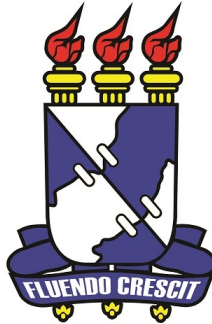


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



VICTOR CRISTIANO RAMOS GOMES

**Diagnóstico, genótipo e epidemiologia de casos de Dengue-4 no Estado de
Sergipe – Nordeste do Brasil**

**Aracaju - SE
Agosto/2015**

VICTOR CRISTIANO RAMOS GOMES

Diagnóstico, genótipo e epidemiologia de casos de Dengue-4 no Estado de Sergipe – Nordeste do Brasil

Monografia apresentada ao Colegiado de Medicina da Universidade Federal de Sergipe como exigência parcial para a graduação no curso de Medicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roseli La Corte dos Santos

**Aracaju - SE
Agosto/2015**

VICTOR CRISTIANO RAMOS GOMES

Diagnóstico, genótipo e epidemiologia de casos de Dengue-4 no Estado de Sergipe – Nordeste do Brasil

Monografia apresentada ao Colegiado de Medicina da Universidade Federal de Sergipe como exigência parcial para a graduação no curso de Medicina.

APROVADA em ____ / ____ / ____

Autor: Victor Cristiano Ramos Gomes

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roseli La Corte dos Santos

**Aracaju – SE
Agosto/2015**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa o fim da minha jornada como discente da graduação. Foram longos e, ao mesmo tempo, rápidos 6 anos de curso, esse momento especial só é possível, pois sempre estive acompanhado e tenho a agradecer aos que me apoiaram.

Em primeiro lugar agradeço a Ele, que ilumina o meu caminho. Deus, obrigado por todas as graças que me destes, ao seu lado sei que nada será impossível.

A meus pais, vocês são meus exemplos de vida, superação e união. Meu pai, sempre firme, dizendo o “não” necessário e me dando mais que o possível. Minha mãe, sempre com muito carinho, se doando e servindo pelo meu conforto, sua bondade não tem igual. Nunca poderei retribuir igualmente o que me foi dado, mas sempre farei o possível. Amo muito vocês, essa conquista é de vocês.

A meu amor, Maria Alice, companheira de toda hora, que me ajudou a superar cada desafio, compartilhando todos os momentos, obrigado pela paciência e seu amor. Agradeço, também, por aqueles que colocastes no meu caminho, em especial sua família e meu cunhadinho, João. Alice, nosso amor está só no começo e ao seu lado muitas vitórias e felicidades viveremos. Te amo muito.

Agradeço a minha família, obrigado por estar sempre ao meu lado: meus avós Neilde, Maria e Deda; meus tios Marlon (padrinho), Clélia (madrinha), Mário, Elizângela, Elizabete, Elizane, Maurício...; meus primos Leonardo, Miller, Clédlon, Marcela, Michele, Júnior...; meu afilhado Nicolas. Obrigado por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço, em especial, a minha prima Vanessa, que além do carinho de prima, me convidou para participar desta pesquisa, que já lhe rendeu o título de Mestre em Biologia Parasitária. Seu apoio e orientação foi fundamental para eu chegar aqui.

A minha orientadora, Prof.^a Dr^a Roseli La Corte dos Santos, por ser sempre solícita e disponível para o que precisasse. Seu conhecimento, paciência e apoio foi essencial na conclusão do meu curso. Obrigado por poder dividir seus conhecimentos comigo me orientando.

Ao IEC pela parceria na análise das amostras no tocante a caracterização genotípica, obrigado.

Ao LACEN/SE, por ceder as amostras utilizadas nessa pesquisa e por todas as vezes em que precisei de informações e de fichas, estas foram atendidas prontamente por Sandra, Neucilene e Danusa. Muito obrigado.

A meus amigos da natação, irmãos que a vida me deu, com quem sei que sempre poderei contar. As piscinas nos uniram para sempre, Igor, Adson, Uitan, Andress, Gustavo, Antônio e tio Walter, vocês são como uma família.

A meus amigos do colégio, Magão, André e Gildo, amizade sincera e para sempre, com vocês a risada é certa, agradeço a todos.

Ao amigos da faculdade, laços fortes de amizade foram construídos, especialmente com aqueles cuja prática, anseios e dúvidas compartilhei, Latino, Nathan, Ruy (os 3 náufragos, não sei o que seria sem vocês), Bruno Augusto, Polinômios, Tomhara, Talmay e muitos outros amigos da turma e do internato, obrigado a todos por contribuírem na minha formação.

Agradeço aos que dentro e fora da faculdade fizeram um diferencial na minha formação, em especial aos Doutores Esdras, Hamilcar, Paulo Vicente, Valdinaldo, Stela, Márcio, Renato Mesquita, Thais, Eleonora, Vieira, Rubens e muitos outros.

Aos que torceram e fizeram parte dessa trajetória, direta ou indiretamente, continuarei a fazer meu melhor para orgulhá-los.

RESUMO

Introdução: Este trabalho analisa o teste NS1, método diagnóstico usado de rotina para triagem pelo Programa Nacional de Dengue para os sorotipos circulantes no Brasil, e descreve as características epidemiológicas da dengue em Sergipe, Nordeste do Brasil.

Métodos: Amostras de sangue foram solicitadas ao Laboratório Central de Sergipe (LACEN/SE) de setembro de 2011 a setembro de 2012 e submetidas a semi-nested RT-PCR para dengue. As amostras positivas nesse teste para DENV-4 foram confirmadas através de isolamento viral e Imunofluorescência Indireta e tiveram seus genótipos identificados por sequenciamento genético. Os dados epidemiológicos dos pacientes foram obtidos na Ficha de Investigação de Dengue do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN e na Requisição de Exame pelo Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL.

Resultados: A maioria das amostras da capital Aracaju são de pessoas que reside em bairros considerados de média-baixa e baixa renda familiar, onde a SUS-dependência é considerada alta. O sexo feminino foi mais afetado e a faixa etária predominante foi de 19 a 59 anos. Os meses de maior incidência no período estudado foram janeiro, fevereiro e março de 2012. Esse estudo mostrou sensibilidade do teste NS1 Ag para dengue de 34.9%, comparando com o resultado do RT-PCR. As amostras positivas foram 113 de DENV-4 e 1 de DENV-1, detectando casos de DENV-4 desde o primeiro mês de estudo (Setembro de 2011). Todas amostras estudadas foram agrupadas dentro do genótipo II de DENV-4.

