e tipo de infecção

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	43	50,6
Feminino	42	49,4
Diagnóstico		
Dengue	13	15,3
DC	19	22,4
DCC	39	45,8
FHD	14	16,5
Tipo de infecção		
Primária	41	48,2
Secundária	44	51,8
Total	85	100,0

Nota : DC (dengue clássica), DCC (dengue clássica complicada), FHD (febre hemorrágica da dengue).

A média de idade dos pacientes foi de 39,3 anos, com mínimo de 15 e máximo de 84 anos. Em relação ao tempo de início dos sintomas no momento da coleta das amostras, a média foi de 3,9 dias, com um mínimo de um e máximo de oito dias (Tabela 9).

Tabela 9 – Características dos pacientes no estudo (idade e tempo de início dos sintomas)

Variáveis	Média ± DP	Min – Max	IC (95%)
Idade (em anos)	39,3 ± 15,8	15 – 84	35,9 – 42,7
Tempo de início dos sintomas (em dias)	3,9 ± 1,6	1 – 8	3,6 – 4,3

Nota: DP = desvio-padrão; Min = mínima; Max = máxima; IC – intervalo de confiança

7.4 Determinação da cinética de viremia

O tempo mediano de duração da viremia foi determinado através da análise de sobrevida. A mediana do tempo de duração foi de 10 dias. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa quando os tempos de duração da viremia foram estratificados pelo tipo de infecção ($p=0,4$) e formas clínicas ($p=0,91$) (Figuras 19 e 20).

A carga viral máxima foi detectada entre o primeiro e terceiro dias de início dos sintomas (Figura 21).

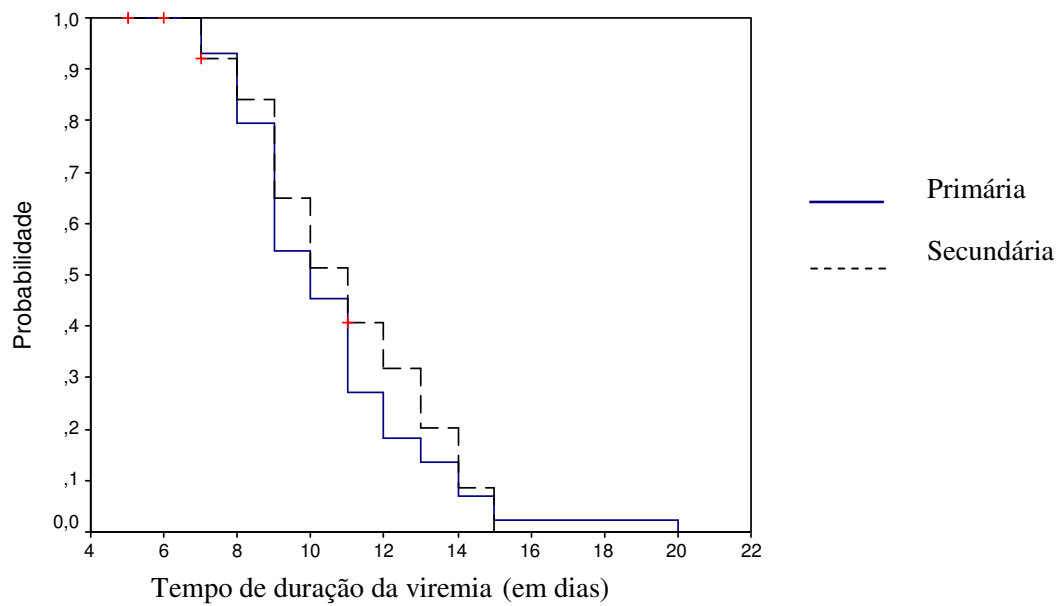


Figura 19 - Probabilidade acumulada do tempo de duração da viremia estratificado por tipo de infecção.

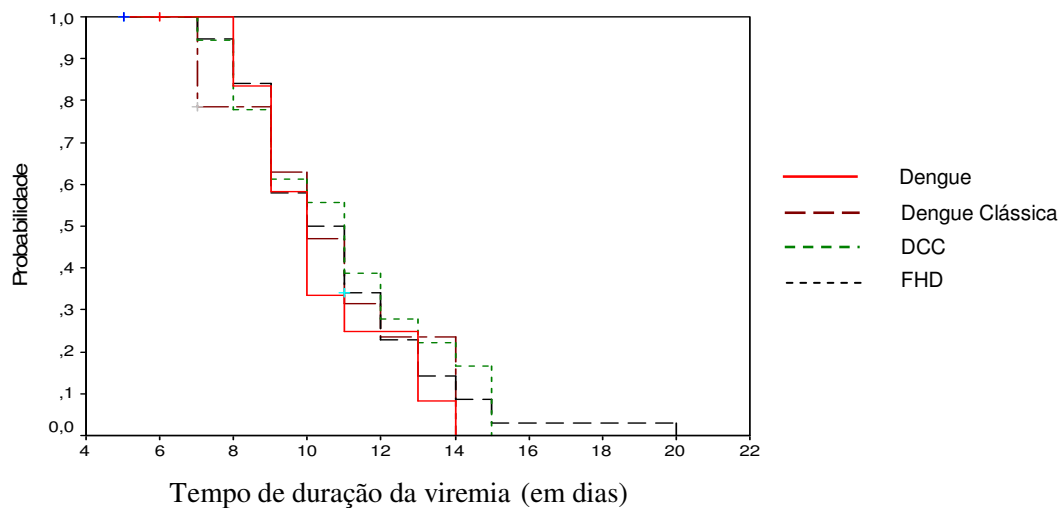


Figura 20 - Probabilidade acumulada do tempo de duração da viremia estratificado pelas formas clínicas da dengue.

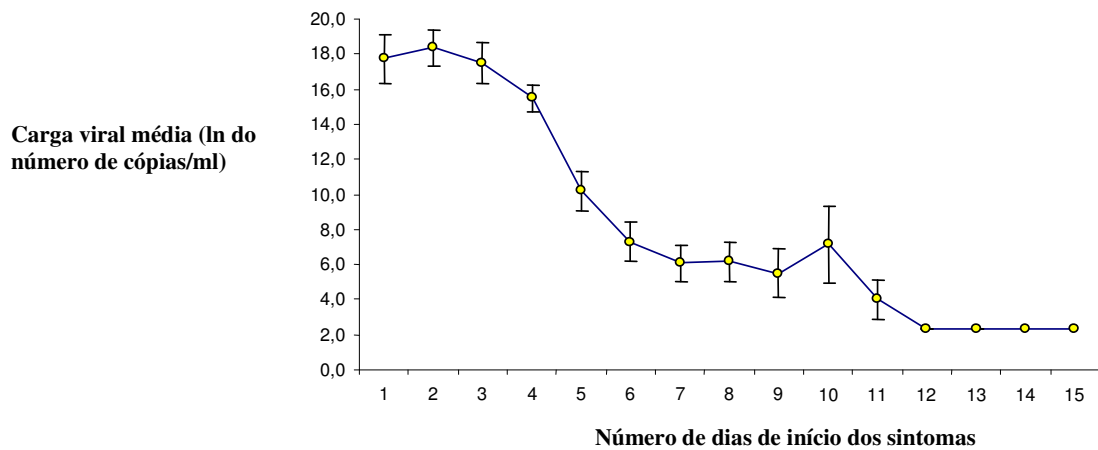


Figura 21 - Média do logaritmo da carga viral (cópias/ml) segundo os dias de início dos sintomas.

7.5 Associação entre carga viral e tipo de infecção

O tipo de infecção não interferiu no comportamento da carga viral ($p=0,325$) (Figura 22).

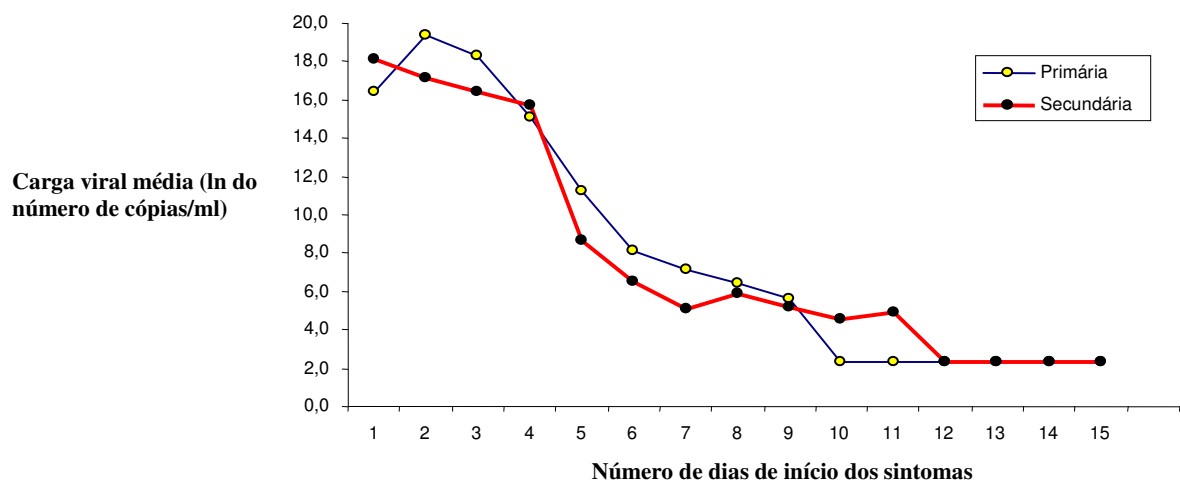


Figura 22 – Curva de cinética de viremia segundo o tipo de infecção.

7.6 Associação entre carga viral e formas clínicas

Não houve correlação entre os níveis de carga viral e as formas clínicas da dengue ($p=0,421$), nem entre a duração da viremia e as formas mais graves (Figura 23). Foi detectada viremia após o desaparecimento da febre (defervescência, definida como queda e permanência da temperatura para valores menores que 38°C) em todas as formas clínicas, porém em níveis mais baixos do que durante o período febril.

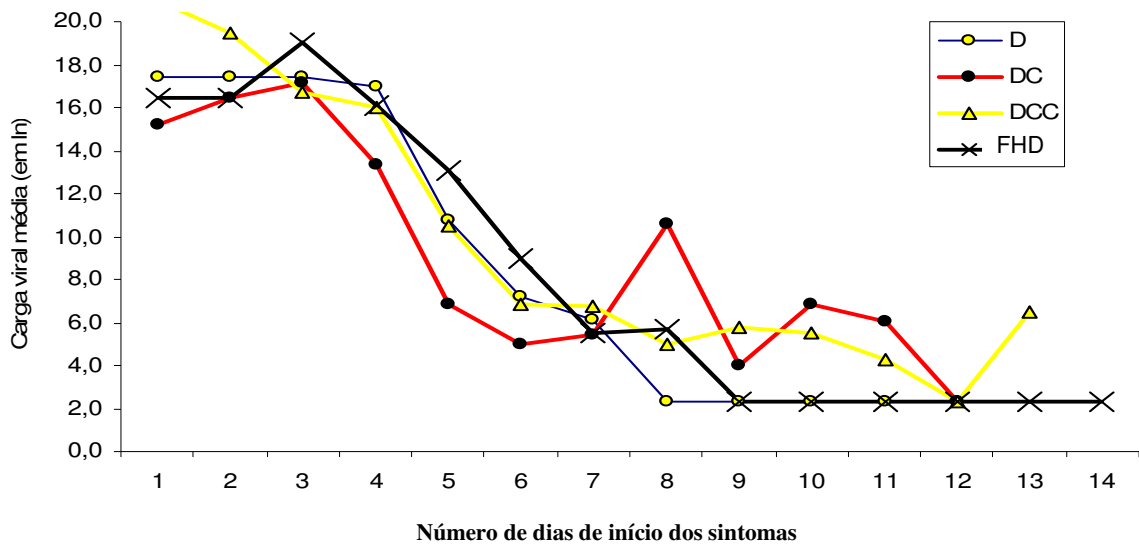


Figura 23 - Curva de cinética de viremia segundo as formas clínicas da dengue. Carga viral expressa em logaritmo neperiano do número de cópias/ml.

7.7 Associação entre carga viral e os níveis de plaquetas

Em relação à contagem de plaquetas, os menores valores foram observados entre o quinto e o sétimo dias de início dos sintomas (Figura 24). Não houve correlação entre a carga viral e os níveis de plaquetas ($p=0,53$) (Figura 25). Correlacionando por tipo de infecção, observou-se maior redução das plaquetas quando a infecção foi considerada primária (Figuras 26 e 27). De acordo com as formas clínicas, menores níveis foram observados em DCC e FHD, como era esperado, uma vez que a definição dos casos de DCC e FHD envolve pacientes com plaquetopenias inferiores a $100.000/\text{mm}^3$ para FHD e de qualquer nível para DCC (Figuras 28 e 29).

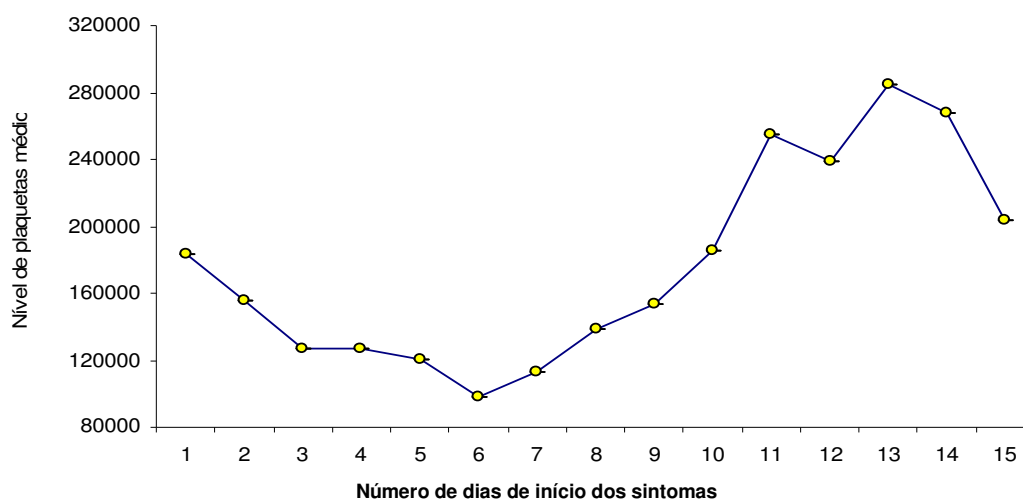


Figura 24 - Acompanhamento do nível de plaquetas médio ao longo dos 15 dias de início dos sintomas. Número de plaquetas expresso em mm^3

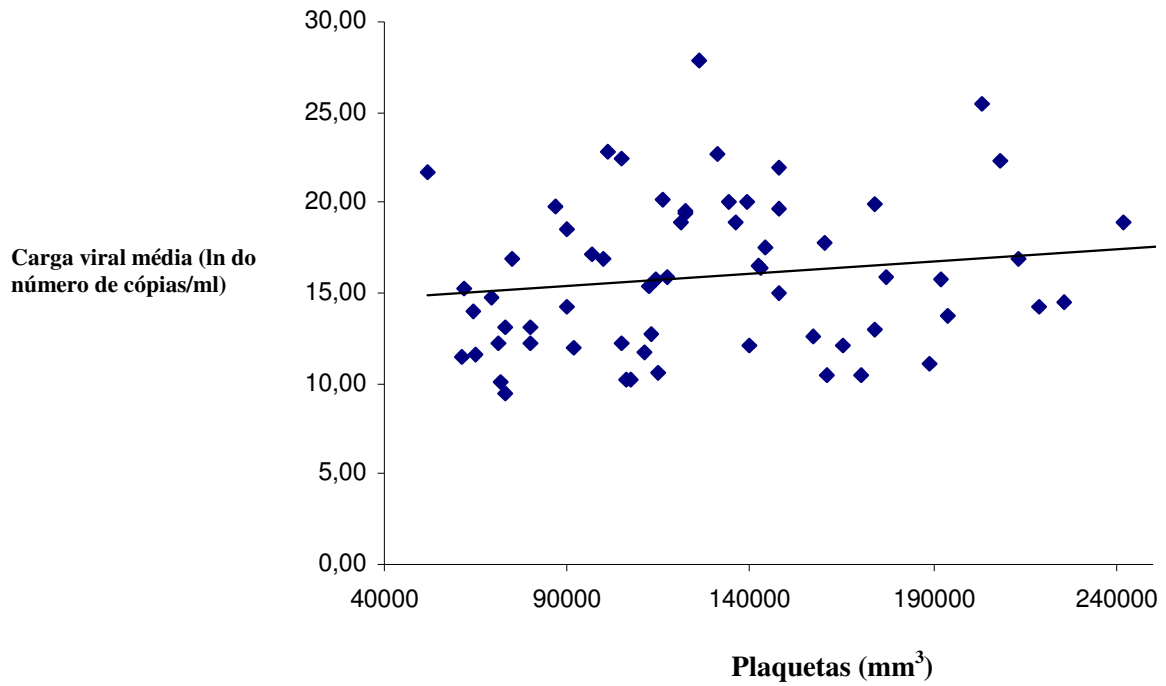


Figura 25 - Correlação da carga viral e níveis de plaquetas.

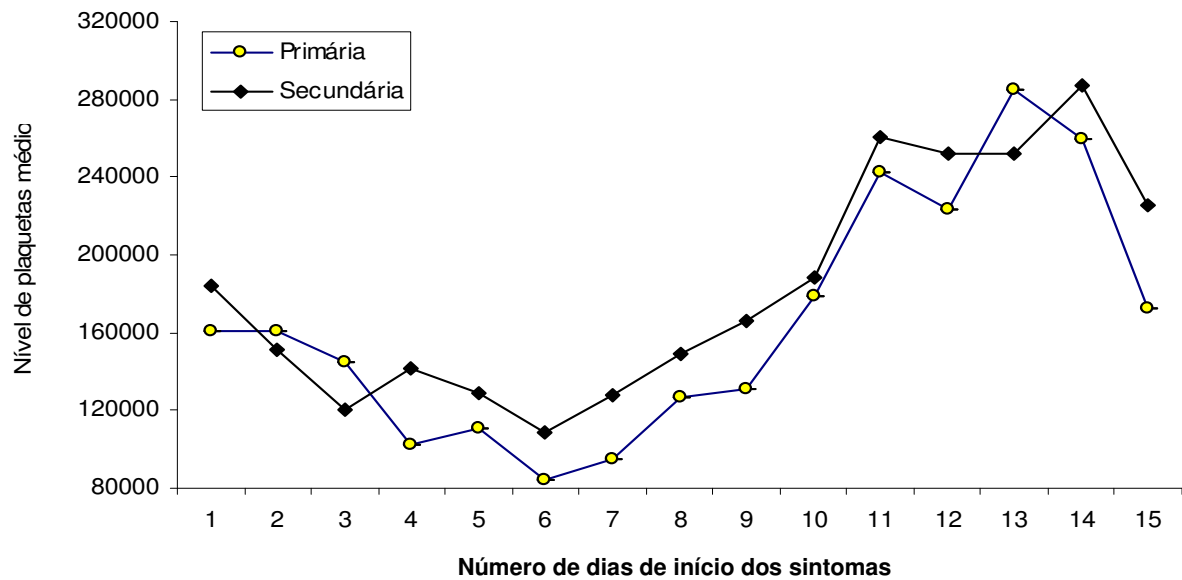


Figura 26 - Acompanhamento dos níveis médios de plaquetas ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo tipo de infecção. Número de plaquetas expresso em mm³.

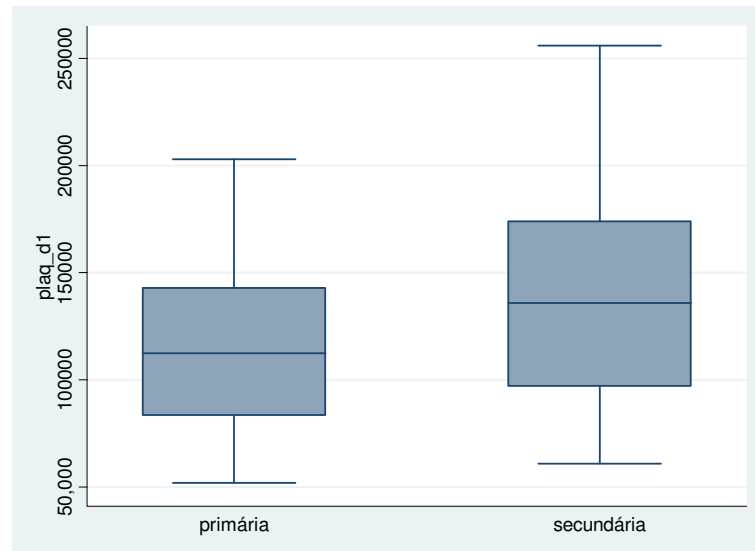


Figura 27 – Níveis de plaquetas iniciais segundo o tipo de infecção.

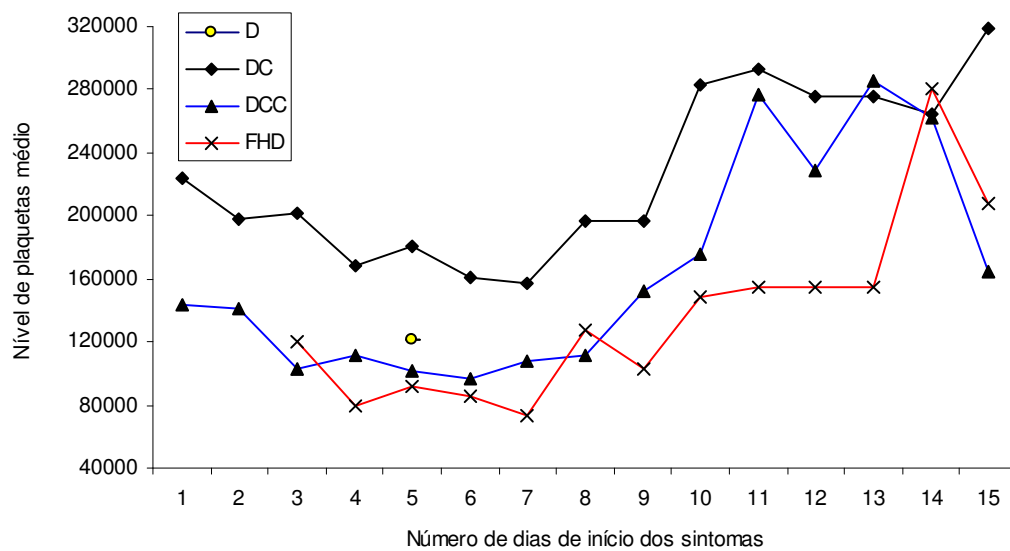


Figura 28 - Acompanhamento dos níveis médios de plaquetas ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo as formas clínicas da dengue. Número de plaquetas expresso em mm^3 .