Conclusão: A sensibilidade e especificidade do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag como método de rastreamento para monitorar circulação dos sorotipos de dengue deve ser reavaliado. Além disso, os perfis epidemiológicos regionais também devem ser considerados devido à prevalência de respostas secundárias a infecções prévias de DENV que pode interferir nos resultados do NS1.

SUMÁRIO

I.	Revisão de literatura.....	7
II.	Referências.....	18
III.	Artigo.....	24
	3.1 Página de Rosto.....	24
	3.2 Abstract.....	26
	3.3 Resume.....	27
	3.4 Introduction.....	28
	3.5 Methods.....	29
	3.6 Results and Discussion.....	31
	3.7 Conflict of Interest.....	38
	3.8 References.....	39
	3.8 Figures and Subtitles.....	47
V.	Apêndice.....	52
VI.	Anexos.....	53

I. REVISÃO DE LITERATURA

A dengue é considerada a mais importante das arboviroses que afetam o ser humano, sendo transmitida principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*. Estima-se que 80 milhões de pessoas, distribuídas por 100 países de todos os continentes (exceto a Europa), se infectem anualmente. A mortalidade também está interligada à doença, associada a uma letalidade de 5-50% quando o paciente desenvolve a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da doença (WHO, 2009).

O vírus da dengue é um arbovírus, do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Seu RNA genômico é uma molécula de cadeia única, sentido positivo, de 11 Kb de comprimento. O genoma contém um único quadro de leitura aberta (ORF), que codifica para três proteínas estruturais: a proteína do nucleocapsídeo ou do núcleo (C), uma proteína associada à membrana (M), e a proteína de envelope (E); e sete não estruturais (NS), as proteínas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (CHAMBERS et al., 1990). Existiam quatro sorotipos do vírus da dengue, enumerados como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, todos capazes de promover a doença (FIGUEIREDO, 2007), todavia, em 2013 foi relatado um caso de 2007 com um novo sorotipo, DENV-5, na Malásia (MUSTAFÁ et al., 2015).

A distribuição geográfica do mosquito transmissor apresenta relação direta com a epidemiologia da dengue e depende do deslocamento de pessoas infectadas. Dessa forma, 3.5 bilhões de pessoas estão expostas à arbovirose (WHO, 2009). A transmissão se dá quase sempre através de vetores hematófagos, sendo o homem a principal fonte de infecção e reservatório da doença. Além de *Aedes aegypti*, outro mosquito, *Aedes albopictus*, também é capaz de transmitir o vírus da dengue, tendo sido introduzido nas Américas mais recentemente, embora não haja comprovação de sua participação como vetor no Brasil (FORATTINI et al., 2000). A fêmea do mosquito adquire o vírus se alimentando do sangue de algum indivíduo infectado na fase de viremia, que começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o 6º dia da doença. Após 8 - 12 dias ela está apta a transmitir o vírus a outro ser humano (FIGUEIREDO, 2007). Uma forma de transmissão, com poucos relatos, é a transmissão vertical, está associada à infecção materna no terceiro trimestre da gestação

levando a uma taxa de prematuridade de 55%. Os recém nascidos podem adquirir o vírus por contato direto com sangue materno através da ingestão, via respiratória e pequenas lesões na pele (FATIMIL et al., 2003).

Os primeiros surtos da doença foram descritos no século XVIII, na Ásia, na África e nas Américas. No Brasil, a história da dengue teve início no século XIX, sendo praticamente controlada na década de 20, quando *Aedes aegypti* foi erradicado, devido ao programa de combate à febre amarela. No ano de 1981 a doença voltou ao Norte do país em Boa Vista-RR com circulação do DENV-1 e do DENV-4 (OSANAI et al., 1983) e, em 1986-87 uma epidemia de grandes proporções pelo DENV-1 assolou a cidade do Rio de Janeiro e logo se disseminou por toda área litorânea entre o Rio de Janeiro e os estados do Nordeste. Foram mais de 92.000 casos notificados. Em 1990, um novo surto se iniciou no Rio de Janeiro e Niterói, desta vez com o DENV-2. Cerca de 300 casos de FHD foram notificados, com algumas mortes (NOGUEIRA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2005).

A partir de então os números da doença no Brasil só tenderam a aumentar, culminando com a grande epidemia no Rio de Janeiro em 2002, quando foram registrados 800 mil casos no país, principalmente associada ao DENV-3 (SIQUEIRA Jr. et al., 2005). Em 2008, mais de 700.000 casos foram registrados em todo país, resultando em 45 mil internações por dengue com a recirculação do DENV-2 (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Em 2010 o DENV-4 foi isolado a partir de amostras de Boa Vista, e sua circulação no país foi reconhecida pelas autoridades brasileiras após 28 anos de sua ausência (TEMPORÃO et al., 2011). Em 2011 foi registrada a circulação simultânea dos quatro sorotipos em Manaus, Estado do Amazonas (BASTOS et al., 2012).

Em 2012 os quatro sorotipos foram registrados, com predomínio dos tipos DENV 1 (59,3%) e DENV 4 (36,4%). Houve predomínio de DENV 4 na região Norte (85,5% dos casos) e Nordeste (81,5% dos casos), enquanto no Centro-Oeste e Sul o DENV 1 foi mais incidente (53,3% e 83,8% dos casos, respectivamente). Na região Suldeste houve equilíbrio entre DENV 1 e DENV 4 (BRASIL, 2012).

Em 2013 foi registrada a maior epidemia de dengue no Brasil com 1,4 milhão de casos notificados (BRASIL, 2014). Em 2015, até 30 de maio, foram registrados 1 milhão de casos prováveis de dengue, sendo que 47% desse total ocorreram no estado de São Paulo (BRASIL, 2015b). Até junho de 2015, 12.433 amostras de casos suspeitos foram enviadas para

realização do exame de isolamento viral, sendo 5.621 positivos (45,2%). Houve predomínio de DENV1 (93,2%), seguido de DENV4 (5,6%), DENV2 (0,9%) e DENV3 (0,3%) (BRASIL, 2015a).

A partir de setembro de 2014, outro arbovírus do gênero Flavivírus passou a circular no Brasil, o chikungunya, que é transmitido pelo mesmo vetor da dengue. A transmissão autóctone foi detectada pela primeira vez no estado do Amapá. Nesse ano foram confirmados 2.772 casos de CHIKV no Brasil, a maioria no Amapá (1.554 casos) e na Bahia (1.214 casos), foram confirmados também em: Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Roraima e Goiás. Em 2015, até a 12ª semana epidemiológica, 1.513 casos foram confirmados, sendo que 735 foram no Amapá, onde o genótipo do CHIKV é o asiático e 778 foram na Bahia, causada pelo genótipo Africano. Por apresentar características clínicas semelhantes à dengue e pela maioria dos casos de chikungunya ocorrer em áreas endêmicas de dengue, há aumento da 'hance de erro no diagnóstico clínico (HONÓRIO, 2015).

Mais recentemente, em abril de 2015 o MS confirmou os primeiros casos de zica, arbovírus de mesmo gênero e transmitido pelo mesmo vetor que a dengue e o chikungunya. Até 28 de maio de 2015 foram confirmados 32 casos de ZIKAV, sendo que 18 no Rio Grande do Norte, 8 na Bahia, 3 em Alagoas, 2 em São Paulo e 1 no Pará. A maioria dos pacientes infectados são assintomáticos (80%), o que dificulta sua detecção (OLIVEIRA, 2015).

Para reduzir o número de casos, o Brasil mantém um programa permanente de controle do mosquito transmissor com repasse de aproximadamente R\$ 1,25 bilhão aos estados e municípios para a manutenção de ações de vigilância, prevenção e controle da doença (BRASIL, 2015b).

A cidade de Aracaju, capital do estado de Sergipe, seguiu a mesma tendência nacional, com aumento da ocorrência de casos de dengue com o passar dos anos. O coeficiente de incidência da doença elevou-se consideravelmente a partir de 2002 (com a introdução do DENV-3 no país) a 2008 subindo de 397 para 1.954 casos por 100.000 habitantes (ALVES et al., 2011). Até junho desse ano foram enviadas 27 amostras de Sergipe para sorologia, sendo que dessas 20 foram confirmadas com 90% de DENV 1 e 10% de DENV 4(BRASIL, 2015a).

A patogênese da dengue é complicada e multifatorial, envolvendo fatores virais e do hospedeiro. Após inoculação do DENV na pele as células de Langerhans e os queratinócitos são as primeiras a serem infectadas, em seguida o vírus se espalha através do sangue

infectando macrófagos em diversos órgãos, principalmente o baço. A eficácia com que o DENV se replica nas células dendríticas, monócitos, macrófagos e nas células dos diversos tecidos e órgãos determina sua carga viral circulante, que representa um importante fator de risco para desenvolver doença grave. A infecção pelo DENV dos macrófagos, hepatócitos, e células endoteliais influencia a hemostasia e as resposta imunes. As células infectadas morrem predominantemente através da apoptose e algumas através de necrose, que resulta na liberação de produtos tóxicos, que ativam a coagulação e sistemas fibrinolítico.

A infecção de células do estroma da medula óssea suprime os níveis de IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e hematopoiese, levando à diminuição da capacidade de coagulação. A elevada carga viral no sangue e a disfunção plaquetária podem resultar em aumento da fragilidade capilar, que se manifesta clinicamente como petéquias, equimoses e sangramento de mucosa, que são características da dengue hemorrágica.

A infecção pelo DENV estimula o desenvolvimento de anticorpos específicos e da imunidade celular. Os anticorpos IgM são produzidos e reagem de forma cruzada com as células endoteliais, plaquetas e plasmina, o que resulta em aumento da permeabilidade vascular e da coagulopatia. Além disso, há um reforço pelos anticorpos IgG durante a infecção secundária por vírus heterólogo e aumenta a infecção de células apresentadoras de antígeno, contribuindo assim para o aumento da carga viral que ocorre durante a viremia secundária em alguns pacientes. Essa carga viral elevada gera um estímulo excessivo das células T por reação cruzada, que, no contexto dos haplótipos HLA, atrasa a eliminação do vírus, enquanto produz níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores. No entanto, muitos fatores ainda precisam ser identificados para saber o que leva as manifestações graves da dengue como a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque da Dengue (SCD) em alguns pacientes enquanto outros não manifestam (MARTINA ET AL., 2009).

A Febre da Dengue (FD) pode ser confundida com qualquer outra doença febril aguda e a confirmação diagnóstica é fundamental para o manejo correto do paciente. Para isso, toda pessoa com doença febril aguda com duração de até sete dias, acompanhada de dois dos sintomas: cefaleia, dor retroorbitária, mialgias, artralgias, prostração ou exantema, associados ou não à presença de hemorragias, é considerada caso suspeito de dengue (WHO, 2009)

Diante desse quadro, uma boa anamnese é necessária, com realização de exame clínico e confirmação laboratorial específica. Esta é orientada de acordo com a situação epidemiológica: em períodos não epidêmicos, a orientação é solicitar o exame de todos os casos suspeitos; em períodos epidêmicos, a confirmação pode ser feita pelo critério clínico-epidemiológico, exceto nos primeiros casos da área, casos de FHD ou de Dengue com Complicações (DCC), os quais deverão ter confirmação laboratorial (WHO, 2009).

Em 2014, o Brasil passou a adotar a nova classificação de casos de dengue da Organização Mundial da Saúde (OMS). Os casos são classificados como dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. A nova classificação não traz prejuízos para a análise da situação epidemiológica, mas torna incorreta a comparação direta de casos graves a partir deste ano com os anos anteriores (BRASIL, 2014).

De acordo com a nova classificação é considerado caso suspeito de dengue a pessoa que resida ou tenha viajado nos últimos 14 dias para área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue ou tenha a presença de *Aedes aegypti*, que apresenta febre, usualmente entre 2 e 7 dias, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações: náusea, vômitos; exantema; mialgias, artralgia; cefaleia, dor retroorbital; petéquias ou prova do laço positiva; leucopenia. Também pode ser considerado caso suspeito toda criança proveniente ou residente em área com transmissão de dengue, com quadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 dias, e sem foco de infecção aparente (WHO, 2012).