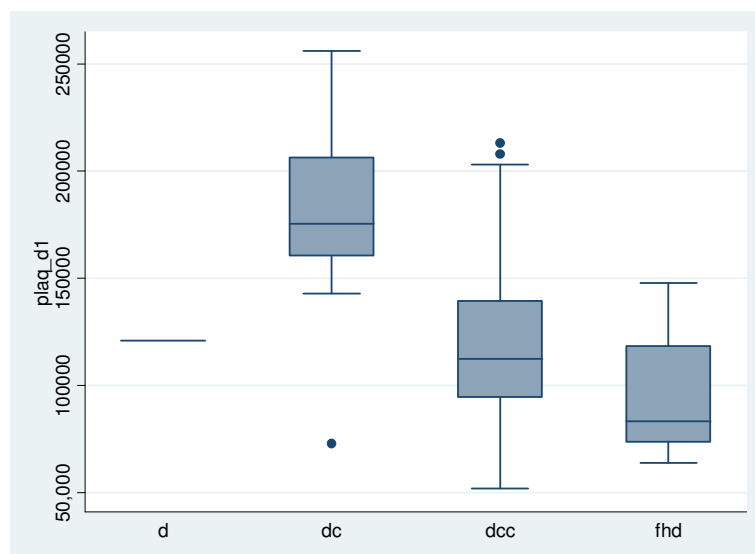


Figura 29 – Níveis médios de plaquetas segundo as formas clínicas

7.8 Associação entre carga viral e os níveis de hematócrito (% de hemoconcentração)

O nível de hematócrito teve pouca variação (entre 39 e 45%) ao longo do período, a partir do início dos sintomas, com um aumento médio de 3% quando comparada a determinação na primeira coleta com a última coleta dos pacientes (Figura 30).

Não houve correlação estatística significativa entre os níveis de hematócrito e a carga viral ($p=0,769$) (Figura 31).

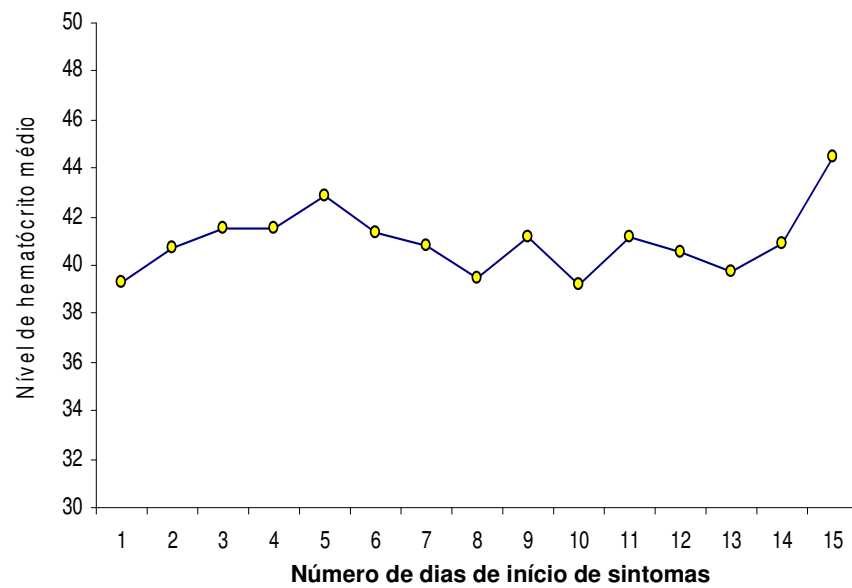


Figura 30 - Acompanhamento do nível de hematócrito médio ao longo dos 15 dias de início dos sintomas. Hematócrito expresso em %.

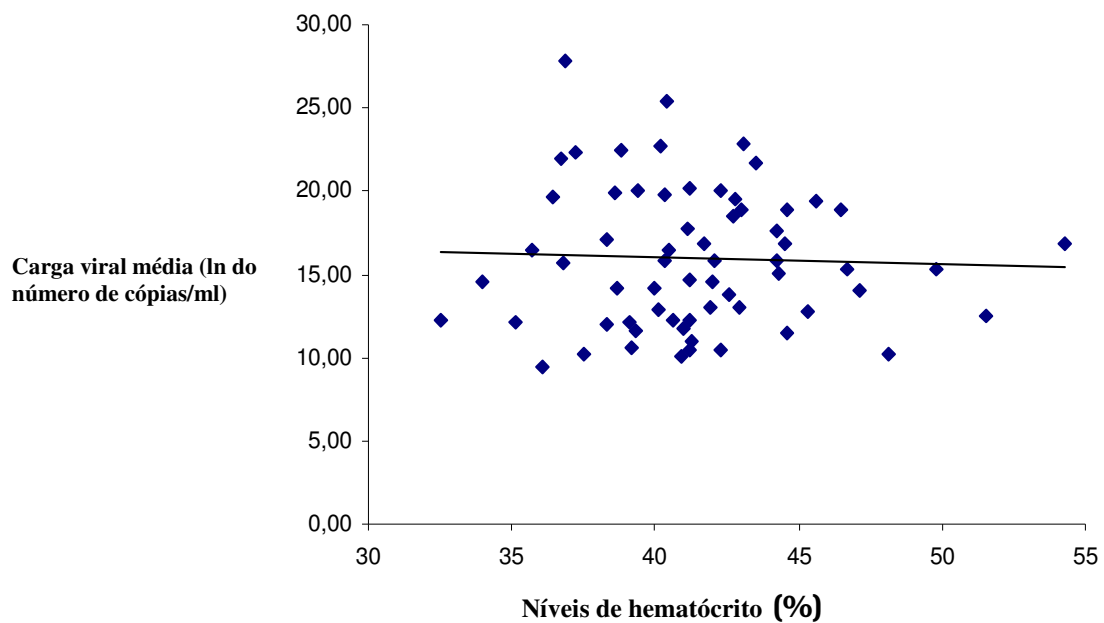


Figura 31 - Correlação da carga viral e níveis de hematócrito nas amostras coletadas na fase aguda da doença.

7.9 Associação entre carga viral e os níveis de transaminases

Considerando todas as determinações de transaminases realizadas no estudo, independentemente do tipo de infecção e forma clínica, foram encontrados valores de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) mais elevados que transaminase glutâmico pirúvica (TGP) em amostras coletadas até oito dias de início dos sintomas. A partir desse período, foram observados maiores níveis de TGP em relação à TGO (OR=6,05, $p<0,001$) (Figuras 32 e 33).

Não houve correlação estatística significativa entre os níveis de TGO ($p=0,483$) e TGP ($p=0,923$) e a carga viral (Figuras 34 e 35).

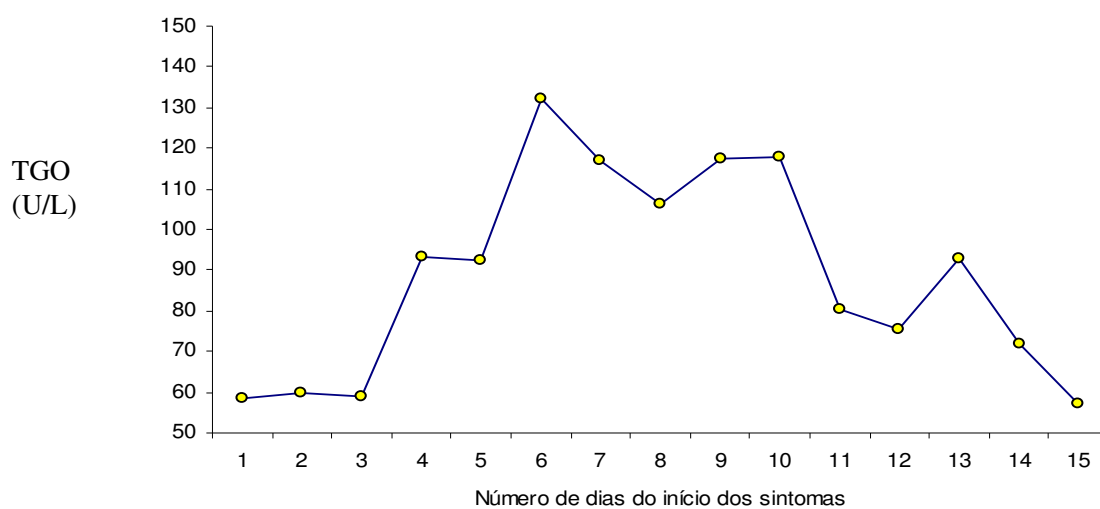


Figura 32 - Acompanhamento do nível médio de TGO (transaminase glutâmico oxalacética) ao longo dos 15 dias de início dos sintomas.

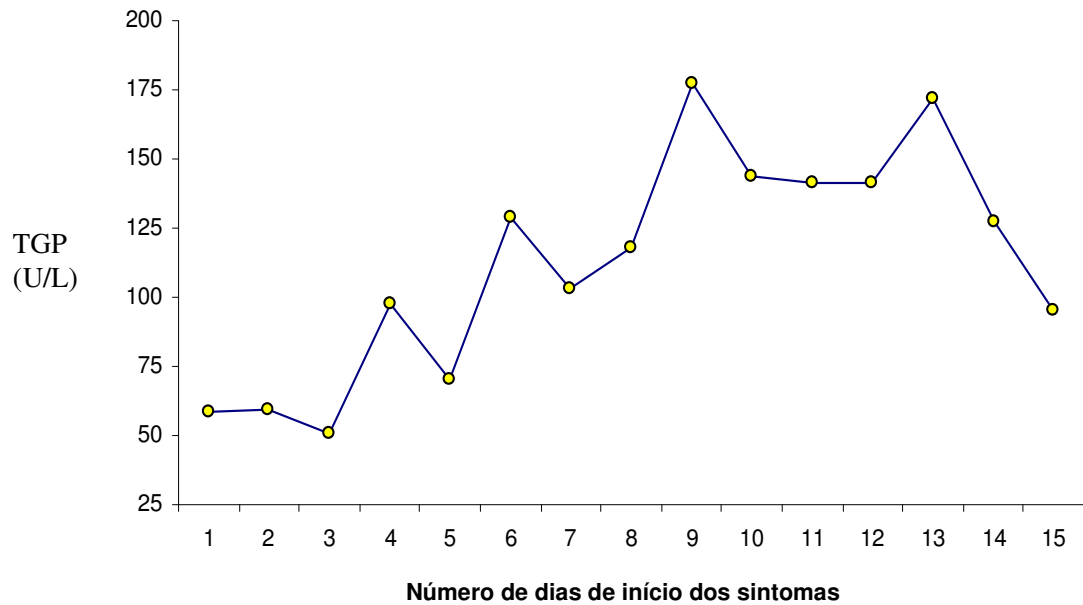


Figura 33 - Acompanhamento do nível médio de TGP (transaminase glutâmico pirúvica) ao longo dos 15 dias de início dos sintomas.

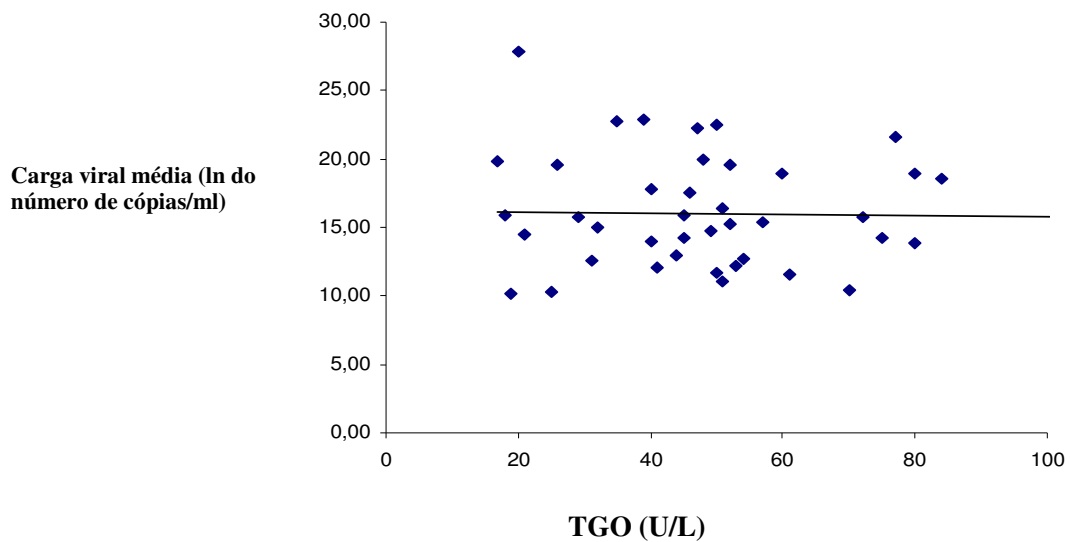


Figura 34 - Correlação da carga viral e níveis de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) nas amostras coletadas na fase aguda.

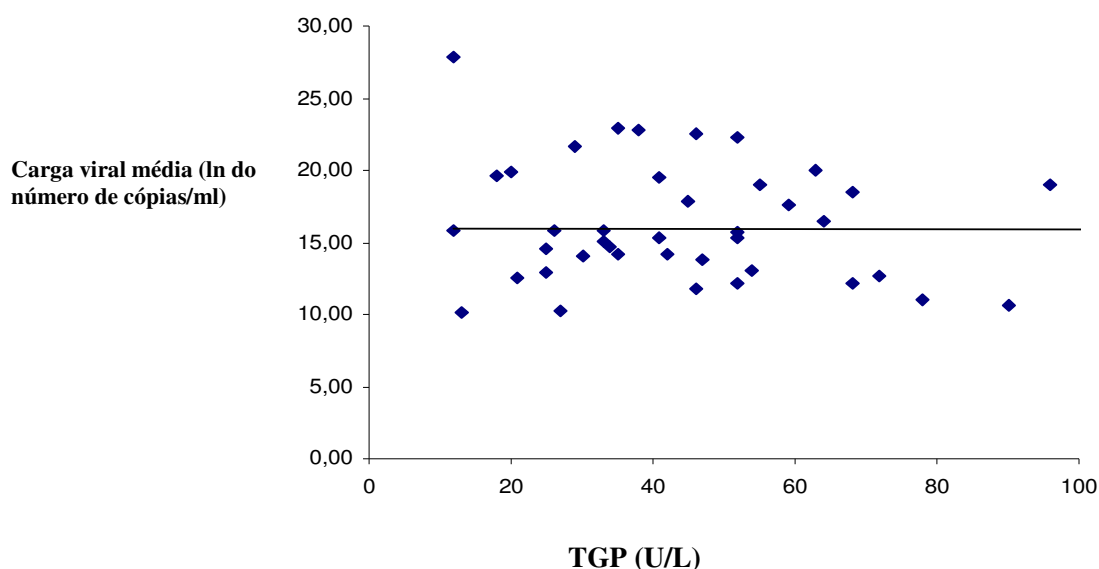


Figura 35 - Correlação da carga viral e níveis de transaminase glutâmico pirúvica (TGP) nas amostras coletadas na fase aguda.

Correlacionando-se os níveis de transaminases com o tipo de infecção, foram observados maiores níveis de TGO na infecção secundária do que na primária até o décimo dia de início dos sintomas, quando esses níveis começam a baixar e se equivalem em ambos tipos de infecção (Figura 36). Em relação à TGP, maiores níveis foram observados nos primeiros dias de sintomas na infecção secundária, elevando-se semelhantemente na forma primária a partir do sexto dia de início dos sintomas. Neste período, os valores de TGP são mais elevados do que os de TGO (Figura 37).

De acordo com a forma clínica, foram analisadas apenas as formas classificadas como DC e DCC, pelo fato de se ter nas outras formas um número pequeno de pacientes. A DCC apresentou níveis de TGO mais elevados, principalmente nos primeiros seis dias de início dos sintomas. Os níveis de TGP se elevaram em todo o período do estudo, mas com níveis mais baixos do que TGO nos seis primeiros dias de início dos sintomas (Figuras 38 e 39).

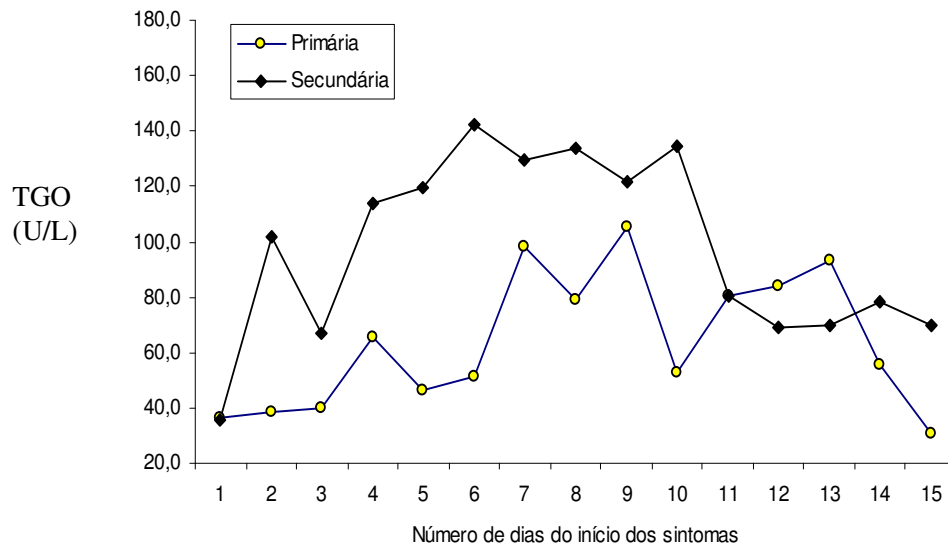


Figura 36 - Acompanhamento do nível médio de TGO ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo o tipo de infecção.

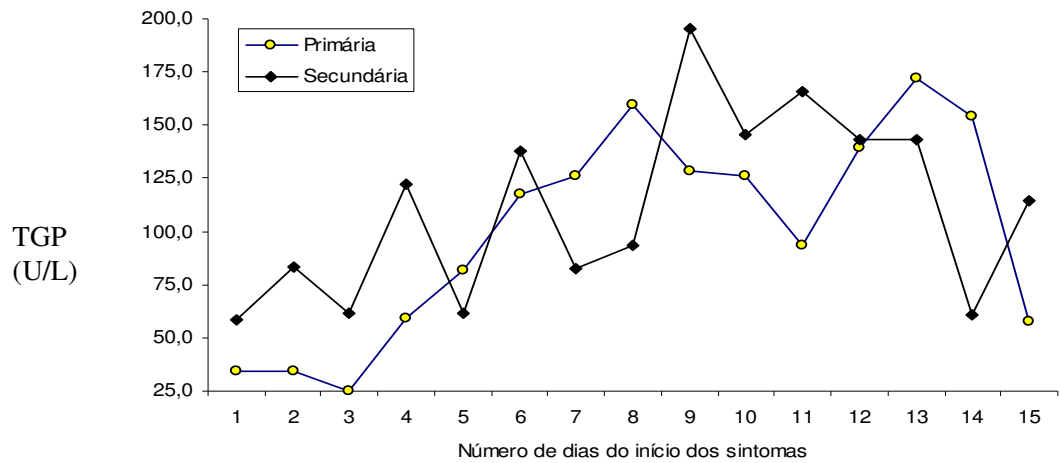


Figura 37 - Acompanhamento do nível médio de TGP ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo o tipo de infecção.

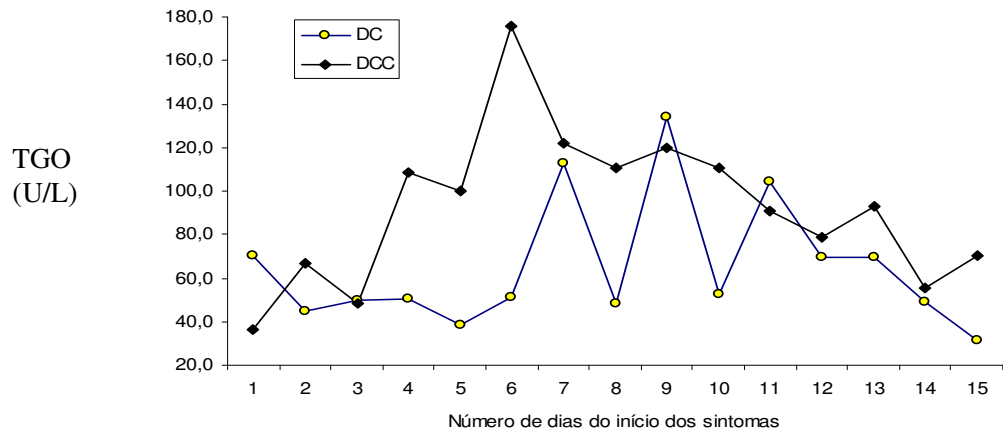


Figura 38 - Acompanhamento do nível médio de TGO ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo a forma clínica da doença.

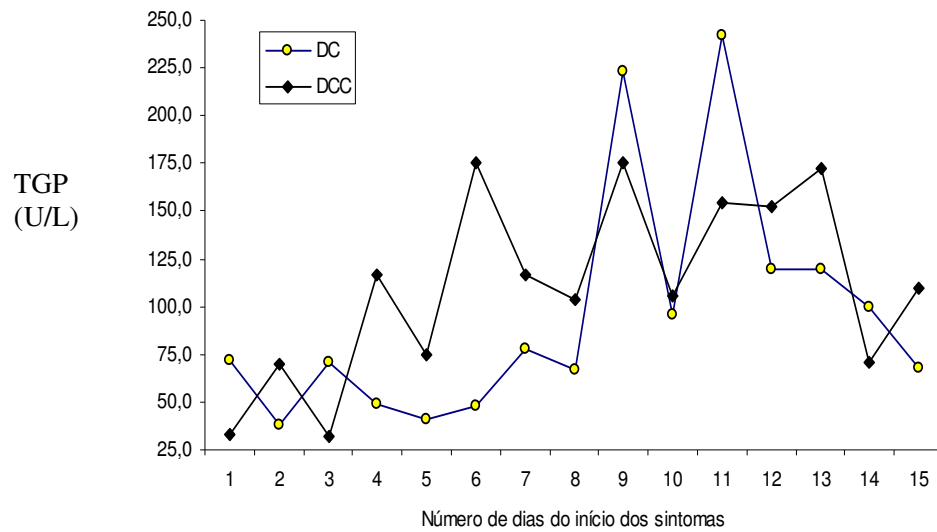


Figura 39 - Acompanhamento do nível médio de TGP ao longo dos 15 dias de início dos sintomas, segundo a forma clínica da doença.