É caso suspeito de Dengue com Sinais de Alarme todo caso de dengue que, no período de defervescência da febre apresenta um ou mais dos seguintes sinais: dor abdominal intensa e contínua, ou dor à palpação do abdome; vômitos persistentes; acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, derrame pericárdico); sangramento de mucosas; letargia ou irritabilidade; hipotensão postural (lipotímia); hepatomegalia maior do que dois centímetros; aumento progressivo do hematócrito (WHO, 2012).

Já o caso suspeito de Dengue Grave é todo caso de dengue que apresenta um ou mais dos seguintes resultados: choque devido ao extravasamento grave de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior a três segundos; pulso débil ou indetectável; pressão diferencial convergente ≤ 20 mm Hg; hipotensão arterial em fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória; sangramento grave, segundo a avaliação do médico (exemplos: hematêmese, melena, metrorragia volumosa,

sangramento do sistema nervoso central); comprometimento grave de órgãos tais como: dano hepático importante (AST ou ALT>1000), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos (WHO, 2012).

Os métodos de diagnóstico mais utilizados nas infecções por DENV incluem o isolamento viral em cultura de células, técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos, detecção de ácido nucléico viral pelo RT-PCR (WHO, 2009) e, mais recentemente, a pesquisa de antígeno NS1 (YOUNG et al., 2000, ALCON et al., 2002).

Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial de dengue é feito estabelecendo a cultura de células de mosquito no sistema de isolamento viral (GUBLER & SATHER, 1988). O clone C6/36, de célula de mosquito *Aedes albopictus*, tem sido o mais utilizado nas últimas décadas, por ser altamente sensível à infecção pelos DENV (IGARASHI, 1978). Contudo, representa uma técnica trabalhosa, demorada (de 07 a 10 dias), cara e inadequada para a gestão de pessoas que estão com suspeita de infecção por dengue durante os surtos (KAO et al., 2005).

O ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM ou IgG (MAC-ELISA / G-ELISA) tem sido o método de eleição para o diagnóstico das infecções pelos DENV. É um método rápido, fácil de ser executado e tem se mostrado extremamente útil, tanto para o diagnóstico individual de dengue como para estudos epidemiológicos. Vários testes comerciais de captura IgM e IgG encontram-se disponíveis, possibilitando análise rápida de um grande número de amostras, sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Este algoritmo é uma ferramenta de vigilância importante, mas não permite que o diagnóstico seja feito durante a fase sintomática, quando a maioria das pacientes procuram assistência médica (TELES, PRAZERES, LIMA-FILHO, 2005).

Diversos protocolos de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), têm sido utilizados no diagnóstico rápido das infecções por dengue (LANCIOTTI et al., 1992; FIGUEIREDO et al., 1997; WHO, 2009). Esses testes são importantes por identificar o sorotipo infectante e podem confirmar o diagnóstico nas situações em que o material disponível não é adequado para outras técnicas, mas é um método caro e muitas vezes indisponível em laboratórios de países em desenvolvimento (LANCIOTTI et al., 1992).

Com o objetivo de atender a necessidade de diagnóstico na fase aguda da doença e de aumentar o percentual de positividade do isolamento viral em cultura de células C6/36, o

Ministério da Saúde decidiu utilizar testes diagnósticos rápidos com a proteína NS1 como marcador precoce para garantir um monitoramento mais efetivo dos casos de dengue (BRASIL, 2009b).

O antígeno NS1 está presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia do aparecimento dos sintomas e permanece detectável até o quinto ou sexto dia (XU et al, 2006). A proteína NS1, juntamente com a NS3 e a NS5 possuem os maiores pesos molecular e são as mais conservadas dentre as demais nos *Flavivirus* (ALCOLN et al., 2002; TEIXEIRA, 2012; YOUNG, 2000). A NS1 contém cerca de 350 a 354 aminoácidos e 12 resíduos de cisteína. Está ausente na partícula viral e é produzida em duas formas: associada às membranas (mNS1) e secretada (sNS1). Apresenta elevado grau de reação cruzada entre os 4 sorotipos (VARAS, 2003; ZAINAH et al., 2008).

Em solução, a NS1 forma uma estrutura hexamérica, liga-se a superfície da célula infectada e acumula-se no soro ou plasma em grande quantidade (até 50 ug/mL) (ALCON et al., 2002, LIBRATY et al., 2002). Uma vez dentro do organismo do hospedeiro, a NS1 liga-se às células endoteliais, podendo levar ao aumento da permeabilidade vascular que ocorre nas infecções secundárias. Essa permeabilidade vascular aumentada pode se dar tanto pelo reconhecimento da proteína por anticorpos anti-NS1 como pela formação de complexos imunes, o que levaria a dano endotelial e a extravasamento capilar (AVIRUTNAN et al., 2006).

Apesar da função da NS1 na infecção pelo DENV ainda não ser totalmente conhecida, alguns estudos, além de avaliarem a detecção de NS1 como ferramenta para o diagnóstico, identificaram uma correlação entre a gravidade da doença e a quantidade desse antígeno no soro (YOUNG et al., 2000; LIBRATY et al., 2002). Estudos sugerem que a proteína NS1 pode contribuir para imunopatologia da dengue e associaram a formação de imunocomplexos com a NS1 e sua ligação às células endoteliais como um fator de gravidade, contribuindo para o extravasamento do plasma. Níveis plasmáticos elevados dessa proteína foram associados também à dengue grave em crianças (LIBRATY et al., 2002; AVIRUTNAN et al., 2007). Dessa forma, a detecção precoce de altas concentrações de NS1 como ferramenta para prever a evolução clínica da doença tem sido postulada, mas ainda não foi pesquisada (LIBRATY et al., 2002).

Como a forma hexamérica da proteína NS1 é altamente conservada nos quatro

sorotipos e foi encontrada circulando no soro de pacientes do primeiro ao nono dia após o início da febre (ALCON et al., 2002; YOUNG et al., 2000), ensaios imunoenzimáticos para a detecção específica dessa proteína têm sido desenvolvidos e avaliados para a confirmação de casos agudos primários e secundários de dengue (HANG et al., 2009).

Com o objetivo de avaliar dois testes diagnósticos utilizando NS1, o estudo de Guzman et al. (2010) testou 1.385 amostras de 6 países da Ásia e das Américas. Eles observaram excelente especificidade (100%) para os dois testes, enquanto que a sensibilidade foi baixa, variando de 52 a 66% de acordo com o dia da coleta e início dos sintomas dos pacientes. A sensibilidade diminuída também foi observada para amostras que abrigam DENV-2 (57 a 69%), em países da América Latina (Nicarágua e Venezuela) e da Ásia (Vietnã e Tailândia) (GUZMAN et al., 2010).

No Brasil, três kits comerciais foram testados com 852 amostras do 1º ao 9º dia após o início dos sintomas, de casos oriundos desde a introdução da dengue no Rio de Janeiro em 1986 até o ano de 2008, utilizando amostras da soroteca da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Esse estudo mostrou que o teste Platelia Dengue NS1 Ag-ELISA teve sensibilidade geral 84% e especificidade de 95%. A sensibilidade variável de testes NS1 foi alterada de acordo com os diferentes sorotipos virais. Esta variação foi particularmente evidente para as amostras contendo DENV-3 (65 a 86%). Houve variação da sensibilidade também quando comparadas amostras de infecção primária pelo DENV (95%) e secundária (71%). Contudo, nesse estudo não foram testadas amostras para o DENV-4 devido à ausência de circulação desse sorotipo até o ano do estudo (LIMA et al., 2010).

Outro estudo avaliou a secreção de NS1 no soro de crianças vietnamitas e detectou redução significativa na quantidade de NS1 de acordo com sorotipo e estado imunitário (dengue primária ou secundária). Em geral, a taxa de detecção de NS1 é maior em pacientes com dengue primária do que aqueles que adquirem a doença pela segunda ou mais vezes, por motivo ainda não esclarecidos (DUYEN et al., 2011).

Um número considerável de estudos revelaram que cada sorotipo de DENV é composto de agregados filogeneticamente diferentes que têm sido classificados como genótipos ou subtipos, e cada genótipo também é composto filogeneticamente por diferentes "grupos" (ACOSTA et al., 2011; de MELO, ROMANO, de ANDRADE, 2009; FIGUEIREDO et al., 2010; NUNES et al., 2012). Essa variabilidade genética dos diversos sorotipos da

doença tem sido considerada como fator de preocupação e está provavelmente ligada ao surgimento de casos graves da doença, causados, possivelmente, pela resposta imune do hospedeiro vertebrado a populações virais geneticamente diferentes (BONA, LTWERDOCHLIB, NAVARRO-SILVA, 2012; DRUMOND et al., 2013).

A identificação precisa da variante genética do DENV é importante para compreender a dispersão, a virulência e a identificação de cepas responsáveis por surtos e epidemias. O monitoramento das cepas circulantes torna-se uma ferramenta relevante na detecção da migração de subtipos de DENV envolvidos nessas epidemias, bem como na avaliação do impacto destas variações genéticas na população humana, na virulência e na investigação da origem das estirpes (BONA, LTWERDOCHLIB, NAVARRO-SILVA, 2012; DRUMOND et al., 2013)

Com o objetivo de investigar o genótipo e o sorotipo viral, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* foram capturados e tiveram seus RNAs extraídos, analisados e sequenciados como parte de um programa de vigilância vetorial para detecção de vírus dengue em Manaus-AM. A árvore filogenética mostrou que o vírus detectado neste estudo pertencia ao genótipo I do DENV-4, que é de origem asiática e nunca havia sido descrito no continente americano (de MELO, ROMANO, de ANDRADE, 2009).

A topologia da árvore filogenética sugere a existência de dois subtipos dentro do genótipo I, representada por estirpes das Filipinas e da Tailândia. A árvore filogenética indica que o vírus de Manaus (BR/AM/5B/2008 - HE994136) está intimamente relacionado com os encontrados na China e Filipinas (FIGUEIREDO et al., 2010). Recentemente, foram obtidas 16 sequências *full-length* do DENV-4 de isolados brasileiros (NUNES et al., 2012). Na análise filogenética foi observado que BHI_3681 (JQ513345) cepa isolada de humano (paciente febril autóctone em 2011 em Salvador - BA) é filogeneticamente relacionada com a amostra de mosquitos de Manaus (FIGUEIREDO et al., 2010).

O genótipo II do DENV-4 foi introduzido em 2010 e detectado em Roraima-RR. Tem circulado na América Central, norte da América do Sul e Caribe (ACOSTA et al., 2011). Este genótipo espalhou-se rapidamente pelo Brasil, produzindo surtos nas áreas mais povoadas do nordeste e sudeste. Atualmente, os genótipos I e II do vírus estão circulando em todo país (NUNES et al., 2012).

A abordagem adequada de um caso de dengue se inicia com a classificação de risco

baseada na gravidade da doença. Essa classificação tem por objetivo reduzir o tempo de espera do paciente por atendimento médico, visando à aceleração do diagnóstico, tratamento e internação, quando for o caso. Dessa forma, contribui para a organização do fluxo de pacientes na unidade de saúde e para a priorização do atendimento dos casos de acordo com a gravidade. Os casos são classificados em 4 grupos: A, B, C e D (BRASIL, 2009a).

O Grupo A é composto por todo caso suspeito dengue sem sinais de alarme, sem sangramento espontâneo ou induzido (prova do laço negativa) e que não tenha comorbidades crônicas importantes ou condições clínicas especiais que o classifiquem para o grupo B. Os pacientes deste grupo só necessitam de exames para diagnóstico em situações não epidêmicas. O tratamento é feito em regime ambulatorial com hidratação oral (80ml/kg/dia, sendo 1/3 com soro de reidratação oral e 2/3 restantes com líquidos caseiros) (BRASIL, 2009a).

O caso do Grupo B se diferencia do Grupo A por apresentar pacientes com sangramentos espontâneos ou prova de laço positiva. Também entra neste grupo os portadores de comorbidades crônicas ou condições clínicas especiais (risco social, idade < 2 anos ou > 65 anos, gestantes). São necessários exames específicos e hemograma para todos os pacientes, outros exames podem ser solicitados a critério médico. O paciente deve ser tratado de acordo com o hematócrito, se for normal, tratar igual ao Grupo A, reavaliando-o diariamente. Se o hematócrito estiver aumentado em > 10% em relação ao basal ou, na ausência deste valor, se estiver aumentado absolutamente (Crianças > 42%, mulheres > 44%, homens > 50%) manter o paciente internado para hidratação oral supervisionada (adultos = 80 ml/kg/dia, sendo 1/3 do total na forma de solução salina isotônica (SRO) e ministrado em 4-6 horas: crianças = 50-100 ml/kg de SRO em 4h). Se necessário hidratação venosa (vômitos ou recusa da ingestão oral), administrar hidratação venosa com soro fisiológico ou Ringer lactato na dose de 40 ml/kg em 4h (BRASIL, 2009a).