7.10 Análise de correlação da carga viral das amostras utilizadas na validação do kit DSSS-P29 com o tipo de infecção e as formas clínicas

Além da análise de correlação com as amostras dos pacientes do estudo de cinética de viremia, também foi realizada a análise de correlação com as 209 amostras utilizadas para a validação do kit DSSS-P29, quanto à associação com o tipo de infecção e com as formas clínicas da dengue. Nesta análise, estão incluídas as primeiras amostras dos pacientes do estudo de cinética de viremia. Estas amostras correspondem ao período febril e foram coletadas entre o primeiro e o décimo dia de início dos sintomas.

7.10.1 Análise de correlação da carga viral com o tipo de infecção

A análise de correlação da carga viral com o tipo de infecção, semelhantemente ao estudo de cinética de viremia, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Ou seja, os níveis de carga viral foram semelhantes entre as infecções primária e secundária ($p = 0,69$) (Figura 40).

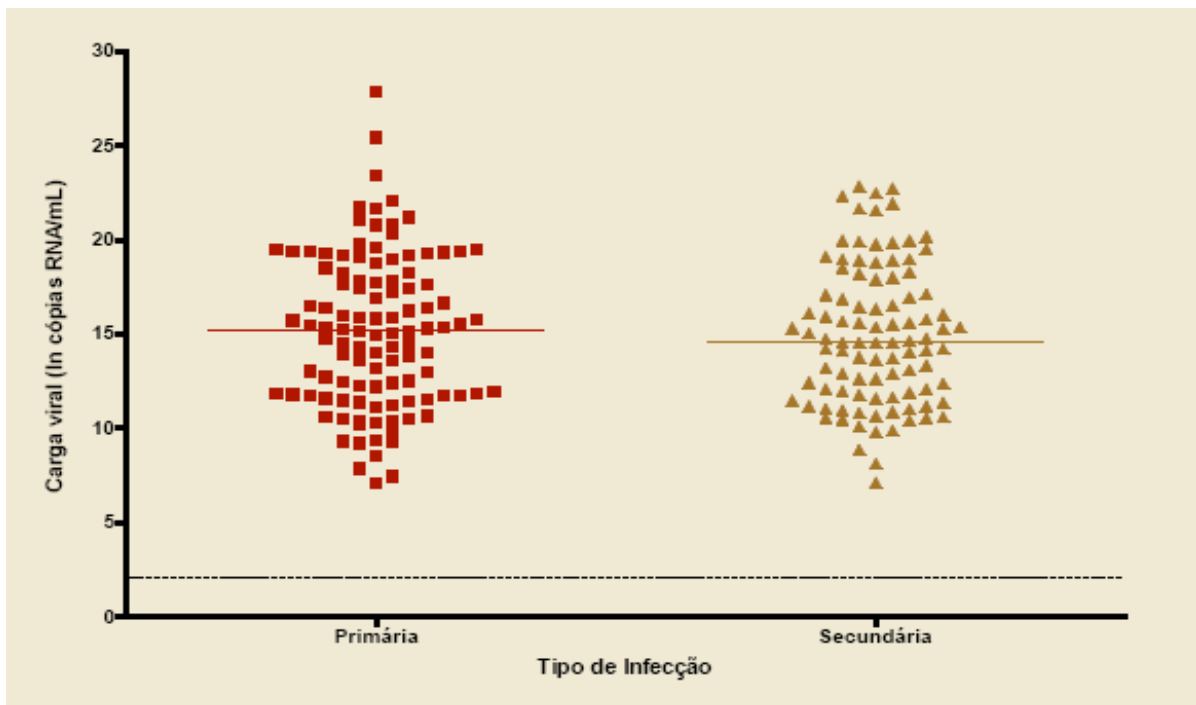


Figura 40 - Correlação da carga viral com o tipo de infecção.

Nota: Linha tracejada indica limite inferior de detecção do teste (10 cópias), expresso em ln.

7.10.2 Correlação da carga viral com as formas clínicas da doença

As medianas da carga viral se mostraram maiores nas formas mais graves da doença (DCC=6,9 e FHD=6,9) que em D (5,6) e DC (6,2). Os níveis de carga viral foram maiores nas formas mais graves da doença (DCC e FHD) que em D e DC ($p < 0,0001$) (figuras 41 e 42).

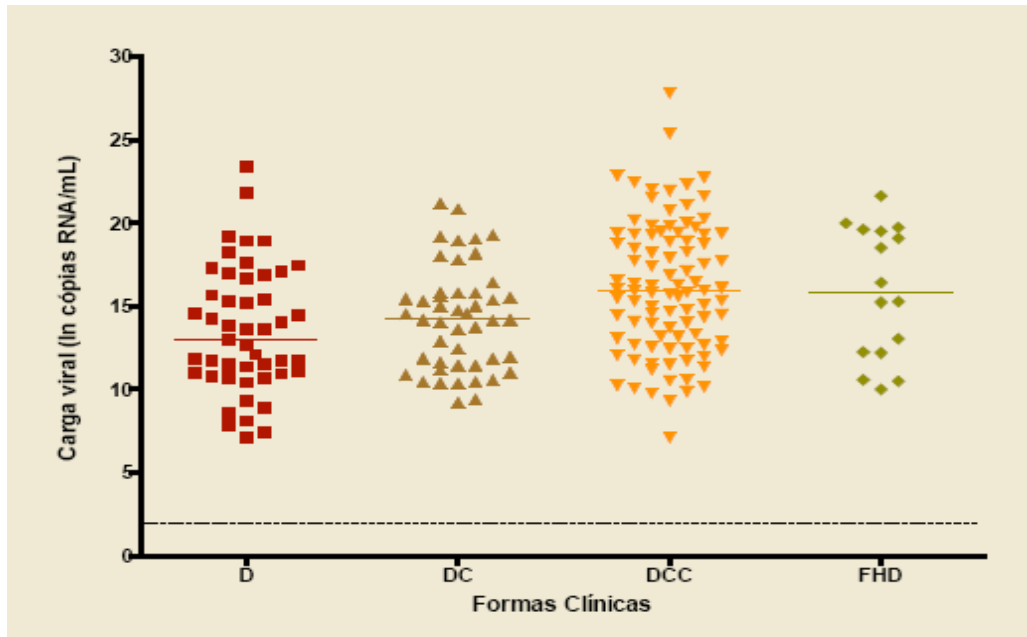


Figura 41 - Correlação da carga viral com as formas clínicas da doença ($p < 0,0001$).

Nota: linha tracejada indica limite inferior de detecção do teste (10 cópias), expresso em ln. D=dengue; DC=dengue clássica; DCC= dengue clássica complicada; FHD= febre hemorrágica da dengue.

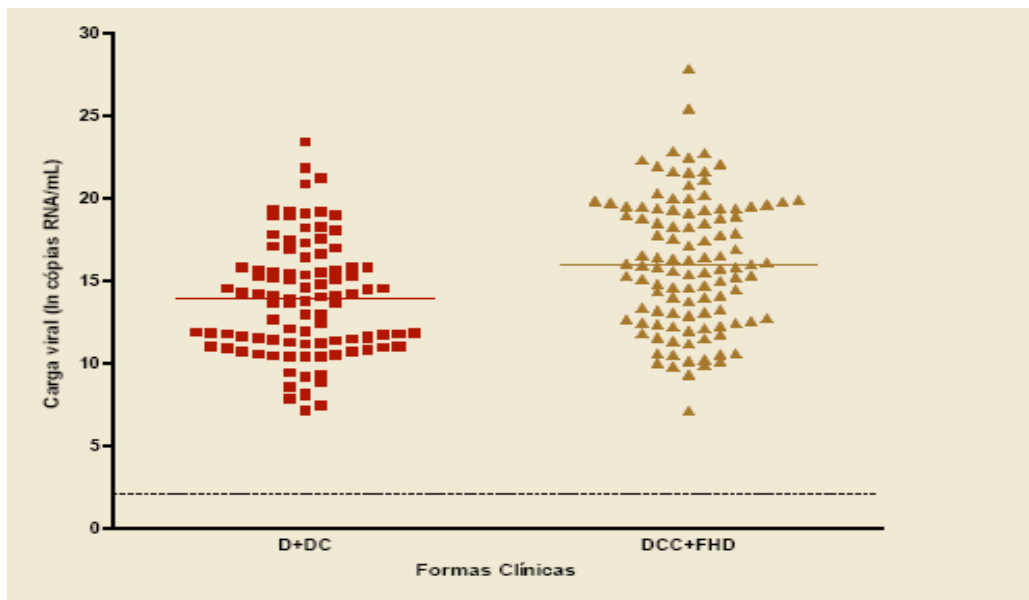


Figura 42. Correlação da carga viral com as formas clínicas da doença, agrupando as formas mais graves ($p < 0,0001$).

Nota: linha tracejada indica limite inferior de detecção do teste (10 cópias), expresso em ln. D=dengue; DC=dengue clássica; DCC= dengue clássica complicada; FHD= febre hemorrágica da dengue.

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

A febre hemorrágica e a síndrome de choque da dengue apresentam manifestações clínicas que se alteram rapidamente. O estudo da história natural da doença e da fisiologia da infecção são de grande importância para a compreensão dos mecanismos imunopatogênicos, assim como para definição das condutas clínicas mais apropriadas para cada caso. Dados laboratoriais variam dependendo do momento da coleta da amostra e durante o curso da doença. Por isso é importante analisar uma série de amostras, coletadas em diferentes momentos, quando se pretende estudar a cinética de viremia e identificar marcadores preditivos do desenvolvimento das formas mais graves.

Neste estudo foram utilizadas amostras seqüenciais de pacientes adultos, provenientes de uma coorte bem caracterizada, com infecções primária e secundária pelo vírus dengue sorotipo 3, não contendo amostras com outros sorotipos. Além dessas amostras seqüenciais, foram analisadas as primeiras amostras de 209 pacientes, também com infecção pelo vírus dengue sorotipo 3. As determinações de viremia foram realizadas através da utilização da técnica de PCR em tempo real, o que garante maiores sensibilidade e precisão nos resultados. Estudos combinando estas características são pouco citados.

Dois kits (DSSS-P26 e DSSS-P29), específicos para detecção e determinação de carga viral do vírus dengue sorotipo 3, foram testados e validados. Apesar dos dois kits apresentarem especificidades semelhantes, o kit DSSS-P29 foi escolhido e empregado no estudo de cinética de viremia. Os critérios utilizados para a escolha deste kit foram: menores coeficientes de variação entre as amostras, facilidade de análise de curva de dissociação, sobretudo em amostras com pequeno número de cópias, com pico de amplificação bem definidos. Com um limite de detecção de 10 cópias de RNA, o kit DSSS-P29 possibilitou a realização deste estudo.

Duas teorias tentam explicar a ocorrência da febre hemorrágica da dengue: a teoria da modificação de virulência (ROSEN, 1977) e a teoria das infecções seqüenciais heterotípicas (HALSTEAD, 1970). Ambas teorias predizem maior magnitude de replicação viral em pacientes com a forma mais grave da doença e justificam a ocorrência de elevados níveis de viremia, por características virais ou do hospedeiro, respectivamente. Diversos estudos têm buscado identificar padrões clínico-epidemiológicos e laboratoriais preditivos de gravidade da dengue,

correlacionando-os com níveis de viremia (ENDY et al., 2004; GUBLER et al., 1981; GUILLARDE et al., 2008; LAOPRASOPWATTANA et al., 2005; LIBRATY et al., 2002; MURGUE et al., 2000; WANG et al., 2006). No entanto, os estudos sobre a cinética de viremia em pacientes com diferentes formas clínicas de dengue são relativamente escassos, particularmente utilizando métodos precisos de quantificação viral.

A maioria desses estudos que busca correlacionar carga viral com a forma mais grave da doença foi realizada utilizando amostras coletadas de crianças com infecções secundárias (ENDY et al., 2004; LIBRATY et al., 2002; SUDIRO et al., 2001) e são a base do conhecimento que se tem, atualmente, sobre a patogênese da dengue, apresentando, contudo, os mais diferentes resultados. Estas diferenças demonstram a complexidade em associar níveis de circulação de vírus com o desenvolvimento de gravidade da doença.

Este estudo apresenta algumas características que favorecem uma análise mais clara, uma vez que foi realizado em uma coorte bastante homogênea, cujas amostras foram coletadas em um período em que apenas o vírus dengue sorotipo 3 estava circulando de forma endêmica, e com mais de cinco anos após ter ocorrido as epidemias pelo DENV-1 e DENV-2. Esta condição leva à redução de alguns fatores complicadores e permite estudar o comportamento de infecções causadas pelo DENV-3 e um só genótipo (genótipo Índia Subcontinental) (CORDEIRO, 2008).

Neste estudo foi demonstrado que os níveis de viremia das infecções primárias e secundárias de dengue 3 são basicamente os mesmos, sugerindo que nesta coorte, a presença de anticorpos contra dengue 1 ou 2 não induziram necessariamente um maior nível de viremia ou alterações significantes na cinética da viremia (Figura 22). Isto sugere que a presença de anticorpos não neutralizantes não interfere indiscriminadamente nos níveis de viremia. Quando analisadas as cinéticas das viremias e as formas clínicas da doença, também não foi detectada uma diferença significativa (Figura 23). O tempo mediano de duração da viremia foi de 10 dias e também não apresentou correlação com a gravidade da doença ou estado de imunidade do paciente. A carga viral máxima foi observada no início da fase aguda da doença, entre o primeiro e terceiro dia de início dos sintomas. Foi detectada viremia após o desaparecimento da febre (defervescência, definida como queda e permanência da temperatura para valores menores que 38 °C) em todas as formas clínicas, porém em níveis mais baixos do que durante o período febril.

Quando realizada análise de correlação apenas com a primeira amostra de cada paciente, coletada na fase febril, não houve associação entre o nível de carga viral e o tipo de infecção

(primária ou secundária) (Figura 40), reforçando que a presença de anticorpos contra infecção prévia por dengue 1 e 2, não aumentaram significativamente a taxa de replicação viral do DENV-3. Porém, os níveis de viremia foram maiores nas formas mais graves de dengue (FHD e DCC), em presença de plaquetopenia, que em D e DC (Figuras 41e 42), indicando que o nível de viremia está associado com a sintomatologia e a presença de plaquetopenia.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram achados de alguns autores (HARRIS et al., 2000; VAUGHN et al., 1997; 2000) e ao mesmo tempo sugerem um comportamento diferente nas infecções entre populações das Américas e Ásia. Com relação aos estudos que tentam demonstrar correlações entre a carga viral e as formas mais graves da doença, a maioria deles foi realizada em crianças, incluindo mais de um sorotipo do vírus dengue, e os mais diversos resultados têm sido obtidos.

Diferentemente do presente estudo, Harris et al. (2000) estudaram o comportamento das infecções por dengue em crianças e em mais de um sorotipo, encontrando, no entanto, resultados semelhantes. Eles não observaram correlação entre infecções secundárias e a gravidade da doença em 614 casos confirmados de dengue na Nicarágua. Nesse mesmo estudo foi observado maior número de casos de FHD em infecções pelo DENV-3 do que pelos sorotipos DENV-2 ou DENV-4.

Ainda estudando crianças com infecções pelos sorotipos 1 e 2, em dois hospitais da Tailândia, Vaughn et al. (2000) relataram o achado de picos de títulos 100 a 1000 vezes maiores na SCD do que na DC. Esses autores não encontraram relação entre a duração da viremia e a gravidade da doença, mas observaram que a viremia era mais prolongada nas infecções primárias do que nas secundárias (principalmente com o sorotipo 2). Esta diferença não foi observada em relação ao DENV-3. Em um estudo prévio realizado por Vaughn et al. (1997), incluindo infecções pelos quatro sorotipos, esses autores não encontraram correlação entre gravidade da doença e sorotipo do vírus infectante. Nesses estudos, foi utilizada a técnica de inoculação de mosquitos *Toxorhynchites splendens* para determinação da cinética e duração da viremia, assumindo que a viremia permanecia do dia do início dos sintomas até o último dia em que o isolamento viral resultou negativo. A presença de anticorpos pode interferir com o sucesso do isolamento viral (GUBLER, 1998; VORNDAM; KUNO, 1997), mas não com os métodos moleculares de detecção do vírus, o que poderia explicar a menor detecção de vírus, e, portanto, o período mais curto de viremia em infecções secundárias.

Sudiro et al. (2001), através da determinação da carga viral por uma RT-PCR competitiva, analisaram amostras de 31 crianças com infecções secundárias pelos vírus dengue sorotipos 1 e 2, e não verificaram diferença significativa entre a viremia em crianças com DC ou com FHD. Murgue et al. (2000) realizaram um estudo prospectivo com crianças da Polinésia Francesa infectadas com DENV-1 e DENV-2, encontrando forte associação entre carga viral, forma clínica e duração da viremia em indivíduos infectados com DENV-2 e fraca associação em indivíduos infectados com DENV-1. Estes estudos têm a desvantagem de terem sido realizados com infecções por mais de um sorotipo, em crianças apenas com infecções secundárias.

Endy et al. (2004) não encontraram diferença entre os níveis de carga viral e a forma clínica da doença. Nesse mesmo estudo, foi avaliado o papel dos níveis de anticorpos neutralizantes preexistentes, reativos para o sorotipo do vírus dengue infectante, capazes de modificar as infecções secundárias, que variam dependendo da seqüência da infecção. O estudo foi realizado também em crianças com infecção secundária por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3.

Hammond et al. (2005), estudando uma população de 3.173 casos suspeitos de dengue, composta de crianças e adultos, identificaram infecções secundárias como fator de risco de FHD em crianças, mas não em adultos, sugerindo um padrão de doença com caráter diferente entre adultos e crianças.

Alguns estudos têm relatado viremia mais prolongada na FHD do que na DC. Wang et al. (2003) realizaram um estudo com 20 adultos (23 a 70 anos) de Taiwan infectados por DENV-3, encontrando níveis de viremia maiores que 10^4 cópias/ml de plasma durante a fase de defervescência em pacientes com FHD, enquanto pacientes com DC apresentavam níveis indetectáveis. Eles sugerem que os vírus encontrados em pacientes com FHD sejam vírus defectivos, contendo grandes deleções genômicas, como uma tentativa de explicar a ausência de correlação encontrada por Gubler et al. (1981), que utilizou isolamento viral como técnica para determinação da carga viral. No entanto, eles salientam a necessidade de estudos com número maior de casos e coleta entre a fase aguda e de convalescença da doença para definição de um marcador ou valor preditivo fidedigno para FHD. Wang et al. (2006), estudando adultos infectados com DENV-2, sugeriram que a detecção de carga viral, após o desaparecimento da febre, pode ser utilizada como fator preditivo de FHD.

Um dos estudos mais citados sobre viremia (LIBRATY et al., 2002), analisou amostras de crianças da Tailândia com infecção secundária por DENV-3, observando maiores níveis de carga

viral em pacientes apresentando FHD e forma intermediária de DC/FHD. Apesar de ter trabalhado com amostras seqüenciais, Libraty et al. (2002) utilizaram apenas os valores máximos das variáveis para estabelecimento da correlação.

Mais recentemente, Guillard et al. (2008), estudando uma coorte, também de adultos como a do presente trabalho, porém com DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em Goiás, Brasil, relataram não ter encontrado correlação entre carga viral e tipo de infecção, mas encontraram viremia detectável após defervescência, apenas em pacientes com FHD ou forma intermediária de DC/FHD.

Na coorte da qual os pacientes aqui estudados fazem parte, não foi observada diferença entre a frequência de infecção primária e secundária, tanto para os casos de FHD, como para os de DCC (CORDEIRO et al., 2007a). Em um estudo incluindo os padrões clínicos dessa mesma coorte (BRITO, 2007), foi observado que a FHD foi mais prevalente entre adultos do que em crianças. O padrão de manifestações clínicas foi semelhante entre as diferentes faixas etárias com dengue clássica, mas com baixa prevalência de casos de FHD entre a faixa pediátrica quando comparada com adultos, o que indica um padrão de doença com caráter mais benigno entre as crianças infectadas pelo vírus dengue sorotipo 3 em nossa região.

Esses dados diferem do padrão epidemiológico observado na Ásia, onde circulam os quatro sorotipos, e as formas mais graves da doença têm sido observadas em crianças (ENDY et al., 2002). De acordo com um estudo realizado em Cuba (GUZMÁN et al., 2002), o risco de uma criança morrer durante uma infecção secundária pelo vírus dengue sorotipo 2 é aproximadamente 15 vezes maior que o risco em adultos. Esses resultados demonstram que a idade é uma importante variável nas infecções secundárias, mas que outros fatores devem estar envolvidos na patogênese da FHD. É possível que com o surgimento de novas epidemias e a entrada de mais um sorotipo (DENV-4), o padrão epidemiológico atual da nossa região seja modificado.

8.1 Viremia e plaquetas

Em relação à determinação dos níveis de plaquetas, os valores mais baixos foram encontrados entre o quinto e o sétimo dias de início dos sintomas (Figura 24). Ao contrário do que foi observado por Libraty et al. (2002), não foi encontrada correlação dos mesmos com o nível de viremia (Figura 25). As infecções primárias e as formas mais graves da doença apresentaram os valores mais baixos (Figuras 26-29). Após esses valores serem atingidos, elevação acima de $100.000/\text{mm}^3$ foi observada após dois a três dias. Associações entre níveis de plaquetas e tipo de infecção não têm sido frequentemente citadas, apesar de trombocitopenia ser um achado constante nos casos de FHD e muito comum em DC (SRICHAIKUL; NIMMANNITYA, 2000).