O Grupo C é todo caso suspeito de dengue com presença de algum sinal de alarme independente das manifestações. O paciente deve ser internado por um período mínimo de 48h, fazer os mesmos exames do Grupo B, mais aminotransferases, albumina sérica, radiografia de tórax, radiografia de abdome e outros exames conforme indicação médica e devem receber hidratação venosa (BRASIL, 2009a).

Os pacientes mais graves são do Grupo D, que é definido por caso suspeito de dengue com presença de sinais de choque, desconforto respiratório ou disfunção grave de órgãos,

independente de manifestações hemorrágicas. Estes pacientes devem ser internados no âmbito da terapia intensiva e realizar exames semelhantes ao do Grupo C, receberão hidratação venosa mais intensa e, conforme a resposta terapêutica, podem ser conduzidos como o Grupo C ou, se não houver melhora, pode-se introduzir colóide, albumina, concentrado de hemácias, plasma, vitamina K e/ou crioprecipitado conforme necessidade (BRASIL, 2009a).

Diante da situação epidemiológica da dengue no Brasil, com a co-circulação dos quatro sorotipos e o relato de um quinto sorotipo, a disponibilização de um diagnóstico sensível e específico é essencial à vigilância da doença. Dessa forma, há necessidade de testes diagnósticos rápidos e eficazes, que detectem a doença na sua fase aguda, quando o paciente busca por atendimento. No país, foram testados kits comerciais para detecção da proteína NS1 de DENV, contudo, o DENV-4 necessita ser mais bem avaliado quanto a sua sensibilidade ou o teste utilizado apresenta diferentes índices de sensibilidade de acordo com a quantidade de vezes que o paciente fora contaminado pelos diversos sorotipos de dengue.

Em 2011 foram detectados os primeiros casos de DENV-4 em Sergipe, este sorotipo foi detectado utilizando RT-PCR, que foi positivo em 58 amostras (48,7%). Todas as amostras haviam sido negativas no Programa NS1 de triagem, sugerindo a subnotificação da DENV-4 devido a baixa sensibilidade do teste de triagem para este sorotipo (SEA et al., 2013).

Faz-se necessário, então um estudo que avalie o teste comercial utilizado pelo Ministério da Saúde do Brasil para identificação de DENV a fim de garantir o estabelecimento do diagnóstico inicial preciso das infecções pela doença. Ao detectar precoce e corretamente os casos de dengue em nosso país, a notificação e a vigilância da doença devem ser mais rigorosas e poderão guiar a implementação de medidas de controle do vetor, atuando preventivamente na expansão de surtos e epidemias.

II. REFERÊNCIAS

- ACOSTA PO, Maito RM, Granja F, Cordeiro JS, Siqueira T, Cardoso MN, Corado AL, Barletta-Naveca RH, Naveca FG. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2011;17:1979–1980.
- ALCON S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol.** 2002. 40:376-81.
- ALVES JAB, Santos JRS, Mendonça ENde, Abud ACF, Nunes M da S, Fakhouri R, Inagaki AD de M, Machioro M, Antonioli AR. Epidemiological aspects of dengue in Aracaju, State of Sergipe, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2011; 44(6):670-673.
- AVIRUTNAN P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsr A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul S, Yenchitsomanus P, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S, Malasit P. Vascular leakage in severe Dengue virus infections: a potential role for the non-structural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis.** 2006. 193: 1078–1088.
- AVIRUTNAN P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Atkinson JP, Diamond MS. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparin sulfate and chondroitin sulfate E. **PLoS Pathog.** 2007. 3(11):e183.
- BARRETO ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Rev Estudos Avançados.** 2008. 22:53-72.
- BASTOS MS, Figueiredo RMP, Ramasawmy R, Itapirema E, Gimaque JBL, Santos LO, Figueiredo LTM, Mourão MPG. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. **Rev Soc Bras Med Trop** 2012. 45(3):393-394.
- BLACKSELL SD, Bell D, Kelley J, Mammen Jr MP, Gibbons RV, Jarman RG, Vaughn DW, Jenjaroen K, Nisalak A, Thongpaseuth S, Vongsouvath M, Davong V, Phouminh P, Phetsouvanh R, Day NP, Newton PN. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. **Clin Vaccine Immunol.** 2007. 14:1458-64.
- BONA, ACD; Twerdochlib, AL; Navarro-Silva, MA. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2012 Jun;45(3):297-300.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue.** Brasília, 2009. Acessado em: < http://

bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf> Acessado em: 11 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Protocolo para Implantação de Unidades Sentinelas com triagem de amostras pela técnica NS1/2009**. Disponível em: < <http://www.portal.saude.gov.br>> Acessado em: mai. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013**. Brasília, 2013. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Incidencia-dengue-at-2013.pdf>> Acessado em: 10 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **Sergipe reduz em 31% o número de casos graves de dengue**. Brasília, 2012. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-anteriores-agencia-saude/1912-sergipe-reduz-em-31-o-numero-de-casos-graves-de-dengue>> Acessado em: 14 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **Boletim epidemiológico**. Brasília, 2015a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/06/2015-024---Dengue-SE-23.pdf>> Acessado em: 15 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **Comparativo de casos prováveis de dengue 2014 e 2015 por região e UF**. Brasília, 2015b. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/18027-ministerio-da-saude-divulga-novo-balanco-de-dengue>> Acessado em: 10 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **MS atualiza dados sobre infestação do mosquito em municípios**. Brasília, 2014. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/15473-ms-atualiza-dados-sobre-infestacao-do-mosquito-em-municipios>> Acessado em: 10 jul. 2015.

CÂMARA FP, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRFG, Câmara DCP, Matos RRC. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev Soc Bras Med Trop**, Vol. 40, No. 2, p. 192-196, 2007.

CAVALCANTI LPG, Coelho ICB, Vilar DCLF, Holanda SGS, Escóssia KNF, Souza-Santos R. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2010; 43(4):355-8.