Estudo sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos da dengue no Recife (MONTENEGRO et al., 2006) revelou diminuição de plaquetas, cerca de duas vezes em pacientes com sangramentos, comparados com aqueles que não sangraram. No entanto, a intensidade de sangramento não tem apresentado correlação com os níveis de plaquetas. Foi demonstrado que apenas 15% dos casos de choque (Grau IV) com plaquetopenia inferior a $50.000/\text{mm}^3$ apresentavam sangramentos graves (SRICHAIKUL; NIMMANNITYA, 2000).

8.2 Viremia e hematócrito

O percentual de hemoconcentração, avaliado através da determinação de hematócrito, não apresentou correlação com o nível de carga viral (Figura 31), ao contrário do que foi observado por Libraty et al. (2002).

A pequena variação do hematócrito entre as amostras analisadas durante este estudo (Figura 30), comumente observada em adultos, demonstra a dificuldade em se utilizar esse parâmetro como critério para confirmação e classificação dos casos suspeitos. Diante da necessidade de identificação de um valor basal de hematócrito para fechar o critério da Organização Mundial da Saúde (1987) quanto à hemoconcentração (aumento de 20%), muitas vezes só se consegue fechar tal critério na fase de convalescença (BRITO, 2007; CORDEIRO, 2008). Tem sido proposto que

hemoconcentração isoladamente não seja apropriada para definição de alterações de permeabilidade capilar, uma vez que o aumento de hematócrito pode ser mascarado em determinadas situações, como administração precoce de fluídos intravenosos e quando há perda excessiva de sangue devido a hemorragias (BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2006).

Existem, atualmente, vários questionamentos sobre os critérios utilizados pela OMS para definição e classificação dos casos de FHD, sugerindo reavaliação dos mesmos, principalmente em relação à utilização da hemoconcentração para demonstração de alterações de permeabilidade, que considerem variações geográficas e de faixa etária (BALMASEDA et al.; 2005; BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2006; RIGAU-PÉREZ, 2006).

8.3. Viremia e transaminases

O impacto da dengue sobre a função hepática tem sido estudado através da avaliação dos níveis de transaminases, achado muito freqüente na infecção pelo vírus dengue. Hepatite fulminante tem sido relatada como um achado incomum, podendo ser associada com qualquer um dos sorotipos. O sorotipo 1 tem sido observado apresentando maior tropismo pelo fígado do que os outros tipos (LING; WILDER-SMITH; LEO, 2007).

Nesse estudo, maiores níveis de transaminase glutâmico oxalacética foram encontrados nos oito primeiros dias da doença (Figura 32). Resultados semelhantes foram observados por Souza et al. (2007) e Kuo et al. (1992). Os níveis de TGO não correlacionaram com a carga viral (Figura 34), porém foram mais elevados em infecções secundárias (Figura 36) e na forma mais grave da doença avaliada (DCC) (Figura 38). Após a primeira semana, os níveis de transaminase glutâmico pirúvica se elevaram semelhantemente aos valores encontrados para TGO (Figura 33), enquanto esta progride para os valores normais, mas sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre os tipos de infecção primária e secundária (Figura 37). Em relação às formas clínicas avaliadas, os níveis de TGP foram mais elevados na primeira semana de início dos sintomas na DCC (Figura 39), permanecendo elevadas por mais tempo que a TGO. A partir da primeira semana, não houve diferença significativa entre as formas clínicas e os valores de TGP.

A redução mais precoce da TGO se deve provavelmente ao tempo médio de vida mais curto dessa enzima (12,5 – 22 horas) em relação à TGP (32 – 43 horas) (SENEVIRATNE; MALAVIGE; SILVA, 2006). Os níveis mais elevados da TGO do que da TGP têm sido atribuídos à liberação da TGO pelos miócitos lesados durante a infecção (KUO, 1992). Essa elevação também tem sido atribuída ao uso de antieméticos durante a fase aguda da doença, os quais poderiam potencializar o dano hepático (LING; WILDER-SMITH; LEO, 2007; SOUZA et al., 2004).

Libraty et al. (2002) também não encontraram associação entre os níveis de transaminases e carga viral, mas observaram maior elevação de TGO em relação à TGP. Entretanto, estes autores não estudaram a correlação dessas enzimas com as formas clínicas e realizaram o estudo apenas com amostras de pacientes com infecções secundárias. Em um estudo realizado por Kalayanarooj et al. (1997), foram encontrados níveis mais elevados de TGO em crianças com FHD que naquelas com DC, sendo esse achado sugerido como valor preditivo negativo para FHD. Wichmann et al. (2007) observaram níveis medianos de TGO e TGP mais elevados em pacientes com sangramentos espontâneos e outras manifestações graves.

A alteração da função hepática tem sido atribuída principalmente ao efeito direto do vírus dengue sobre esse órgão. Entretanto, uma resposta imunológica desregulada do hospedeiro contra o vírus pode ter um papel importante (SENEVIRATNE; MALAVIGE; SILVA, 2006). O achado de maiores níveis de transaminases nas formas mais graves da doença e em infecções secundárias sem, no entanto, correlacionar com a viremia, pode ajudar na compreensão do processo imunopatológico da infecção.

As diferentes manifestações de DC, FHD e SCD podem ser causadas por variantes do vírus dengue. Diferenças estruturais têm também sido encontradas em vírus isolados de pacientes com DC e FHD (LEI et al., 2001). Em geral, genótipos asiáticos parecem ser mais virulentos do que aqueles encontrados inicialmente nas Américas e Pacífico Sul (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Além disso, o padrão clínico-epidemiológico da dengue nas Américas tem apresentado comportamento diferente do observado na Ásia, onde as formas graves da doença têm sido frequentemente descritas em crianças (BRITO, 2007). Isto pode ser explicado pelo fato da maioria dos países das Américas não ter ainda os quatro sorotipos circulando concorrentemente como na Ásia, havendo ainda adolescentes e adultos susceptíveis a novos sorotipos.

A patogênese da dengue é um processo multifatorial e exceções freqüentemente ocorrem (ENDY et al., 2004). A epidemiologia da dengue tem variado de país para país e possivelmente de acordo com o sorotipo e a cepa do vírus, o que salienta a necessidade de se estudar as características epidêmicas em diferentes regiões (HARRIS et al., 2000). Além disso, fatores virais e do hospedeiro parecem operar de maneira desigual em diferentes regiões do mundo e entre populações geneticamente diferentes. Outros mecanismos de patogênese, independentes da ocorrência de infecções secundárias, devem estar envolvidos na gravidade da dengue. Para entender esses mecanismos devem ser realizados estudos de fatores virais e interações vírus-vetor e vírus-hospedeiro (MURGUE et al., 2000).

As evidências sugerem que ambos os fatores, virais e imunes do hospedeiro estão envolvidos na patogênese da gravidade da dengue. Infelizmente, o papel de cada um deles não é completamente entendido e a falta de um modelo animal tem dificultado os estudos nessa área. Como conseqüência, estudos como este aqui descrito, podem servir de base para investigações de correlações com fatores genéticos e imunológicos, como as que já vêm sendo desenvolvidas pelo nosso grupo.

CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

- Os níveis de viremia foram semelhantes em infecções primárias e secundárias.
- A cinética e duração da viremia se apresentaram muito similares nas diferentes formas clínicas da doença.
- Os níveis de carga viral foram mais elevados nas formas mais graves da dengue, quando analisadas amostras coletadas no período febril (análise em amostra única).
- A carga máxima de viremia ocorreu entre o primeiro e terceiro dia de início dos sintomas.
- Foi detectada viremia após o desaparecimento da febre em todas as formas clínicas, porém em níveis mais baixos do que durante o período febril.
- A redução dos níveis de plaquetas foi mais acentuada nas infecções primárias que nas secundárias, e valores mais baixos ocorreram durante o quinto e o sétimo dia de início dos sintomas.
- Os níveis de TGO foram mais elevados em amostras coletadas até oito dias, em infecções secundárias e na forma clínica DCC.
- Os níveis de TGP foram mais elevados a partir do oitavo dia de início dos sintomas, com valores semelhantes entre os tipos de infecção primária e secundária.
- Na DCC, a TGP foi mais elevada na primeira semana de início dos sintomas, a partir da qual os níveis foram semelhantes aos da forma mais branda da doença.
- A TGP permaneceu alterada por mais tempo que a TGO.
- Os níveis de carga viral e cinética de viremia nas amostras analisadas não possibilitaram prever a gravidade da dengue.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANWAR, A.; AUGUST, J. T.; TOO, H. P. A stem-loop-mediated reverse transcription real-time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 352, p. 120-128, 2006.

BALMASEDA, A. et al. Assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, p. 1059-1062, 2005.

BANDYOPADHYAY, S.; LUM, L.C.S.; KROEGER, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case definition for dengue haemorrhagic fever. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 8, p. 1238-1255, 2006.

BARTENSCLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, London, v. 3, n. 2, p. 155-165, 2008.

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

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, London, v. 25, p. 169-193, 2000.

CACEDA, E. R.; KOHEL, T. J. Application of Modified Shell Vial Culture Procedure for Arbovirus Detection. **PLoS ONE**, San Francisco, v.2, n. 10, p. 1-4, 2007.

CALLAHAN, J. D. et al. Development and Evaluation of Serotype- and Group- Specific Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan) Assays for Dengue Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 11, p. 4119-4124, 2001.

CATTAND, P. et al. Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis. In: Jamison, D. T. **Disease Control Priorities in Developing Countries**, 2. ed. Washington: The World Bank Group, 2006. p. 451-466.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Dengue**: Clinical and Public Health Aspects. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/slideset/portuguese/index.htm>. Acesso em 25 abr 2008.

CHANG, G. J. Molecular biology of dengue virus. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, 1997. p. 175-197.

CHIEN et al. Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays To Detect and Serotype Dengue Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1295-1304, 2006.

CHUTINIMITKUL, S. et al. Dengue typing assay based on rel-time PCR using SYBR Green I. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 129, p. 8-15, 2005.

CLARKE, D. H., CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.7, p. 561-573, 1958.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

CORDEIRO, M. T. **Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987 – 2006**: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

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, 2007a.

CORDEIRO, M. T. Dengue in State of Pernambuco, Brazil, 1995-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 6, p. 605-611, nov/dez. 2007b.

CORDEIRO, M. T. et al. Comparative Analysis of the Kinetics of Dengue Diagnostics Assays. **Virus Review & Research**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 207, 2004.

- DANTAS, V. C. S.; PASSONI, L. F. C. Dengue: novas manifestações de uma velha doença – “Relato de caso e estudo comparativo entre o vírus do dengue sorotipo 3 e o da febre amarela”. **Revista Médica do Hospital dos Servidores do Estado**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 1-13, 2003.
- 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.
- DE SIMONE, T. S. et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.98, p. 553-562, 2004.
- DORAK, M. T. Real-time PCR. **Advanced Method Series**, London, p. 1-11, 2006. Disponível em: <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>. Acesso em: 05 abr. 2008.
- DUSSART, F. et al. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, n. 11, p. 1185-1189, 2006.
- ENDY, T. P. et al. Relationship of Preexisting Dengue Virus (DV) Neutralizing Antibody Levels to Viremia and Severity of Disease in a Prospective Cohort Study of DV Infection in Thailand. **The Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, p. 990-1000, 2004.
- ENDY, T. P. et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection : A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 156, p. 40-51, 2002.
- FIGUEIREDO, R. M. P. et al. Dengue Vírus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Vacinas contra o Dengue. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 21-25, 1999.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Dengue**: Aspectos Epidemiológicos, Diagnóstico e Tratamento. Brasília, DF, 2002. p. 1-20. (série A, Normas e Manuais Técnicos, n. 176).

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **BMJ (British Medical Journal)**, London, v. 324, p. 1563-1566, 2002.

GOMES, A. L. V. **Identificação de focos de transmissão de esquistossomose através da detecção molecular de moluscos vetores infectados com *Schistosoma mansoni***. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

GOMES, A. L. V. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 145, p. 76-79, 2007.

GOMES-RUIZ, A. C. et al. SYBR Green and TaqMan Real-Time PCR Assays Are Equivalent for the Diagnosis of Dengue Virus Type 3 Infections. **Journal of Medical Virology**, Washington, v. 78, p. 760-763, 2006.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 100-103, 2002.

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

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

GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infectious Agents and Diseases**, New York, v. 2, p. 383-393, 1994.

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

GUBLER, D. J. et al. Viremia in patients with naturally acquired dengue infection. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 59, p. 623-630, 1981.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. **Emerging Themes in Epidemiology**, London, v. 2, p. 1-10, 2005.

GUILLARDE, A. O. et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. **The Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 197, p. 817-824, 2008.

GUZMÁN, M. G.. Deciphering Dengue: The Cuban Experience. **Science**, Washington, v. 309, p. 1495-1497, 2005.

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

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v.27, p. 1-3, 2003.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p. 33-42, 2002.

GUZMÁN, M. G. et al. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 6, p. 118-124, 2002.

HALSTEAD, S. B. Dengue Virus-Mosquito Interactions. **The Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 273-291, 2008.

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

HALSTEAD, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D. J. E KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, 1997. p. 23-44.

HALSTEAD, S. B.; ROJANASUPHOT, S.; SANGKAWIBHA, N. Original Antigenic Sin in Dengue, **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 32, n. 1, p. 154-156, 1983.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 42, p. 350, 1970.

HAMMOND, S. N. et al. Differences in Dengue Severity in Infants, Children, and Adults in a 3-year Hospital-Based Study in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 1063-1070, 2005.

HARRIS et al. Clinical, Epidemiologic, and Virologic Features of Dengue in the 1998 Epidemic in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 63, p. 5-11, 2000.

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

HENCHAL, E. A. et al. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.31, p. 830-836, 1982.

HOUNG, H-S. H.; HRITZ, D.; KANESA-THASAN, N. Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'- noncoding sequence. **Journal of Virological Methods**, v. 86, p. 1-11, 2000.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **The Journal of General Virology**, London, v. 40, p. 531-544, 1978.

ITO, M. et al. Development and Evaluation of Fluorogenic TaqMan Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection of Dengue Virus Types 1 to 4. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5935-5937, 2004.

JOHNSON, B. W.; B. J. RUSSEL; LANCIOTTI, R. S. Serotype- Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 10, p. 4977-4983, 2005.

KALAYANAROOJ, D. W. et al. Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, p. 313-321, 1997.

KAO, C-L et al. Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection : current and future perspectives in clinical diagnosis an public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taiwan, v. 38, p. 5-16, 2005.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantification of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 138, p. 123-130, 2006.

KUO, C. H. et al. Liver biochemical tests and dengue fever. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 47, p. 265-270, 1992.

KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever : challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, v. 11, p. 301-311, 2001.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid Detection and Typing of Dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase Polymerase chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 545-551, 1992.

LAOPRASOPWATTANA, K. et al. Dengue Virus (DV) Enhancing Antibody Activity in Preillness Plasma Does Not Predict Subsequent Disease Severity or Viremia in Secondary DV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 192, p. 510-519, 2005.

LAUE, T.; EMMERICH, P.; SCHIMITZ, H. Detection of Dengue Virus RNA in Patients after Primary or Secondary Dengue Infection by Using the TaqMan Automated Amplification System. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n. 8, p. 2543-2547, 1999.

LEI, H-Y. et al. Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **Journal of Biomedical Science**, Dordrecht, v.8, p. 377-388, 2001.

LIBRATY, D.H. et al. Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.185, p. 1213-21, 2002.

LIGON, B.L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: A review of the history, transmission, treatment, and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, New York, v.16, n.1, p. 60-65, 2004.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, New York, v. 59, p. 23-61, 2003.

LING, L. M.; WILDER-SMITH, A., LEO, Y. S. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 38, p. 265-268, 2007.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MAIHURU, A.T.A. et al. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. **European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Heidelberg, v. 23, p. 425-433, 2004.

MCBRIDE, W. J. H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, p. 1041-1050, 2000.

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. 9-13, 2006.

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

MURGUE, B. et al. Prospective Study of the Duration and Magnitude of Viraemia in Children Hospitalised During the 1996-1997 Dengue-2 Outbreak in French Polynesia. **Journal of Medical Virology**, New York, v.60, p. 432-438, 2000.

NGUYEN, T.L.; NGUYEN, T.H.; TIEU, N.T. The Impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. **Research in Virology**, Amsterdam, v.148, p. 273-277, 1997.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 33, p. 10-13, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue Prevention and control**. Geneva, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for Treatment of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in Small Hospitals**. 1999. p. 1-28. New Dehli:Regional Office for South-East Asia,

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle**. Genebra, 1987.

PANG. T.; CARDOSA, M. J.; GUSZMÁN, M. G. Of Cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunology and Cell Biology**, Canberra, v. 85, p. 43-45, 2007.

- PARIDA, M. et al. Rapid Detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 6, p. 2895-2903, 2005.
- PIRES NETO, R. J. et al. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, p. 843-852, 2005.
- POERSCH, C. O. et al. Dengue Virus Infections : comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 32, p. 272-277, 2005.
- RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advances in virus Research**, New York, v. 59, p. 315-341, 2003.
- RIGAU-PÉREZ, J. G. Severe dengue: the need for new case definitions. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, p. 297-302, 2006.
- RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. The reappearance of dengue-3 and subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 355-362, 2002.
- RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **The Lancet**, London, v.352, p. 971-977, 1998.
- ROSEN, L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26, p. 337-343, 1977.
- ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 113, p. 946-951, 2004.
- ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, New York, v. 257, p. 1-6, 1999.
- SABIN, A. B. Research on Dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.1, n.30, p.30-50, 1952.

SCHILLING, S. et al . Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 31, p. 179-184, 2004.

SENEVIRATNE, S. L., MALAVIGE, G. N., SILVA, H. J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 100, p. 608-614, 2006.

SHU, P-Y; HUANG, J-H. Current Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n.4, p. 642-650, 2004.

SHU, P-Y et al. Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 10, n. 4, p. 622-630, 2003.

SIERRA, B. C.; KOURI, G.; GUZMÁN, M. G. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **Archives of Virology**, Heidelberg, v. 152, p. 533-542, 2007.

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.

SOUZA, L. J. et al. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferases levels. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v.11, n. 4, p. 407-410, 2007.

SOUZA, L. J. et al. Aminotransferase Changes and Acute Hepatitis in Patients With Dengue Fever : Analysis of 1,585 Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 156-163, 2004.

SRICHAIKUL, T.; NIMMANNITYA, S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. **Baillières Clinical Haematology**, London, v.13, n.2, p. 261-276, 2000.

STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.83, p. 308-314, 2005.

SUDIRO, T. M. et al. Analysis of Plasma Viral RNA Levels During Acute Dengue Virus Infection Using Quantitative Competitor Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 63, p. 29-34, 2001.

TOO, H. P. et al. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 114, p. 146-154, 2003.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 181, p. 2-9, 2000.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue in the Early Febrile Phase: Viremia and Antibody Responses. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, p. 322-330, 1997.

VÁZQUEZ, S. et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 33, p. 132-137, 2005.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory Diagnosis of dengue virus infection. In: GUBLER, D. J. E KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, 1997. p. 313-333.

WANG, W. K. et al. Slower Rates of Clearance of Viral Load and Virus-Containing Immune Complexes in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 43, p. 1023-1030, 2006.

WANG, W. K. et al. High Levels of Plasma Dengue Viral Load during Defervescence in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever : Implications for Pathogenesis. **Virology**, New York, v. 305, p. 330-338, 2003.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, Washington, v. 27, p. 254-298, 2006.

WICHMANN, O. et al. Severe Dengue Virus Infection in Travelers: Risk Factors and Laboratory Indicators. **The Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, p. 1089-1096, 2007.

WONG, L. M.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. **BioTechniques**, Natick, v. 39, p. 1-11, 2005.

XU, H. et al. Serotype 1-Serotype Monoclonal Antibody-Based Antigen Capture Immunoassay for Detection of Circulating Nonstructural Protein NS1: Implications for Early Diagnosis and Serotyping of Dengue Virus Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 8, p. 2872-2878, 2006.

YAMADA, K. I. et al. Virus Isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 907-912, 2002.

YONG, Y. K. et al. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. **Singapore Medical Journal**, Singapore, v. 48, n. 7, p. 662-668, 2007.

YU, I-Mei. et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, Washington, v. 319, 1834-1837, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO EM PREPARAÇÃO

VALIDATION OF DENGUE SEROTYPE SPECIFIC SYBR GREEN KITS DSSS-P26 AND P29 FOR THE DIAGNOSTIC AND QUANTIFICATION OF DENGUE VIRUS TYPE 3 INFECTION

Ana Maria Silva, Ana Lisa Gomes, Carlos Calzavara-Silva, Marli Tenório, Ernesto Marques Jr, Rita Maia and Phon Too

ABSTRACT

Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) are considered the most important arthropod-borne viral diseases. Diagnosis of dengue infection during the initial phase of the illness is essential for the treatment of patients and for the effective control of dengue outbreaks. In this study we evaluated two kits - Dengue Serotype-Specific SYBR Green amplification kits (DSSS-P26 and DSSS-P29) - for the diagnosis of dengue virus serotype 3 infection using quantitative real-time PCR. Both kits were able to detect at least 10 target copies of dengue virus 3 RNA and can be used for determination of viral load in clinical samples. They are rapid and highly specific and it appears to have a higher detection rate even in the presence of dengue antibodies. They also can be used for the epidemiological investigation of dengue illness and study of the viremic response with candidate live-attenuated dengue virus vaccines.

Keywords: Dengue virus, Real-time PCR, SYBR Green.

INTRODUCTION

Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) are considered the most important arthropod-borne viral disease, associated with high morbidity and mortality among human populations in regions of Asia, Africa, and Central and South Americas (Gubler, 1998; Pinheiro,1997). About 50-100 million individuals living in tropical and

subtropical countries are infected every year, with an estimated 2.5 billion people at risk of infection (World Health Organization, 1997). In Brazil, from 1986 to 2006, more than four million cases were reported in the country (Cordeiro, 2007).

Dengue fever is caused by one of four closely related, but antigenically distinct, dengue virus serotypes (DENV-1 to DENV-4) belonging to the genus *Flavivirus*. Dengue virus causes a wide spectrum of illness, ranging from mild sub-clinical disease to a severe and occasionally fatal hemorrhagic form (Rigau-Pérez, 1998). DENV infection induces a life-long protective immunity to the homologous serotype, but confers only partial and transient protection against subsequent infections by the other three serotypes. Epidemiological studies have shown that secondary infection is a major risk for DHF and DSS (Rothman, 2004). Thus, discrimination between primary and secondary DENV infections and current infection is important for both patient management and epidemiological investigations.