CHAIYARATANA W, Chuansumrit A, Pongthanapisith V, Tangnaratchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2009. 64:91-2.

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

CHUANSUMRIT A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2008. 27:43-48.

DE MELO FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM: Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e390.

DE SOUZA RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, Silveira VR, Silva SJ, Azevedo RM, Tolentino FM, Assis JC, Bassi MG, Dambrós BP, Tumioto GL, Gregianini TS, Souza LT, Timenetsky M do C, Santos CL. Dengue vírus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the veil. *PloS Neg. Trop. Dis.* 2011. 5(12): e1439.

DRUMOND BP, Mondini A, Schmidt DJ, Bronzoni RV De M, Bosch I, Nogueira ML. Circulation of diferente lineages of dengue virus 2, genitype American/Asian in Brazil: Dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PloS One.* 2013; 8 (3):e59422.

DUSSART P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, Storck- Herrmann C, Cesaire R, Morvan J, Flamand M, Baril L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol.* 2006. 13:1185-1189.

DUYEN HT, et al. Kinetics of plasma viremia and soluble nonstruc- tural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *J. Infect. Dis.* 2011. 203:1292–1300.

FELIX AC, Romano M, Centrone C de C, Rodrigues CL, Vilas-Boas L, Araújo ES, de Matos A.M, Carvalho KI, Martelli CMT, Kallas EG, Pannuti CS, Levi JE. Low sensitivity of NS1 Protein testes Evidenced during a Dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012, 19 (12): 1972.

FIGUEIREDO LTM, Batista WC, Igarashi A. A simple reverse transcription-polymerase chain reaction for dengue type 2 virus identification. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997. 92(3): 395-398.

FIGUEIREDO L.T.M. Arboviroses emergentes no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2007. v.40 n.2.

FIGUEIREDO LTM, Owa MA, Carlucci RH, Oliveira L. Estudo sobre diagnóstico laboratorial e sintomas do dengue, durante epidemia ocorrida na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1992; 34(2):121-30.

FLEISS J.L. *Statistical methods for rates and proportions.* New York: John Wiley, 1981. 212-236

FORATTINI O.P, Kakitani I, Santos R LaC dos, Kobayashi K.M, Ueno H.M, Fernande Z. Comportamento de *Aedes albopictus* e de *Ae. scapularis* adultos (Diptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública** 2000. V.34(5).

GUBLER DJ, Sather G. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. **Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue**. 1988. Rio de Janeiro, Brasil.

GUZMAN MG, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS Negl. Trop. Dis**. 2010. 4:e811.

HANG VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, Van Ngoc T, Hien TT, Farrar J, Wills B, Simmons CP. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. **PLoS Negl Trop Dis**. 2009. 3:e360.

HONÓRIO NA, Câmara DCP, Calvete GA, Brasil P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, 2015, v. 31, n. 5, p. 906-908.

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

KAO CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **J. Microbiol. Immunol. Infect**. 2005. 38: 5–16.

KORAKA P, et al. Detection of immune-complex-dissociated non- structural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. **J. Clin. Microbiol**. 2003. 41:4154 – 4159.

LANCIOTTI RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G-J, Vorndam AV. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. Mar, 1992. P. 545-551. **American Society for Microbiology**.

LAPPHRA K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaarnsakul W, Chakorn T, Yoksan S, Wattanamongkolsil L, Thamlikitkul V. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2008. 60:387-391.

LIBRATY DH, Endy TP, Hounng HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **J Infect Dis**. 2002. 185:1213-1221.

LIMA MRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Santos FB. Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. 2010. 4(7): e738.

MONTEIRO ESC, Coelho ME, Cunha IS, Cavalcante MAS, Carvalho FAA. Aspectos epidemiológicos e vetores da dengue na cidade de Teresina, Piauí-Brasil, 2002 a 2006. **Epidemiologia Serviço Saúde**, 2009. V. 18 (4):365-374.

MUSTAFÁ MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**. 2015; V.71: 67–70.

NOGUEIRA RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Santos FB, Araujo ESM, Filippis, AMB, Souza RV, Zagne SMO, Nicolai C, Baran M, Teixeira-Filho G. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1999; 94(3):297-304.

NUNES-ARAÚJO FRF, Ferreira MS, Nishioka SA. Dengue fever in Brazilian adults and children: assessment of clinical findings and their validity for diagnosis. **Ann. trop. med. parasitol**. 2003;97(4):415-9.

NUNES MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, de Lima CP S, Carvalho VL, da Silva EV P, Cardoso JF, Sousa EC, Nunes KN. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. **Emerg Infect Dis**. 2012;18:1858–1864.

OLIVEIRA WK. **Situação atual de Chikungunya e Zika Vírus**. Comissão Itergestores Tripartite, Brasília, 28 de maio de 2015. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/29/2.%20c%20-%20Apresentação%20sobre%20Chikungunya%20e%20Zika%20-%20Atualização%2028mai2015%20-%20versão%20final.pdf>>. Acessado em 15 jul. 2015.

OSANAI CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos ADC, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista Roraima. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1983; 25:53-54.

PHUONG HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hungle Q, Binh TQ, Nam NV, Groen J, de Vries PJ. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2009. 63:372-8.

PIOVENZA R, Rosa SL, Pensuti M, De Azevedo TS, Visockas A, Zuben CJV. Epidemiological study of dengue cases in the municipality of Santa Bárbara d'Oeste/SP. **BEPA**. 2012. V(9):104.

SEA VRF, Cruz ACR, Gurgel RQ, Nunes BTB, Silva EVP, Dolabella SS, dos Santos R La C. Underreporting of Dengue-4 in Brazil Due to Low Sensitivity of the NS1 Ag Test in Routine Central Programs. **PloS One**, 2013. 8(5) e64056

SEKARAN SD, Ew CL, Kantesh BM, Appana R, Subramaniam G. Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. **J. Infect. Developing Countries.** 2007. 1: 182-188.

SIQUEIRA JB, Martelli CMT, Coelho GE, Simplicio ACR, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis** 2005; 11:1:48-53.

TAMURA K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol.** 2011. 28:2731-9

TEIXEIRA MG. 2012. Few characteristics of dengue's fever epidemiology in Brazil. **Rev. Inst Med Trop.** Sao Paulo 54 (Suppl 18):S1-S4.