In the laboratory, dengue diagnosis can be performed through virus isolation, genome and antigen detection and serological studies (Guzmán, 2004).

Virus isolation (Igarashi, 1978; Gubler, 1984) remains the gold standard but is time consuming and takes 7-10 days to perform. Serological diagnosis can give false results because of the antibodies that cross-react with other *Flavivirus*, and IgM antibody responses are often low during the first 5 days of symptoms. Molecular methods of virus nucleic acid detection is becoming more widely used because can provide results more quickly and have been shown to be more sensitive than virus isolation in some cases (Shu, 2004).

Identification of dengue virus by molecular methods such as reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) have been used for diagnosis of acute infection in human serum or plasma (Lanciotti, 1992). However, more rapid diagnostic approaches, such as real-time quantitative PCR (qPCR), may improve further the early diagnosis of dengue with more sensitive and quantitative results during the viremic phase of infection.

In this study, two kits were evaluated - Dengue Serotype-Specific SYBR Green amplification kits (DSSS-P26 and DSSS-P29) - for diagnosis of dengue virus serotype 3 infection and viral load determination in human serum, using ROX as passive reference.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Samples

For the study, serum samples were obtained from patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, enrolled in a clinical dengue cohort established in Recife, Pernambuco, Brazil. The Ethics Committee of the Brazilian Ministry of Health (number, CONEP:4909; CEP:68/02) and The Johns Hopkins Institutional Review Board (protocol JHM-IRB-3:03-08-27-01) approved the use of the serum samples and written informed consent was obtained from all patients.

A total of 71 samples were randomly selected. These samples included: 51 positive samples from patients infected with DENV-3 by nested RT-PCR (Lanciotti et al, 1992) with or without dengue virus isolated. Also were tested serum samples from 10 individuals collected after day 5 from the onset of symptoms with nested RT-PCR and culture negative, but IgM ELISA positive (convalescent samples seroconverted). Ten serum samples from healthy individuals or not infected by dengue virus were used as negative control.

One local isolate from DENV-3 virus was propagated in *Aedes albopictus* C6/36 cells and was used as positive control.

Virus extraction and reverse-transcription

Viral RNA was purified from 140 µl of serum samples with a QIAmp viral RNA minikit (Qiagen, Valencia, CA), according to the manufacturer's specifications. The purified RNA was re-suspended in 60 µl of water, and 5 µl were used for full-length total cDNA synthesis using the first-strand synthesis system for RT-PCR (Superscript III, Invitrogen, CA, USA) containing random hexamers (final volume, 20 µl).

TABLE 1. Oligonucleotide primers used in the serotype-specific DENV-3 real-time PCR

Target	DSSS-Primer Set	Primer detail		Product size
		Label	Sequence	
DENGUE 3	DSSS-DEN3 –P26F	3276F	5'-CAGAAA(A/G)CTGTGGGACAAGAG-3'	104 bp
	DSSS-DEN3 –P26R	3363R	5'-TCGCA(G/A)GGG(A/G)GGAAGTG-3'	
	DSSS-DEN3 –P29F	6469F	5'-GTCAGAA(C/G)ATGGCGGTAGG-3'	142 bp
	DSSS-DEN3 –P29R	6587R	5'-CTTTCCAATCCCTTTACCTGATAT-3'	

Sense primers are designated by (F) and antisense primers by an (R).

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

qPCR assays were performed in the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, USA), using the DSSS-P26 and DSSS-P29 amplification kits and ROX as passive reference. The reactions included 2 µl of the cDNA from the sample, 32 µl of the DSSS kit mix with primers (0.2 µM), Xtensa® PCR buffer, triton X-100, dNTPs and MgCl₂ (2.5 mM), 0.5 µl Platinum hot start polymerase (5U/µl; Invitrogen), and water added to a final volume of 50 µl. The products were quantified by real-time PCR performed by measuring the emission intensity of fluorescent SYBR Green I dye binding to double-stranded DNA. qPCR products were detected with the melting curve analysis, which was subsequently performed after the qPCR run, by increasing the temperature slowly from 60 to 95°C (0.1°C/s) and by measuring the fluorescence continuously. The ABI PRISM software (version 1.1) was used for the analysis and interpretation of the results. In every qPCR assay, the amplification of the appropriate standards (10⁷ to 10¹ copies) and no template control (NTC) were carried out to construct a standard curve and to detect false positive results due to contamination, respectively. The NTC was performed adding equivalent volumes of water instead of standards. Amplification conditions were 2 min at 50°C, 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C and 1 min at 60°C. All assays were performed in duplicates. The results were analyzed considering the melting temperature (dissociation curve), amplification curve and standard deviation between duplicates for quantification. The efficiency of amplification was calculated for each plate using the threshold cycle (Ct) value and the slope of the standard curve.

qPCR efficiency and specificity

The efficiency of amplification (ϵ) of a target molecule can be calculated from the slope of the standard curve (plot of Ct versus negative log₁₀ concentration of the target). High efficiencies of amplifications have slopes approaching the value of 3.32 for every 10-fold dilution of the target. To compare the specificities of any assays, it is critical to compare the differences in the Ct values of the defined target and the templates (Δ Ct) as well as the efficiencies of the amplification of the target and templates within each assay (Gomes, 2006). Specificity (σ) can be defined by the equation: $\sigma = (1 + \epsilon^{\Delta Ct})$, where $(1 + \epsilon)$ is $10^{1/\text{slope}}$ (Too, 2003). Hence, the larger the value of σ , the more specific the assay is in discriminating the target over the test templates (Gomes, 2006).

Two-step Nested RT-PCR

RT-PCR was performed as described by Lanciotti et al (1992). RT-PCR products were resolved by 2% (wt/vol) agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The gels were visualized on a UV transilluminator and the image captured. Negative and positive controls were included in all steps. An internal PCR control containing 10^6 copies cDNA copies/mL was also included to determine reaction efficiency and sensitivity.

Antibody detection

The samples were analyzed to detect DENV-specific IgM and IgG antibodies. Anti-dengue IgM capture ELISA (BioManguinhos or PanBio, Brisbane, Australia) was performed according to manufacturer's instructions.

Viral Isolation

Dengue virus was isolated using 20 μ l of serum samples into confluent C6/36 cell monolayers, maintained in Leibovitz L-15 medium (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY) containing 2% fetal calf serum (Igarashi, 1978). Virus was identified by indirect immunofluorescence assay with serotype-specific anti-dengue monoclonal antibodies (Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil).

RESULTS

Specificity and efficiency of DSSS-P26 and DSSS-P29 kits

DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 DNA constructs were used to verify that the assays could reliably detect only dengue virus serotype 3. DSSS-P26 and DSSS-P29 amplifications kits were more specific to DENV3 than to the others DENV (Table 2). These assays also were tested with yellow fever for Flavivirus cross-reactivity analysis using DNA constructs and serum from healthy human serum samples as negative control. None of the assays were able to amplify the RNA extracted from yellow fever DNA constructs and negative samples for dengue virus (data not shown).

The standard curve efficiencies were 100% and 94% for DSSS-P26 and DSSS-P29, respectively (Figure 1- IB/ IIB and TABLE 2).

Figure 1. Amplifications (IA - IIA) and standard curves (IB – IIB) of 10^7 to 10^1 copies DENV3 for DSSSP26 (A) and P29 (B).

TABLE 2. Specificity and Efficiency of DSSS kits

KIT DSSS	Specificity (1+ Efficiency) ^{Ct1-Ct2}	Efficiency $10^{(-1/\text{slope})-1}$	Slope
P26	32,768 more specific to DENV3 than to DENV1	100%	- 3.21
	262,144 more specific to DENV3 than DENV2		
	524,288 more specific to DENV3 than DENV4		
P29	40,255 more specific to DENV3 than to DENV1	94%	- 3.45
	570,209 more specific to DENV3 than to DENV2		
	40,255 more specific to DENV3 than to DENV4		

Sensitivity of DSSS assays

The amplification of the appropriate standards (10^7 to 10^1 copies) and NTC were carried out to construct a standard curve and to detect false positive results due to contamination, respectively (Figure 1 IA/ IB). The kits were able to amplify 10 copies when DNA constructs of DENV-3 was processed. In order to determine the sensitivity of the both DSSS kits, we compared the results with those obtained by RT-PCR and virus isolation (Table 3). Virus isolation was positive in 25 of 51 samples (49%). IgM antibodies were positive in 16 of 51 samples (31%). All patients presented IgM antibodies in samples collected in convalescence phase (data not shown). DSSS kits compared with regard to the RT-PCR assay and both DSSS kits presented 100% of agreement with RT-PCR results.

TABLE 3. Summary of IgM, RT-PCR, DSSS-P26, DSSS-P29 and virus isolation

Disease days	Number of serum samples	IgM +	RT-PCR	DSSS(P26)	DSSS(P29)	Virus Isolation
1	02		02 (100%)	02 (100%)	02 (100%)	02 (100%)
2	07		07 (100%)	07 (100%)	07 (100%)	06 (86%)
3	08		08 (100%)	08 (100%)	08 (100%)	04 (50%)
4	13	03	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)	06 (46%)
5	11	05	11 (100%)	11 (100%)	11 (100%)	04 (36%)
6	03	02	03 (100%)	03 (100%)	03 (100%)	02 (67%)
7	04	03	04 (100%)	04 (100%)	04 (100%)	01 (25%)
8	03	03	03 (100%)	03 (100%)	03 (100%)	00 (00%)
Total	51	16	51 (100%)	51 (100%)	51 (100%)	25 (49%)

Even though the similar results of DSSS-P26 and P29 in negative samples, quantifications of P26 was not able when viral load was lower than 10^2 copies. It was noted that standard deviation of the samples were higher on duplicates using of P26 than P29.

Analysis of melting curves obtained with both kits shown that DENV-3 amplicons had temperature melting values ranging from 83.6 to 85.6°C for DSSS-P26 and from 82.7 to 84°C for DSSS-P29 (Figure 1 - IC/ IIC).

Amplification in samples with less 10 copies wasn't possible to quantify with accuracy. So, it was considered the detection limit as 10 copies for both kits.

TABLE 4. Calculation of clinical sensitivity and specificity of the assays

RT-PCR	DSSS – P26		DSSS – P29	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive test	51	0	51	0
Negative test	0	20	0	20
Total	51	20	51	20
Sensitivity (%)	100 %		100 %	
Specificity (%)	100 %		100 %	

DISCUSSION

Diagnosis of dengue infection during the initial phase of the illness is essential for the treatment of patients and for the effective control of dengue outbreaks (World Health Organization, 1997). The current methods used widely in laboratories for the diagnosis of acute dengue virus infections are the detection of virus or IgM antibody in serum samples. For the definitive dengue diagnostic by IgM capture ELISA is necessary to collect samples in acute and convalescence phases. Furthermore, IgM levels could be low or sometimes not detected in secondary infections (Cordeiro, 2007) and can cross-react with other flaviviruses (Guzmán and Kouri, 2004). Virus isolation is the gold standard for dengue diagnosis but is labour intensive and time consuming, taking 7 – 10 days to complete. Furthermore, when antibodies levels begin to rise from day 3 after onset of symptoms, they interfere with viral isolation, resulting in the low sensitivity of viral isolation.

Molecular techniques based on the detection of genomic sequences by reverse transcription PCR (RT-PCR), nested PCR, or real-time PCR have become essential tools in the laboratory research and they have made possible the rapid detection serotyping and quantification of dengue virus in acute-phase serum samples.

In this study two amplification kits - Dengue Serotype-Specific SYBR Green (DSSS-P26 and DSSS-P29) were validated and shown to be able to detect and quantify at least 10 copies, and can be used to identify the presence of dengue virus 3 RNA, determine the viral load in clinical samples and could be used in large scale with accurate results.

Despite of the fact that DSSS P26 and DSSS P29 have the same sensibility of two step nested PCR, qPCR has the ability to detect and quantify viruses allowing the study of viral load which is important in dengue disease diagnosis and prognosis (Gomes-Ruiz, et al, 2006).

The DSSS kits were more sensitive than isolation method and are fast and highly specific and appear to show a higher detection rate even in the presence of dengue antibodies. They also can be useful for the epidemiological investigation of dengue disease and study of the viremic response with candidate live-attenuated dengue virus vaccines.

ACKNOWLEDGEMENTS

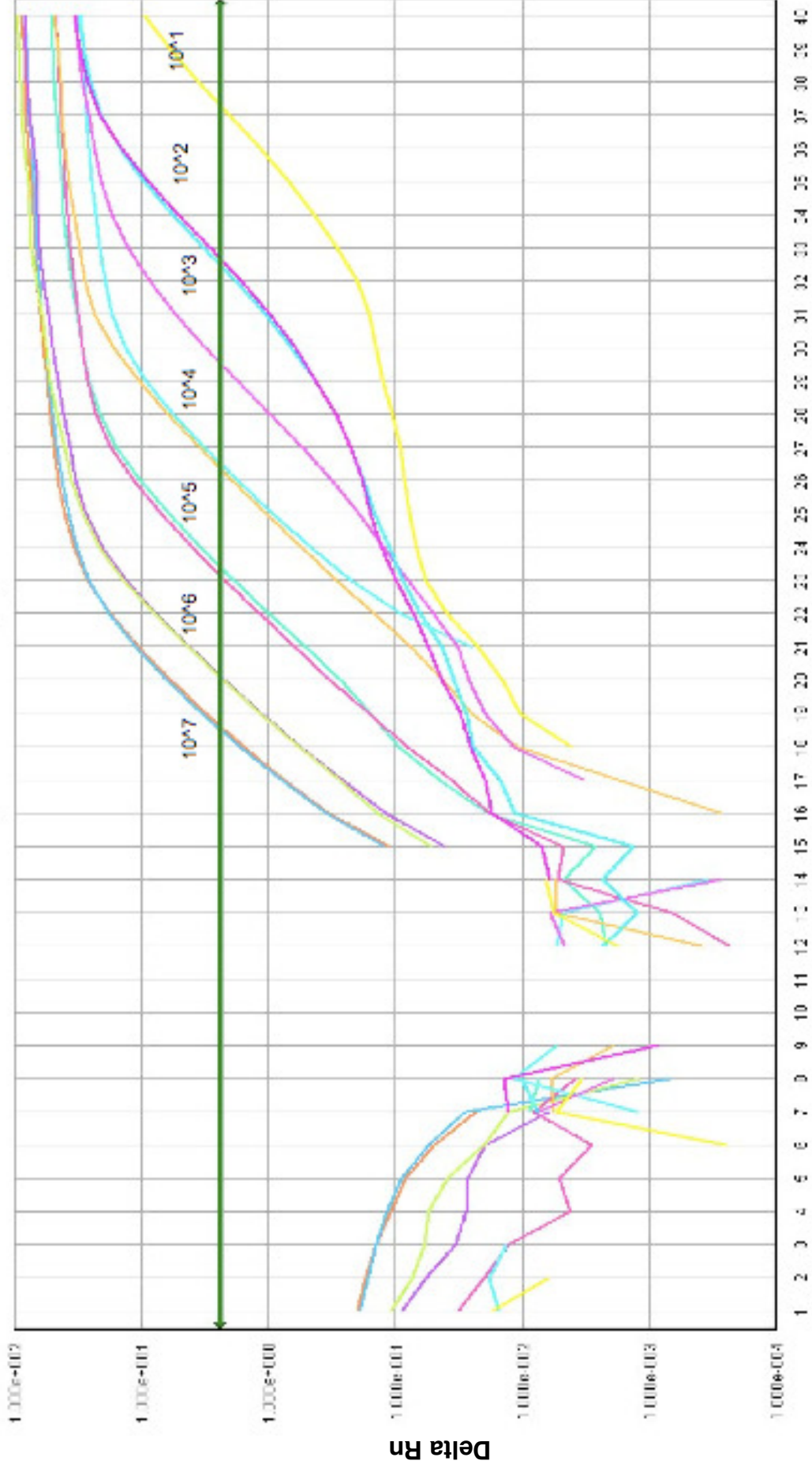
This work was supported by FIOCRUZ internal funds (PDTIS) and National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID/NIH), under Grant U19 AI56541.

REFERENCES

- Halstead SB., 2007. Dengue. *The Lancet*. 370, 1644-52.
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., Vorndam, A.V., 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 545-551.
- Cordeiro, M.T., Silva, A.M., Brito, C.A.A., Nascimento, E.J.M., Magalhães, M.C.F., Guimarães, G.F., Lucena-Silva, N., Carvalho, E.M.F., Marques, E.T.A., 2007. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(6), 1128-1134.
- Igarashi, A., 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.* 40, 531-544.
- Gubler, D.J., Kuno, G., Sather, G.E., Velez, M., Oliver, A., 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 158-165.
- Rigau-Pérez, J.G., Clark, G.G., Gubler, D.J., Reiter, P., Sanders, E.J., Vorndam, A.V., 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 352, 971-977.
- Gubler, DJ. 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 480-496.
- Pinheiro, FP, Corber, SJ. 1997. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q.* 501, 161-168.
- World Health Organization, 1997. *Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*, 2nd ed. WHO, Geneva.
- Cordeiro, MT, Schatzmayr, HG, Nogueira, RMR, Oliveira, VF, Melo, WT, Carvalho, EF. 2007. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the state of Pernambuco, 1995-2006. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(6):605-611.
- Guzmán, MG, Kouri, G. 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*. 8:69-80.
- Shu, P, Huang, J. 2004. Current advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11(4):642-650.

-
- Rothman, A L. 2004. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of Clinical Investigations*. 113:946-951.
 - Gomes, A L V et al. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 101 (suppl I), pp 133-136, 2006.
 - TOO H P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res*, Vol. 114, pp 146-154, 2003.
 - Gomes-Ruiz A. C. et al. 2006. SYBR Green and TaqMan Real-Time PCR assays are equivalent for the diagnosis of dengue virus type 3 infections. *Journal of Medical Virology*, vol. 78, pp 760-763, 2006.

Amplification Curve



Cycle number

Figure 1. IA

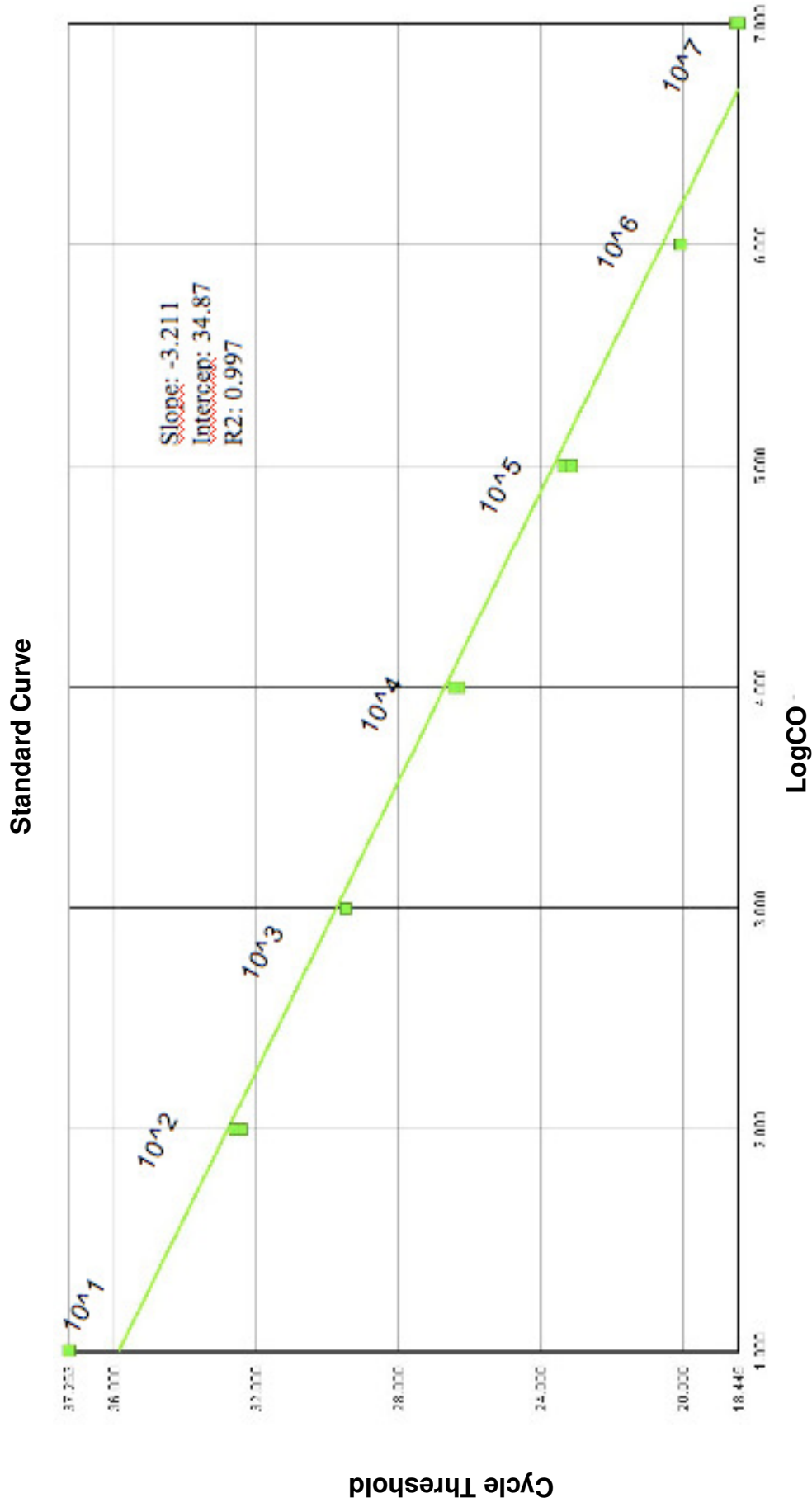


Figure 1. IB

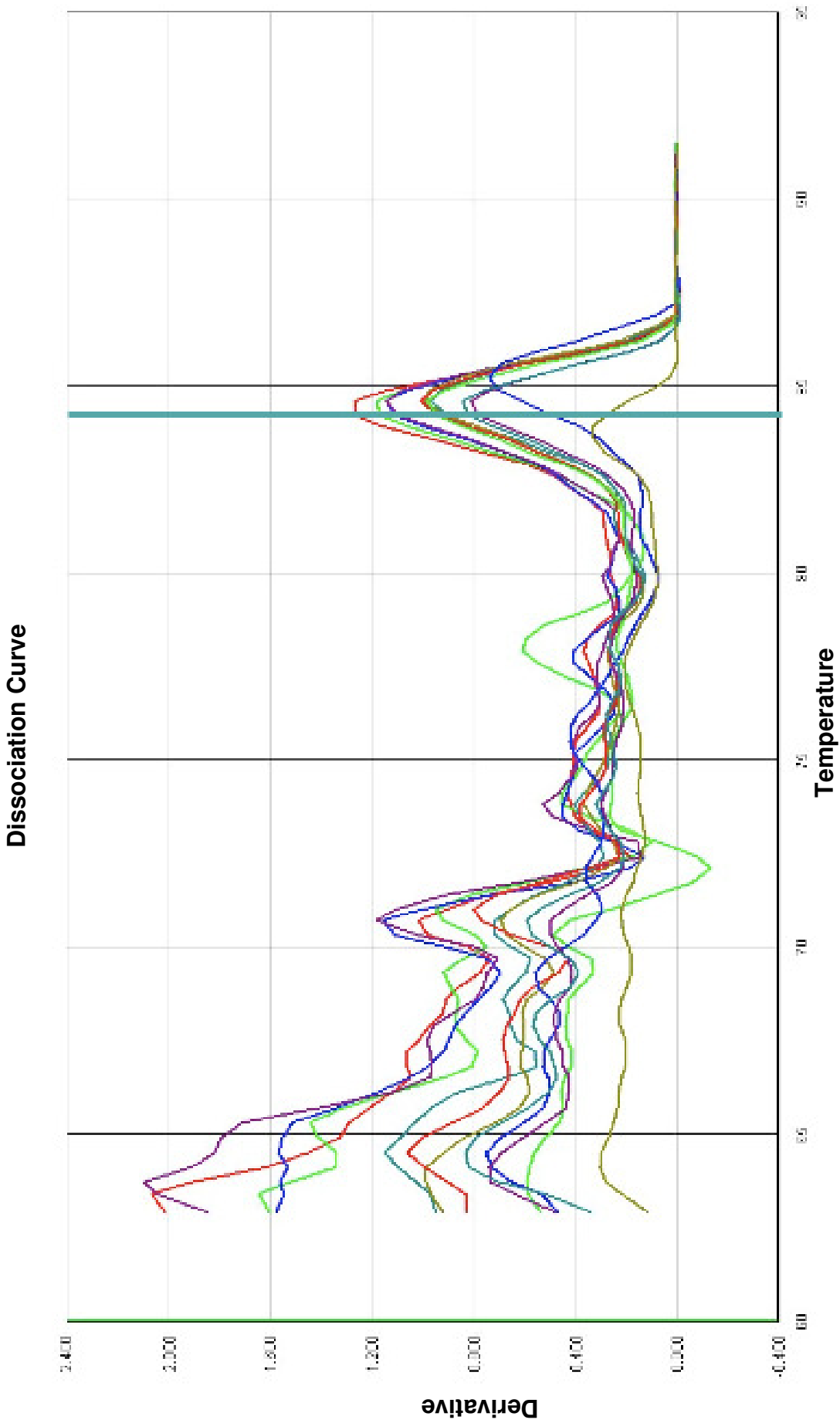


Figure 1. IC

Amplification Curve



Cycle number

Figure 1. IIA

Standard Curve

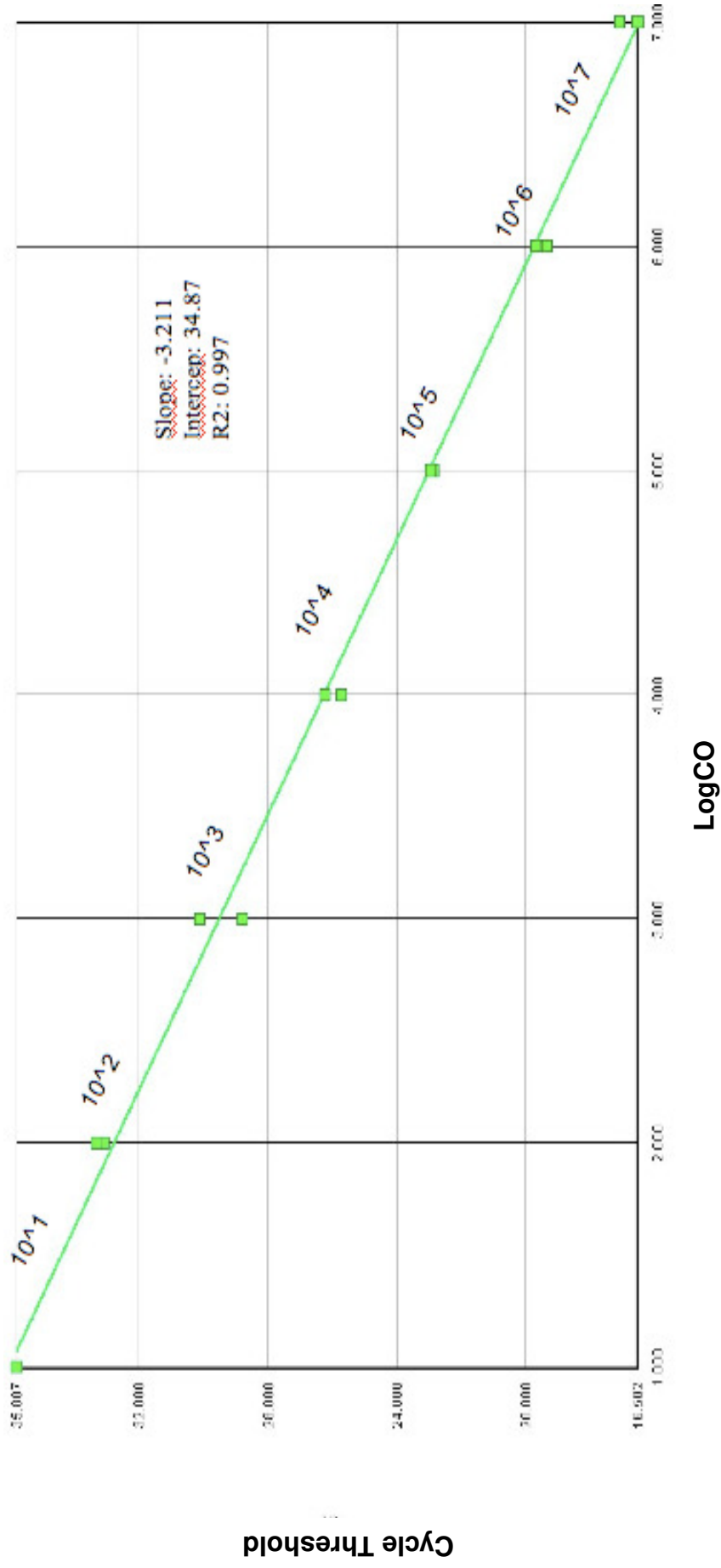


Figure 1. IIB

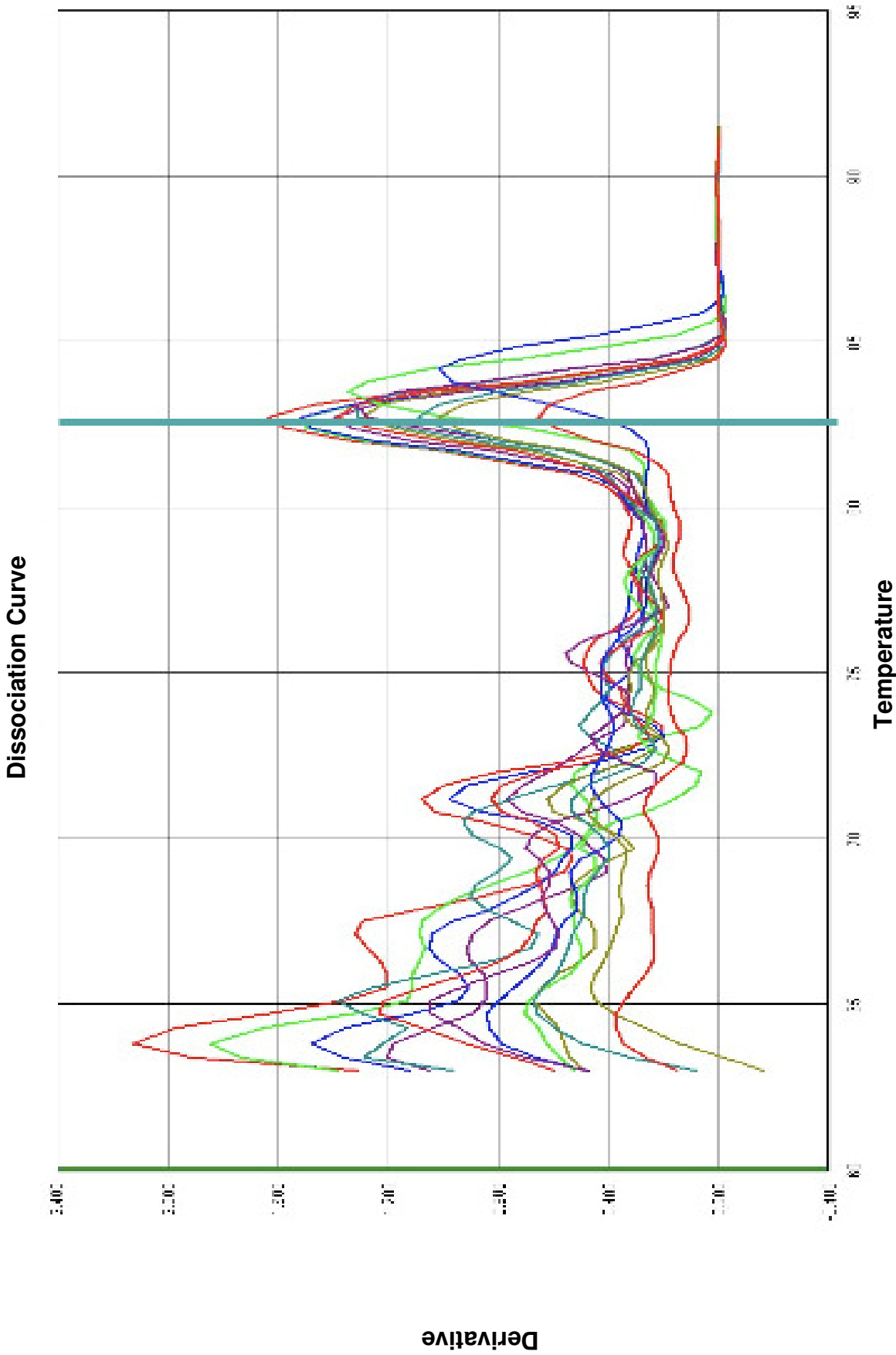


Figure 1. IIC

APÊNDICE B – ARTIGO EM PREPARAÇÃO

ESTUDO DE CINÉTICA DE VIREMIA DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3 EM FORMAS CLÍNICAS DA DENGUE COM DIFERENTES NÍVEIS DE GRAVIDADE

Ana Maria da Silva, Ana Lisa Gomes, Marli Tenório Cordeiro, Ernesto Marques Júnior.

INTRODUÇÃO

Dengue é uma doença que ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo, causada por um arbovírus (“arthropod-borne vírus”) que é transmitido ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* considerado o principal vetor da doença (LIGON, 2004). A dengue é um problema de saúde pública, distribuindo-se em mais de 100 países e acometendo cerca de 2,5 bilhões de pessoas. Estima-se que ocorram anualmente cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue clássica e centenas de milhares de casos de dengue hemorrágico pelo mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). No Brasil, de 1986 a 2006, foram registrados mais de 4 milhões de casos (CORDEIRO, 2007).

O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e é representado por quatro sorotipos antigênicos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). A infecção pelo vírus dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde formas clinicamente assintomáticas até quadros graves, acompanhados por hemorragias e choque, que podem evoluir para o óbito (LIGON, 2004; ROTHMAN, 2004). A dengue clássica (DC) caracteriza-se por uma febre abrupta geralmente alta (39-40°C), associada à cefaléia, prostração, mialgia, artralgia, dor retroorbitária, exantema maculopapular acompanhado ou não de prurido. Anorexia, náuseas, vômitos e diarreia também podem ser observados (RIGAU- PÉREZ et al., 2002). A forma mais grave da doença é a febre hemorrágica da dengue / síndrome do choque da dengue, caracterizada pelo desenvolvimento de extravasamento plasmático, anormalidades de coagulação e comprometimento hepático (ROTHMAN, 2004).

Todos os quatro sorotipos do vírus dengue podem causar desde formas assintomáticas até as formas mais graves da doença. Infecção com um sorotipo induz imunidade permanente específica ao sorotipo infectante, conferindo apenas uma curta imunidade cruzada (heterotípica) para os outros sorotipos (GUBLER, 1998; SABIN, 1952). Duas teorias tentam explicar a ocorrência da febre hemorrágica da dengue: a teoria da modificação de virulência (ROSEN, 1977) e a teoria das infecções sequenciais heterotípicas (HALSTEAD, 1970). Ambas teorias predizem maior magnitude de replicação viral em pacientes com a forma mais grave da doença e justificam a ocorrência de elevados níveis de viremia, por características virais ou do hospedeiro, respectivamente. Diversos estudos têm buscado identificar padrões clínico-epidemiológicos e laboratoriais preditivos de gravidade da dengue, correlacionando-os com níveis de viremia (ENDY et al. 2004; GUBLER et al., 1981; GUILLARDE et al., 2008; LIBRATY et al., 2002; MURGUE et al., 2000; WANG et al., 2003). No entanto, os estudos sobre a cinética de viremia em pacientes com diferentes formas clínicas de dengue são relativamente escassos, particularmente utilizando métodos precisos de quantificação viral.

O objetivo deste estudo foi estudar a cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 nos diferentes tipos de infecção e formas clínicas, investigando possíveis associações entre o nível de carga viral, o tipo da infecção (primária ou secundária) e as formas mais graves da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo e preparação das amostras. Detalhes sobre o desenho da coorte e população de estudo foram publicados por Cordeiro et al., 2007. Foram utilizados neste estudo soros de pacientes de um banco de amostras provenientes de um estudo de coorte sobre dengue desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Essas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) através de um convênio com os Hospitais Santa Joana, Esperança e Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP), em Recife, Pernambuco, Brasil, onde esses pacientes, com suspeita clínica de infecção pelo vírus dengue, foram atendidos. As amostras foram identificadas de acordo com a ordem de coleta, da primeira à quinta, sendo a primeira amostra aquela correspondente ao dia do primeiro atendimento hospitalar e início da participação do voluntário no projeto, quando o mesmo assinou o termo de consentimento livre e esclarecido. Amostras de sangue colhidas sem anticoagulante foram utilizadas para a obtenção de soro, após centrifugação, e armazenadas a -70°C . Para definição laboratorial do diagnóstico

(sorotipo da infecção e natureza secundária ou primária da infecção), as amostras de soro foram analisadas pelos procedimentos: RT-PCR (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) sorotipo específica (LANCIOTTI et al., 1992); ELISA- IgM (kit ELISA- IgM, PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália), IgG anti-dengue (kit ELISA- IgG, PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália), isolamento viral em cultura de células de mosquito *A. albopictus*, C6/36 (IGARASHI, 1978) e identificação dos vírus isolados através da técnica de imunofluorescência indireta (HENCHAL et al., 1982). As determinações de plaquetas, hematócrito e transaminases foram realizadas nos laboratórios dos hospitais colaboradores (Esperança, Santa Joana e IMIP) utilizando métodos automatizados. Os soros identificados como positivos para o DENV-3 (RT-PCR positivos) foram utilizados para a quantificação da carga viral por PCR em tempo real. Inicialmente, foram analisadas 209 amostras de soro positivas para infecção por DENV-3, coletadas na fase aguda da doença (período febril). Além dessas, amostras de soro de 85 pacientes (três a cinco amostras de cada paciente), coletadas seqüencialmente (com o limite máximo de 15 dias do início de sintomas), totalizando 317 amostras, foram utilizadas para o estudo de cinética de viremia. O pico de viremia foi definido como o nível de viremia mais alto durante a doença, expresso em número de cópias/ml. A distribuição das amostras utilizadas para o estudo de cinética de viremia do DENV-3 em relação ao tipo de infecção (primária e secundária) e à forma clínica (dengue clássica, dengue clássica complicada, febre hemorrágica da dengue e dengue) encontra-se apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das amostras quanto ao tipo de infecção e forma clínica da dengue

Forma Clínica	Tipo de Infecção		Total
	Primária	Secundária	
Dengue	10	03	13
Dengue Clássica	06	13	19
Dengue Clássica Complicada	17	21	38
Febre Hemorrágica da Dengue	08	07	15
Total	41	44	85

Quantificação da Viremia. A viremia foi quantificada em cópias de RNA/ml. Após extração do RNA de 140µl amostra, através da utilização do kit QIAamp Viral RNA Mini Kit/QIAamp MiniElute Vírus Spin (Qiagen, Valencia, CA), foi realizada a transcrição reversa. Para isso foram utilizados primers randômicos (hexâmeros), inibidor de RNase (RNase OUT 40 U/µl), enzima Superscript III reverse transcriptase 200U/µl e 5µl do RNA purificado, segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante dos reagentes (Invitrogen). A quantificação foi realizada por PCR em tempo com SYBR Green através do uso de um kit sorotipo-específico para dengue (DSSS-P29), com limite inferior de detecção de 10 cópias de RNA/ml (artigo em preparação). Cada reação de PCR em tempo real foi composta de 32 µl de mix do kit DSSS contendo iniciadores (0.2 µM final), tampão PCR Xtensa®, triton X-100, dNTPs e MgCl₂ (2.5 mM final), 0.5 µl Platinum polimerase “hot- start” (5U/µl; Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen, código 10966-030), 2 µl da mistura de transcrição reversa e água para um volume final de 50 µl. As condições de amplificação são 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto, precedidos por 95°C por 3 minutos. Em cada corrida foram incluídos padrões quantitativos (10⁷ a 10¹ cópias), uma amostra negativa (não dengue), um controle positivo proveniente de um isolado local de DENV-3 propagado em células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36, com 10⁶ cópias de RNA do vírus dengue e controles negativos sem o cDNA alvo (NTC). Todas as amostras foram testadas em duplicata. A reação de PCR em tempo real foi realizada medindo-se a intensidade de fluorescência do SYBR-Green I, utilizando-se ROX (6-carboxi-X-rodamina) como referência passiva nos equipamentos ABI Prism 7000 e 7500 (Applied Biosystems). Os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software* ABI PRISM (versão 1.4) da Applied Biosystems. Os resultados foram analisados considerando-se a curva de dissociação (*melting curve*), curva de amplificação e desvio-padrão entre as duplicatas para quantificação. A eficiência de amplificação foi calculada para cada placa usando-se o *slope* da curva padrão.

Formas clínicas. Os critérios utilizados para a definição da forma clínica foram essencialmente os definidos pela Organização Mundial da Saúde (1987). Além dessa classificação, foi incluída a forma clínica denominada neste estudo de Dengue Clássica Complicada (DCC). Essa forma utilizada no estudo de coorte do qual as amostras analisadas são provenientes, representa uma forma intermediária entre DC e FHD, e inclui os casos que apresentam plaquetopenia (maior que 50.000/mm³) ou hemorragia, mas que não preenchem os critérios da OMS para FHD. Também foi incluída a forma clínica denominada apenas de Dengue (D), que se refere aos casos cuja classificação não foi possível por falta de exames

laboratoriais complementares, porém apresentando quadro clínico compatível com dengue clássica.

Classificação de infecção em primária e secundária. Para definição laboratorial do diagnóstico quanto ao tipo de infecção (secundária ou primária), foram testadas amostras seriadas para verificação da cinética de anticorpos IgM e IgG. Também foi utilizada a técnica de Inibição da Hemaglutinação (HI) em placas de microtitulação (CLARKE; CASALS, 1958) para confirmar a classificação dos casos de febre hemorrágica da dengue, através da quantificação de anticorpos inibidores da hemaglutinação (anticorpos totais). O critério utilizado para definição do caráter da infecção foi uma combinação baseada nos resultados da RT-PCR, isolamento viral e cinética de anticorpos IgM e IgG realizada em amostras seriadas. Se anticorpos IgG estavam presentes já na primeira amostra, com ausência ou presença de anticorpos IgM e com resultados positivos de RT-PCR e/ou isolamento viral, confirmando infecção aguda, a infecção foi caracterizada como secundária. Na ausência de anticorpos IgG, com IgM e/ou RT-PCR e/ou isolamento viral positivo na primeira amostra e observação de soroconversão, a infecção foi caracterizada como primária (CORDEIRO et al., 2007). Baseando-se no teste de inibição da hemaglutinação, a infecção foi caracterizada como primária na ausência de anticorpos inibidores da hemaglutinação ($<1:20$) na amostra de soro de fase aguda, coletada antes do quarto dia de doença e presença de anticorpos na amostra de soro da fase de convalescença com título $< 1:1280$; e foi considerada como secundária quando houve presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação ($>1:20$) na amostra de soro de fase aguda, coletada antes do quarto dia de doença e detecção de anticorpos com títulos $\geq 1:2560$ na amostra de soro da fase de convalescença, com aumento de, no mínimo, quatro vezes no título de anticorpos inibidores da hemaglutinação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

Análise Estatística. Para estimar o tempo de indetecção da carga viral foi utilizada a análise de sobrevida (modelo de Kaplan-Meier). No estudo da cinética de viremia foram utilizados os modelos gerais linearizados para medidas repetidas. Na busca de associações entre os níveis de viremia e os testes laboratoriais (transaminases, plaquetas e hematócrito), foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson com seus respectivos testes de significâncias. Quando analisados os testes laboratoriais, estratificados em normais e alterados, e avaliados seus comportamentos no decorrer do estudo, segundo o dia de início de sintomas, foi feito o teste de significância do Qui-quadrado de Pearson para tendência e calculado a *odds ratio* (OR). O erro máximo adotado para os testes estatísticos foi de $\alpha = 5\%$

($p < 0,05$). Foram utilizados os programas estatísticos EPI-INFO, versão 2000, o SPSS-PC, versão 8.0 e o Prism, versão 4.0a.

RESULTADOS

Características dos pacientes do estudo de cinética de viremia. Foram avaliados 85 pacientes submetidos a quatro coletas (a quinta foi retirada da análise, pois só foi possível determinar a carga viral nesta amostra em três pacientes), em um total de 314 amostras. Foram analisados os níveis de carga viral, plaquetas, hematócrito, transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP). A tabela 2 apresenta a distribuição dos indivíduos estudados segundo sexo, diagnóstico e tipo de infecção. A idade média dos pacientes foi de 39,3 anos, com mínimo de 15 e máximo de 84 anos. Em relação ao tempo de início dos sintomas, a média foi de 3,9 dias, com um mínimo de um e máximo de oito dias.

Tabela 2 - Distribuição dos indivíduos estudados segundo sexo, diagnóstico e tipo de infecção

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	43	50,6
Feminino	42	49,4
Diagnóstico		
Dengue	13	15,3
DC	19	22,4
DCC	39	45,8
FHD	14	16,5
Tipo de infecção		
Primária	41	48,2
Secundária	44	51,8
Total	85	100,0

Legenda: DC (dengue clássica), DCC (dengue clássica complicada), FHD (febre hemorrágica da dengue).

Determinação da cinética de viremia. A mediana do tempo de duração foi de 10 dias. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa quando os tempos de duração da viremia

foram estratificados pelo tipo de infecção ($p=0,4$) e formas clínicas ($p=0,91$). A carga viral máxima foi detectada entre o primeiro e terceiro dias de início dos sintomas (Figura 1).

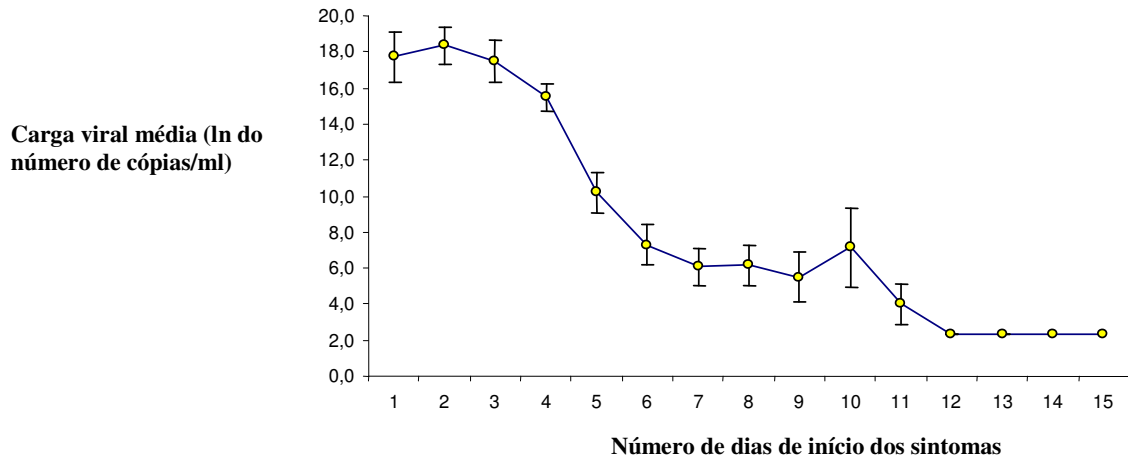
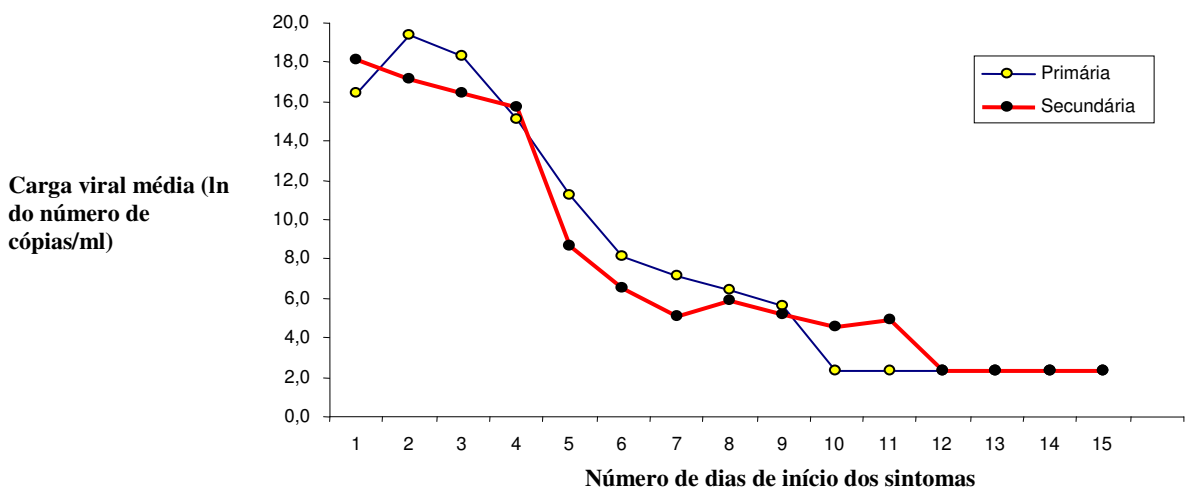


Figura 1 - Média do logaritmo da carga viral (cópias/ml) segundo os dias de início dos sintomas

Associação entre carga viral e tipo de infecção. O tipo de infecção não interferiu no comportamento da carga viral ($p=0,325$) (Figura 2).



Associação entre carga viral e formas clínicas. Não houve correlação entre os níveis de carga viral e as formas clínicas da dengue ($p=0,421$), nem entre a duração da viremia e as formas mais graves (Figura 3). Foi detectada viremia após o desaparecimento da febre em todas as formas clínicas estudadas.

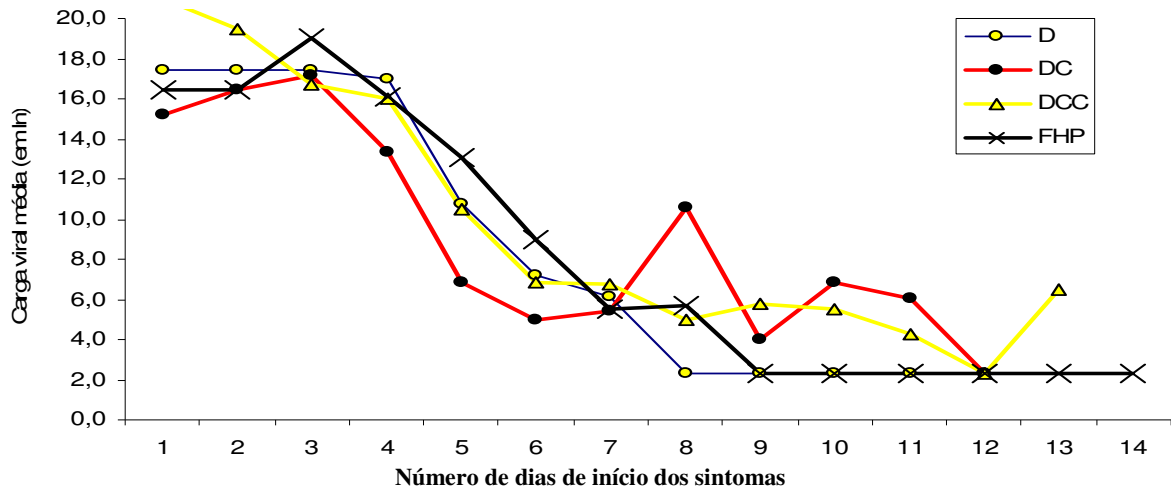


Figura 3 - Curva de cinética de viremia segundo as formas clínicas da dengue. Carga viral expressa em logaritmo neperiano do número de cópias/ml

Associação entre carga viral e os níveis de plaquetas. Em relação à contagem de plaquetas, os menores valores foram observados entre o quinto e o sétimo dias de início dos sintomas. Não houve correlação entre a carga viral e os níveis de plaquetas ($p=0,53$) (Figura 4). Correlacionando por tipo de infecção, observou-se maior redução das plaquetas quando a infecção foi considerada primária (Figura 5). De acordo com as formas clínicas, menores níveis foram observados em DCC e FHD (Figura 6).

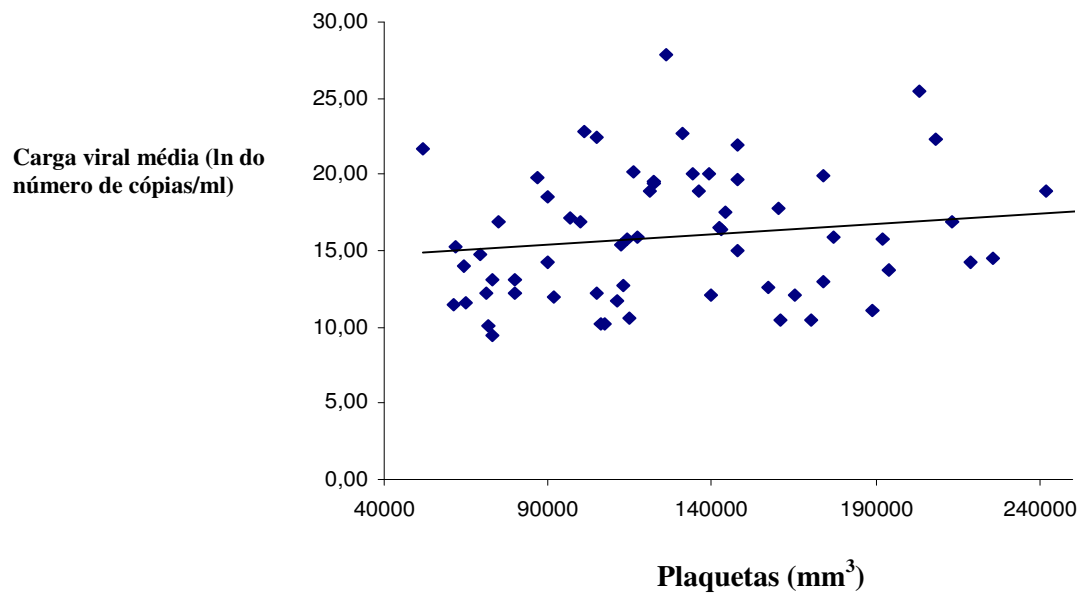


Figura 4 - Correlação da carga viral e níveis de plaquetas

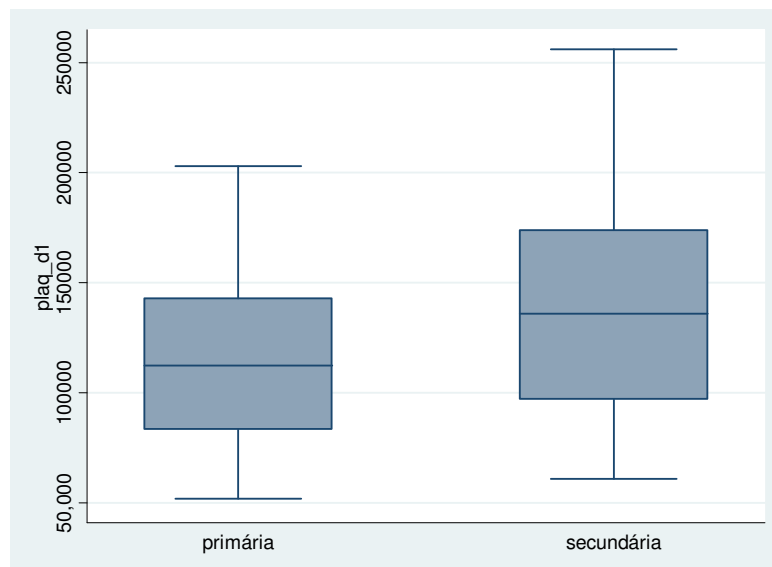


Figura 5 – Níveis de plaquetas iniciais segundo o tipo de infecção

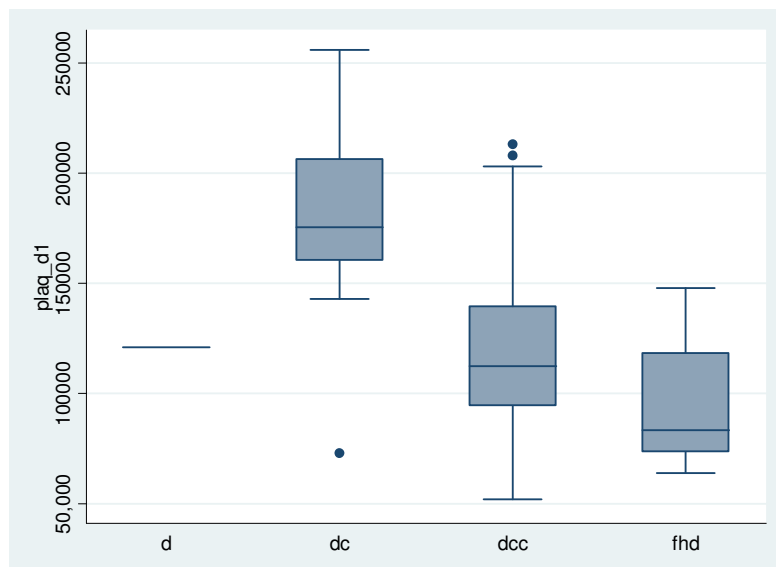


Figura 6 – Níveis médios de plaquetas segundo as formas clínicas

Associação entre carga viral e os níveis de hematócrito (% de hemoconcentração). O nível de hematócrito teve pouca variação (entre 39 e 45%) ao longo do período, a partir do início dos sintomas, com um aumento médio de 3% quando comparada a determinação na primeira coleta com a última coleta dos pacientes. Não houve correlação estatística significativa entre os níveis de hematócrito e a carga viral ($p=0,769$) (Figura 7).

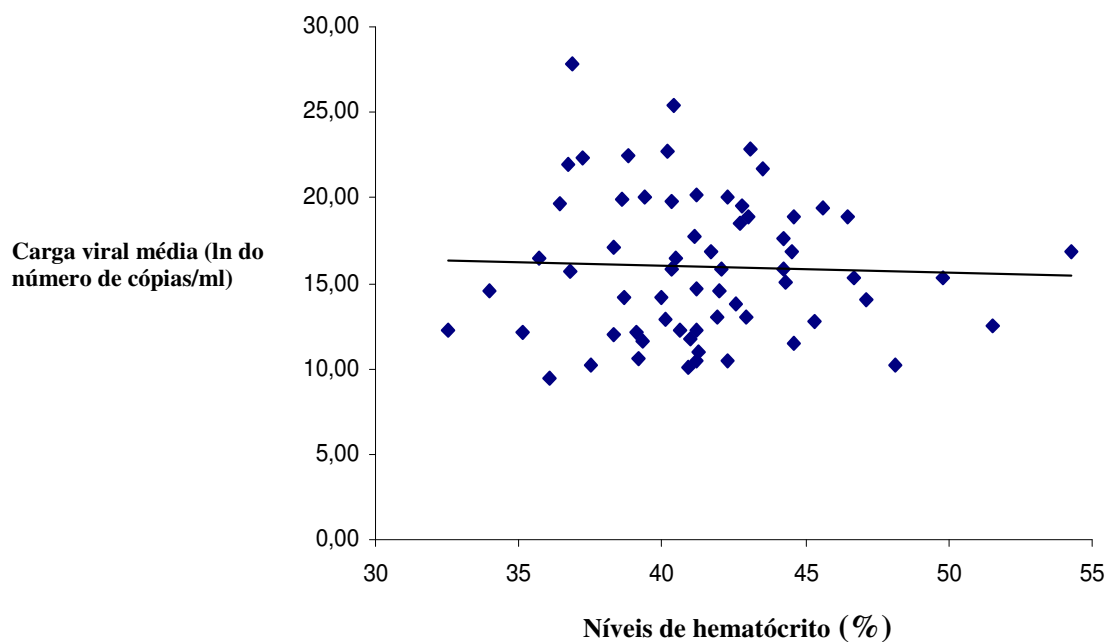


Figura 7 - Correlação da carga viral e níveis de hematócrito nas amostras coletadas na fase aguda da doença.

Associação entre carga viral e os níveis de transaminases. Considerando todas as determinações de transaminases realizadas no estudo, independentemente do tipo de infecção e forma clínica, foram encontrados valores de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) mais elevados que transaminase glutâmico pirúvica (TGP) em amostras coletadas até oito dias de início dos sintomas. A partir desse período, foram observados maiores níveis de TGP em relação à TGO (OR=6,05, $p<0,001$). Não houve correlação estatística significativa entre os níveis de TGO ($p=0,483$) e TGP ($p=0,923$) e a carga viral (Figuras 8 e 9).

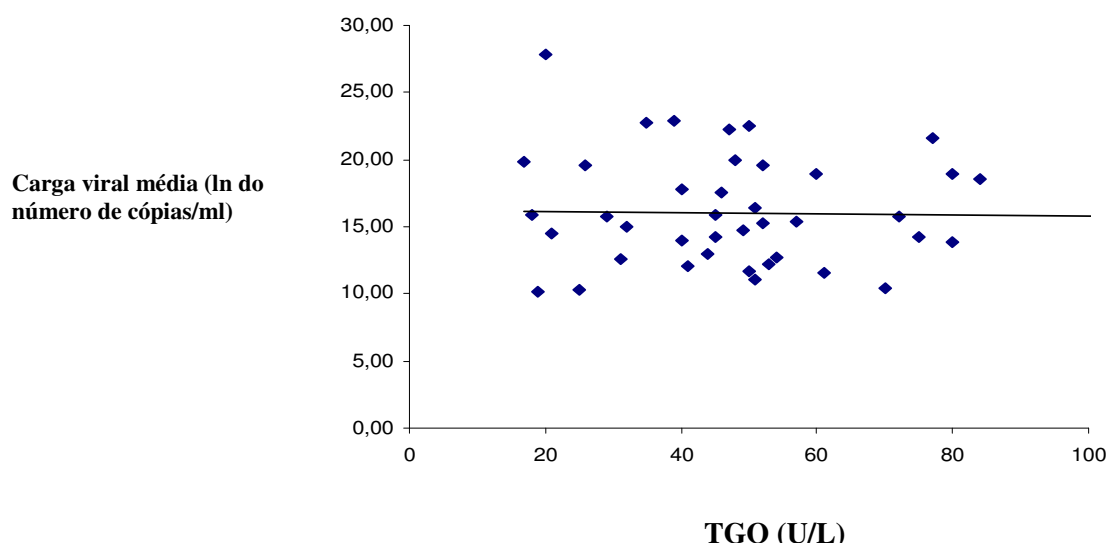


Figura 8 - Correlação da carga viral e níveis de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) nas amostras coletadas na fase aguda.

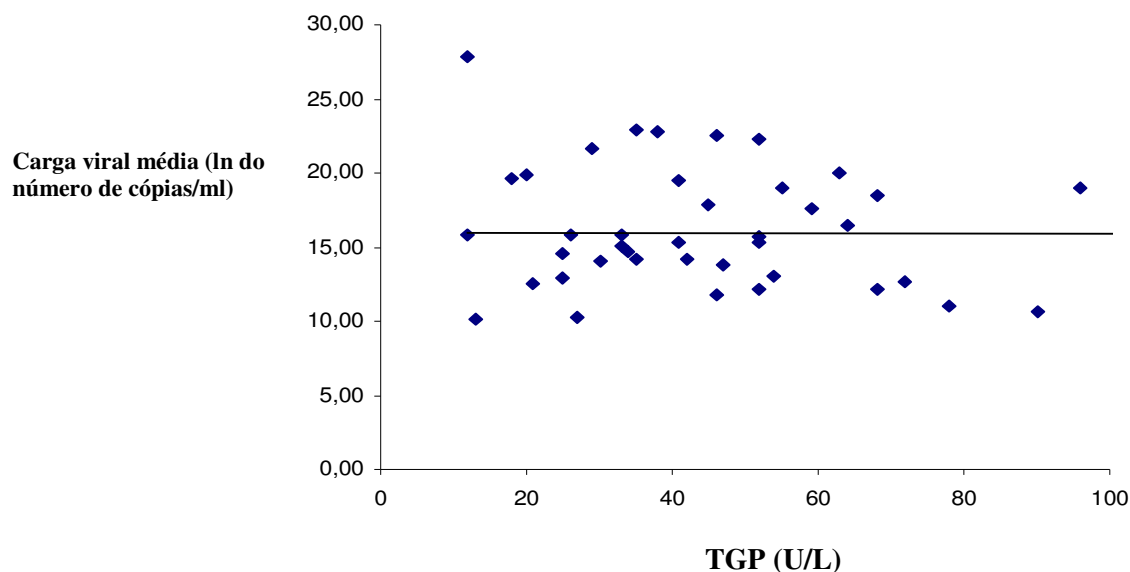


Figura 9 - Correlação da carga viral e níveis de transaminase glutâmico pirúvica (TGP) nas amostras coletadas na fase aguda.

Correlacionando-se os níveis de transaminases com o tipo de infecção, foram observados maiores níveis de TGO na infecção primária do que na secundária até o décimo dia de início dos sintomas, quando esses níveis começaram a baixar e se equivaleram em ambos tipos de infecção. Em relação à TGP, maiores níveis foram observados nos primeiros dias de sintomas na infecção secundária, elevando-se semelhantemente na forma primária a partir do sexto dia de início dos sintomas. Neste período, os valores de TGP são mais elevados do que os de TGO. De acordo com a forma clínica, foram analisadas apenas as formas classificadas como DC e DCC, pelo fato de se ter nas outras formas um número pequeno de pacientes. A DCC apresentou níveis de TGO mais elevados, principalmente nos primeiros seis dias de início dos sintomas. Os níveis de TGP se elevaram em todo o período do estudo, mas com níveis mais baixos do que TGO nos seis primeiros dias de início dos sintomas.

Análise da carga viral das amostras coletadas na fase aguda da doença. Foram analisadas 209 amostras coletadas no período febril, entre o primeiro e o décimo dia de início dos sintomas. A análise de correlação da carga viral com o tipo de infecção nestas amostras, semelhantemente ao estudo de cinética de viremia, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Ou seja, os níveis de carga viral foram semelhantes entre as infecções primária e secundária ($p = 0,69$) (Figura 10). No entanto, as medianas da carga viral se mostraram maiores nas formas mais graves da doença (DCC=6,9 e FHD=6,9) que em D (5,6) e DC (6,2). Os níveis de carga viral foram maiores nas formas mais graves da doença (DCC e FHD) que em D e DC ($p < 0,0001$) (Figura 11).

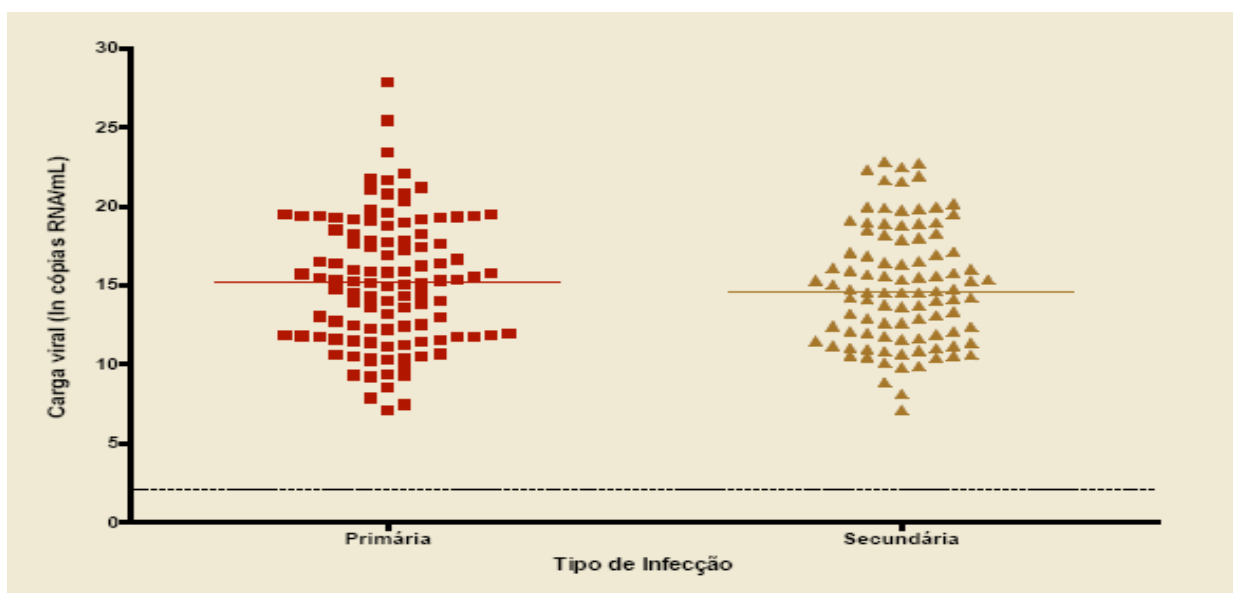


Figura 10 - Correlação da carga viral com o tipo de infecção ($p < 0,0001$). Linha tracejada indica limite inferior de detecção do teste (10 cópias), expresso em ln.

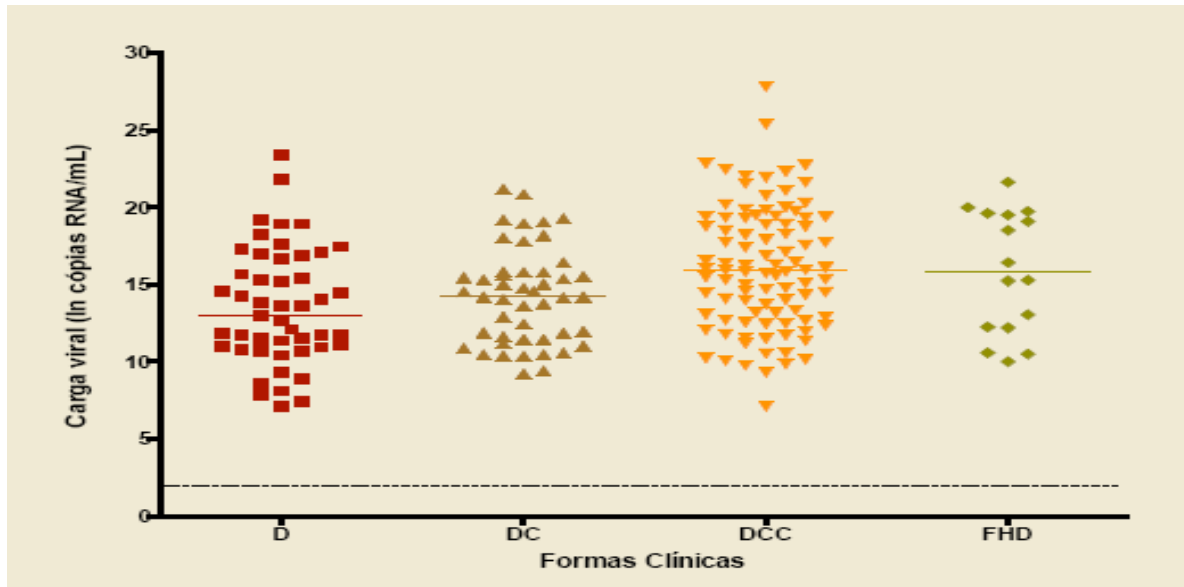


Figura 11 - Correlação da carga viral com as formas clínicas da doença ($p < 0,0001$). Linha tracejada indica limite inferior de detecção do teste (10 cópias), expresso em ln. Legenda: D=dengue; DC=dengue clássica; DCC= dengue clássica complicada; FHD= febre hemorrágica da dengue.

DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizadas amostras seqüenciais de pacientes adultos, provenientes de uma coorte bem caracterizada, com infecções primária e secundária pelo vírus dengue sorotipo 3, não contendo amostras com outros sorotipos. Além dessas amostras seqüenciais, foram analisadas as primeiras amostras de 209 pacientes, também com infecção pelo vírus dengue pelo sorotipo 3. As determinações de viremia foram realizadas através da utilização da técnica de PCR em tempo real, o que garante maiores sensibilidade e precisão nos resultados. Estudos combinando estas características são pouco citados.

Diversos estudos têm buscado identificar padrões clínico-epidemiológicos e laboratoriais preditivos de gravidade da dengue, correlacionando-os com níveis de viremia (ENDY et al. 2004; GUBLER et al., 1981; GUILLARDE et al.; 2008; LAOPRASOPWATTANA et al., 2005; LIBRATY et al., 2002; MURGUE et al., 2000;

WANG et al., 2006). No entanto, os estudos sobre a cinética de viremia em pacientes com diferentes formas clínicas de dengue são relativamente escassos, particularmente utilizando métodos precisos de quantificação viral. A maioria desses estudos, que busca correlacionar carga viral com a forma mais grave da doença, foi realizada utilizando amostras coletadas de crianças com infecções secundárias, além de ter estudado mais de um sorotipo (ENDY et al., 2004; GUILLARDE et al., 2008; LIBRATY et al., 2002; SUDIRO et al., 2001; VAUGHN et al., 2000) e utilizado os mais diversos métodos de quantificação viral. Porém, são a base do conhecimento que se tem, atualmente, sobre a patogênese da dengue, apresentando, contudo, os mais diferentes resultados. Estas diferenças demonstram a complexidade em associar níveis de circulação de vírus com o desenvolvimento de gravidade da doença.

Este estudo apresenta algumas características que favorecem uma análise mais clara, uma vez que foi realizado em uma coorte bastante homogênea, cujas amostras foram coletadas em um período em que apenas o vírus dengue sorotipo 3 estava circulando de forma endêmica, e com mais de cinco anos após ter ocorrido as epidemias pelo DENV-1 e DENV-2. Esta condição leva à redução de alguns fatores complicadores e permite estudar o comportamento de infecções causadas pelo DENV-3 e um só genótipo (genótipo Índia Subcontinental) (CORDEIRO, 2008).

Neste estudo foi demonstrado que os níveis de viremia das infecções primárias e secundárias de dengue 3 são basicamente os mesmos, sugerindo que nesta coorte, a presença de anticorpos contra dengue 1 ou 2 não induziram necessariamente um maior nível de viremia ou alterações significantes na cinética da viremia. Isto sugere que a presença de anticorpos não neutralizantes não interfere indiscriminadamente nos níveis de viremia. Os níveis de viremia foram maiores nas formas mais graves de dengue (FHD e DCC), em presença de plaquetopenia, que em D e DC, indicando que o nível de viremia está associado com a sintomatologia e a presença de plaquetopenia. Maiores níveis de viremia nas formas mais graves da doença foram observados por Libraty et al. (2002), estudando crianças com infecções secundárias por DENV-3; por Vaughn et al. (2000), em um estudo com crianças infectadas por DENV-1 ou DENV-2; por Murgue et al. (2000), analisando amostras de crianças infectadas por DENV-2 (forte associação) ou DENV-1 (fraca associação). Porém, não foram observados por Endy et al. (2004), que estudou crianças com infecções secundárias por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3 e por Gubler et al. (1981), que analisou infecções por DENV-3. Sudiro et al. (2001), no entanto, encontrou maiores níveis de viremia em DC que em FHD, ao estudar crianças com infecções secundárias por DENV-1 ou DENV-2.

Semelhantemente ao achados das correlações da carga viral com gravidade da doença, diferentes achados têm sido relatados em relação à duração da viremia. Vaughn et al. (2000) e Gubler et al. (1981) não encontrou correlação. Mas, Murgue et al. (2000), Wang et al. (2006) e Guillaude et al. (2008) observaram que a duração da viremia era maior em FHD, com viremia detectada na fase de defervescência.

Quanto à correlação dos níveis de viremia com os tipos de infecção, a maioria dos estudos tem sido realizada apenas utilizando amostras de pacientes com infecções secundárias. Dentre os que analisaram os dois tipos de infecção, Harris et al. (2000), Murgue et al. (2000) e Guillaude et al. (2008) não encontraram associação. Ainda em relação ao tipo de infecção, Vaughn et al. (2000) observou que a viremia era mais prolongada em infecções primárias. Correlacionando a gravidade da doença com tipo de infecção, Sudiro et al. (2001) referiram a observação de maior número de FHD em infecções secundárias. Enquanto que Hammond et al. (2005), estudando uma população de 3.173 casos suspeitos de dengue, composta de crianças e adultos, identificaram infecções secundárias como fator de risco de FHD em crianças, mas não em adultos, sugerindo um padrão de doença com caráter diferente entre adultos e crianças.

Na coorte da qual os pacientes aqui estudados fazem parte, não foi observada diferença entre a frequência de infecção primária e secundária, tanto para os casos de FHD, como para os de DCC (CORDEIRO et al., 2007). Em um estudo incluindo os padrões clínicos dessa mesma coorte (BRITO, 2007), foi observado que a FHD foi mais prevalente entre adultos do que em crianças. O padrão de manifestações clínicas foi semelhante entre as diferentes faixas etárias com dengue clássica, mas com baixa prevalência de casos de FHD entre a faixa pediátrica quando comparada com adultos, o que indica um padrão de doença com caráter mais benigno entre as crianças infectadas pelo vírus dengue sorotipo 3 em nossa região. Esses dados diferem do padrão epidemiológico observado na Ásia, onde circulam os quatro sorotipos, e as formas mais graves da doença têm sido observadas em crianças (ENDY et al., 2002). De acordo com um estudo realizado em Cuba (GUZMÁN et al., 2002), o risco de uma criança morrer durante uma infecção secundária pelo vírus dengue sorotipo 2 é aproximadamente 15 vezes maior que o risco em adultos. Esses resultados demonstram que a idade é uma importante variável nas infecções secundárias, mas que outros fatores devem estar envolvidos na patogênese da FHD. É possível que com o surgimento de novas epidemias e a entrada de mais um sorotipo (DENV-4), o padrão epidemiológico atual da nossa região seja modificado.

Neste estudo também foi realizada a análise de correlação da carga viral, formas clínicas e tipo de infecção com os níveis de plaquetas, hematócrito e transaminases. Os valores mais baixos de plaquetas foram observados nas infecções primárias, mas não foi observada correlação com a viremia. Associações entre níveis de plaquetas e tipo de infecção não têm sido freqüentemente citadas, apesar de trombocitopenia ser um achado constante nos casos de FHD e muito comum em DC (SRICHAIKUL; NIMMANNITYA, 2000). Estudo sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos da dengue no Recife (MONTENEGRO et al., 2006) revelou diminuição de plaquetas, cerca de duas vezes em pacientes com sangramentos, comparados com aqueles que não sangraram. No entanto, a intensidade de sangramento não tem apresentado correlação com os níveis de plaquetas. Foi demonstrado que apenas 15% dos casos de choque (Grau IV) com plaquetopenia inferior a $50.000/\text{mm}^3$ apresentavam sangramentos graves (SRICHAIKUL; NIMMANNITYA, 2000).

O percentual de hemoconcentração, avaliado através da determinação de hematócrito, não apresentou correlação com o nível de carga viral, ao contrário do que foi observado por Libraty et al. (2002), que estudou uma população de crianças. A pequena variação do hematócrito entre as amostras analisadas durante este estudo, comumente observada em adultos, demonstra a dificuldade em se utilizar esse parâmetro como critério para confirmação e classificação dos casos suspeitos. Diante da necessidade de identificação de um valor basal de hematócrito para fechar o critério da Organização Mundial da Saúde (1987) quanto à hemoconcentração (aumento de 20%), muitas vezes só se consegue fechar tal critério na fase de convalescença (BRITO, 2007; CORDEIRO, 2008). Tem sido proposto que hemoconcentração isoladamente não seja apropriada para definição de alterações de permeabilidade capilar, uma vez que o aumento de hematócrito pode ser mascarado em determinadas situações, como administração precoce de fluídos intravenosos e quando há perda excessiva de sangue devido a hemorragias (BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2006).

Existem, atualmente, vários questionamentos sobre os critérios utilizados pela OMS para definição e classificação dos casos de FHD, sugerindo reavaliação dos mesmos, principalmente em relação à utilização da hemoconcentração para demonstração de alterações de permeabilidade, que considerem variações geográficas e de faixa etária (BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2006; BALMASEDA et al.; 2005; RIGAU-PÉREZ, 2006).

Os níveis de transaminases têm sido avaliados para o estudo do impacto da dengue sobre a função hepática. Nesse estudo, maiores níveis de transaminase glutâmico oxalacética

foram encontrados nos oito primeiros dias da doença. Resultados semelhantes foram observados por Souza et al. (2007) e Kuo et al. (1992).

Os níveis de TGO não correlacionaram com a carga viral, porém foram mais elevados em infecções secundárias e na forma mais grave da doença avaliada (DCC). Em relação às formas clínicas avaliadas, os níveis de TGP foram mais elevados na primeira semana de início dos sintomas na DCC, permanecendo elevadas por mais tempo que a TGO. A partir da primeira semana, não houve diferença significativa entre as formas clínicas e os valores de TGP. Libraty et al. (2002) também não encontraram associação entre os níveis de transaminases e carga viral, mas observaram maior elevação de TGO em relação à TGP. Entretanto, estes autores não estudaram a correlação dessas enzimas com as formas clínicas e realizaram o estudo apenas com amostras de pacientes com infecções secundárias. Em um estudo realizado por Kalayanarooj et al. (1997), foram encontrados níveis mais elevados de TGO em crianças com FHD que naquelas com DC, sendo esse achado sugerido como valor preditivo negativo para FHD. Wichmann et al. (2007) observaram níveis medianos de TGO e TGP mais elevados em pacientes com sangramentos espontâneos e outras manifestações graves.

A alteração da função hepática tem sido atribuída principalmente ao efeito direto do vírus dengue sobre esse órgão. Entretanto, uma resposta imunológica desregulada do hospedeiro contra o vírus pode ter um papel importante (SENEVIRATNE; MALAVIGE; SILVA, 2006). O achado de maiores níveis de transaminases nas formas mais graves da doença e em infecções secundárias sem, no entanto, correlacionar com a viremia, pode ajudar na compreensão do processo imunopatológico da infecção.

As diferentes manifestações de DC, FHD e SCD podem ser causadas por variantes do vírus dengue. Diferenças estruturais têm também sido encontradas em vírus isolados de pacientes com DC e FHD (LEI et al., 2001). Em geral, genótipos asiáticos parecem ser mais virulentos do que aqueles encontrados inicialmente nas Américas e Pacífico Sul (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Além disso, o padrão clínico-epidemiológico da dengue nas Américas tem apresentado comportamento diferente do observado na Ásia, onde as formas graves da doença têm sido frequentemente descritas em crianças (BRITO, 2007). Isto pode ser explicado pelo fato da maioria dos países das Américas não ter ainda os quatro sorotipos circulando concorrentemente como na Ásia, havendo ainda adolescentes e adultos susceptíveis a novos sorotipos.

A patogênese da dengue é um processo multifatorial e exceções frequentemente ocorrem (ENDY et al., 2004). A epidemiologia da dengue tem variado de país para país e

possivelmente de acordo com o sorotipo e a cepa do vírus, o que salienta a necessidade de se estudar as características epidêmicas em diferentes regiões (HARRIS et al., 2000). Além disso, fatores virais e do hospedeiro parecem operar de maneira desigual em diferentes regiões do mundo e entre populações geneticamente diferentes.

Outros mecanismos de patogênese, independentes da ocorrência de infecções secundárias, devem estar envolvidos na gravidade da dengue. Para entender esses mecanismos devem ser realizados estudos de fatores virais e interações vírus-vetor e vírus-hospedeiro (MURGUE et al., 2000). As evidências sugerem que ambos os fatores, virais e imunes do hospedeiro estão envolvidos na patogênese da gravidade da dengue. Infelizmente, o papel de cada um deles não é completamente entendido e a falta de um modelo animal tem dificultado os estudos nessa área. Como consequência, estudos como este aqui descrito, podem servir de base para investigações de correlações com fatores genéticos e imunológicos, que já vêm sendo desenvolvidas pelo nosso grupo.

REFERÊNCIAS

- BALMASEDA, A. et al.. Assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, p. 1059-1062, 2005.
- BANDYOPADHYAY, S.; LUM, L.C.S.; KROEGER, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case definition for dengue haemorrhagic fever. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 8, p. 1238-1255, 2006.
- BRITO, C. A. A. **Dengue em Recife, Pernambuco: padrões clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e fatores de risco associados à forma grave da doença.** 2007. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.
- CLARKE, D. H., CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.7, p. 561-573, 1958.
- CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.
- CORDEIRO, M. T. **Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987 – 2006: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes.** 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

- CORDEIRO, M. T. e tal. 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, 2007.
- ENDY, T. P. et al.. Relationship of Preexisting Dengue Virus (DV) Neutralizing Antibody Levels to Viremia and Severity of Disease in a Prospective Cohort Study of DV Infection in Thailand. **The Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, p. 990-1000, 2004.
- ENDY, T. P. et al.. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection : A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 156, p. 40-51, 2002.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.
- GUBLER, D. J. et al.. Viremia in patients with naturally acquired dengue infection. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 59, p. 623-630, 1981.
- GUILLARDE, A. O. et al.. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. **The Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 197, p. 817-824, 2008.
- GUZMÁN, M. G. et al.. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 6, p. 118-124, 2002.
- HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 42, p. 350, 1970.
- HAMMOND, S. N. et al.. Differences in Dengue Severity in Infants, Children, and Adults in a 3-year Hospital-Based Study in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 1063-1070, 2005.
- HARRIS et al.. Clinical, Epidemiologic, and Virologic Features of Dengue in the 1998 Epidemic in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 63, p. 5-11, 2000.
- HENCHAL. E. A. et al.. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.31, p. 830-836, 1982.
- IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **The Journal of General Virology**, London, v. 40, p. 531-544, 1978.
- KALAYANAROOJ, D. W. et al.. Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, p. 313-321, 1997.
- KUO, C. H. et al.. Liver biochemical tests and dengue fever. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 47, p. 265-270, 1992.

LANCIOTTI, R. S. et al.. Rapid Detection and Typing of Dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase Polymerase chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 545-551, 1992.

LAOPRASOPWATTANA, K. et al.. Dengue Virus (DV) Enhancing Antibody Activity in Preillness Plasma Does Not Predict Subsequent Disease Severity or Viremia in Secondary DV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 192, p. 510-519, 2005.

LEI, H-Y. et al.. Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **Journal of Biomedical Science**, Dordrecht, v.8, p. 377-388, 2001.

LIBRATY, D.H. et al.. Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.185, p. 1213-21, 2002.

LIGON, B.L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: A review of the history, transmission, treatment, and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, New York, v.16, n.1, p. 60-65, 2004.

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. 9-13, 2006.

MURGUE, B. et al. Prospective Study of the Duration and Magnitude of Viraemia in Children Hospitalised During the 1996-1997 Dengue-2 Outbreak in French Polynesia. **Journal of Medical Virology**, New York, v.60, p. 432-438, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue Prevention and control**, Fifty-five World Health Assembly A55/19 Geneva, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle**. Genebra, 1987.

RIGAU-PÉREZ, J. G. Severe dengue: the need for new case definitions. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, p. 297-302, 2006.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al.. The reappearance of dengue-3 and subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 355-362, 2002.

ROSEN, L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26, p. 337-343, 1977.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 113, p. 946-951, 2004.

SABIN, A. B. Research on Dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.1, n.30, p.30-50, 1952.

SENEVIRATNE, S. L., MALAVIGE, G. N., SILVA, H. J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 100, p. 608-614, 2006.

SOUZA, L. J. et al.. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferases levels. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v.11, n. 4, p. 407-410, 2007.

SRICHAIKUL, T.; NIMMANNITYA, S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. **Baillières Clinical Haematology**, London, v.13, n.2, p. 261-276, 2000.

SUDIRO, T. M., et al. Analysis of Plasma Viral RNA Levels During Acute Dengue Virus Infection Using Quantitative Competitor Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 63, p. 29-34, 2001.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 181, p. 2-9, 2000.

WANG, W. K. et al. Slower Rates of Clearance of Viral Load and Virus-Containing Immune Complexes in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 43, p. 1023-1030, 2006.

WICHMANN, O. et al. Severe Dengue Virus Infection in Travelers: Risk Factors and Laboratory Indicators. **The Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, p. 1089-1096, 2007.

ANEXOS

Título do Projeto: Estudo de cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 em formas clínicas da dengue com diferentes níveis de gravidade

Pesquisador responsável: Ana Maria da Silva

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 24/08/2007


Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 74/07

Registro no CAAE: 0074.0.095.000-07

PARECER Nº 056/2007

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 26 de novembro de 2007.



Dr^a Zuleia Maria de Medeiros
Biomédica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