TEIXEIRA MG, Costa MCN, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cad Saúde Pública** 2005. 21:1307-15.

TELES FR, Prazeres DM, Lima-Filho JL. Trends in dengue diagnosis. **Rev. Med. Virol.** 2005. 15:287-302.

TEMPORÃO JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva, Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF 2011. Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2011. 17: 938-940.

VARAS CY. Rol de las Proteínas no Estructurales en los Eventos de Replicación del ARN del Virus Dengue: Propuesta de un Modelo de Replicación del ARN. **Rev Peru Med Exp Salud Publica.** 2003. 20(1): 51-57.

VASCONCELOS PFC, Lima JWO, Rosa APTA, Timbó MJ, Rosa EST, Lima HR, et al. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: Inquérito soropidemiológico aleatório. **Rev Saúde Pública.** 1998; 32(5): 447-54.

WHO. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: **World Health Organization**; 2009.

WHO. Handbook for clinical management of dengue. Geneva: **World Health Organization**; 2012.

III. ARTIGO

3.1 PÁGINA DE ROSTRO

Diagnosis, genotypic characterization and epidemiology of Dengue-4 in the State of Sergipe –
Northeast, Brazil

Runnig Title: Genotypic characterization Dengue 4 in Brazil

Diagnóstico, genótipo e epidemiologia de casos de Dengue-4 no Estado de Sergipe –
Nordeste do Brasil

Runnig Title: Caracterização genotípica Dengue 4 in Brazil

Vanessa Ramos de Faria Sea, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil.

vanessa.ramos.faria@gmail.com

Ana Cecilia Cruz, Instituto Evandro Chagas, Belém, Brazil and Universidade do Estado do
Pará, Belem, Para, Brazil. anacecilia@iec.pa.gov.br

Victor Cristiano Ramos Gomes, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil.

dr.victorgomes@gmail.com

Silvio Santana Dolabella, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil.

dolabella@ufs.br

Ricardo Queiróz Gurgel, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil.

ricardoqgurgel@gmail.com

*Roseli La Corte dos Santos, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil.

rlacorte@ufs.br

*Corresponding Author: Roseli La Corte Dos Santos: Av. Mal Rondon s/n Cidade

Universitária, São Cristóvão, Sergipe, Brazil. CEP: 49.100-000. Phone and Fax number:

55XX7921056626

Keywords: Dengue-4 genotype. NS1 Ag. Underreporte. Arboviruses.

Palavras-chave: Dengue-4 genotype. NS1 Ag. Subnotificação. Arboviruses.

3.2 ABSTRACT

Introduction: This study analyzes the diagnostic methods routinely used in at Dengue National Program for the circulating serotypes of dengue screening of the in Brazil and describe epidemiological characteristics of the dengue cases in Sergipe, Northeast Brazil.

Methods: Blood samples were requested from the Sergipe Central Laboratory from September 2011 to September 2012 and submitted to semi-nested RT-PCR for dengue. Positive samples for DENV-4 were confirmed by indirect immunofluorescence and had the DNA sequenced. Patients epidemiological data were obtained from the reportable diseases forms filled by the Health service.

Results: The majority of the samples of Aracaju were from people who live in medium-low and low income areas, where public health service dependence is high. Females were more affected and the predominant age group was 19-59 years. The months of highest incidence were January, February and March, 2012. This study showed sensitivity of 34.9% of the NS1 Ag test for dengue, comparing with the result of RT-PCR. Our positive samples were 113 of DENV-4 and 1 of DENV-1, detecting cases of DENV-4 since the first month of the study (September, 2011). All samples studied were grouped within the II genotype of DENV-4.

Conclusion: The sensitivity and specificity of the Platelia™ dengue NS1 Ag test as a screening method for monitoring circulating dengue serotypes must be reevaluated. Regional endo-epidemic profiles should also be considered due to the prevalence of secondary responses to previous DENV infection which may interfere whit NS1 results.

3.3 RESUMO

Introdução: Este trabalho analisa o teste NS1, método diagnóstico usado de rotina para triagem pelo Programa Nacional de Dengue para os sorotipos circulantes no Brasil, e descreve as características epidemiológicas da dengue em Sergipe, Nordeste do Brasil. **Métodos:** Amostras de sangue foram solicitadas ao Laboratório Central de Sergipe (LACEN/SE) de setembro de 2011 a setembro de 2012 e submetidas a semi-nested RT-PCR para dengue. As amostras positivas nesse teste para DENV-4 foram confirmadas através de isolamento viral e Imunofluorescência Indireta e tiveram seus genótipos identificados por sequenciamento genético. Os dados epidemiológicos dos pacientes foram obtidos na Ficha de Investigação de Dengue do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN e na Requisição de Exame pelo Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL. **Resultados:** A maioria das amostras da capital Aracaju são de pessoas que reside em bairros considerados de média-baixa e baixa renda familiar, onde a SUS-dependência é considerada alta. O sexo feminino foi mais afetado e a faixa etária predominante foi de 19 a 59 anos. Os meses de maior incidência no período estudado foram janeiro, fevereiro e março de 2012. Esse estudo mostrou sensibilidade do teste NS1 Ag para DENV-4 de 33.6%, comparando com o resultado do RT-PCR, detectando casos de DENV-4 desde o primeiro mês de estudo (Setembro de 2011). Todas amostras estudadas foram agrupadas dentro do genótipo II de DENV-4. **Conclusão:** A sensibilidade e especificidade do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag como método de rastreamento para monitorar circulação dos sorotipos de dengue deve ser reavaliado. Além disso, os perfis epidemiológicos regionais também devem ser considerados devido à prevalência de respostas secundárias a infecções prévias de DENV que pode interferir nos resultados do NS1.

3.4 INTRODUCTION

Dengue is considered the most important of arboviruses affecting humans. It is more frequently transmitted by the mosquito *Aedes aegypti* and has four serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. Approximately 80 million people in 100 different countries from all continents (except Europe) are infected with the disease each year.¹

After a long period without having significant dengue cases, the first dengue epidemic in Brazil with clinical and laboratory confirmation was registered in 1981, in Boa Vista, North of Brazil, when DENV-1 and DENV-4 were identified.² In 1990, DENV-2 was also detected in Rio de Janeiro, causing an extensive epidemic in the country and the emergence of the first severe cases.^{3,4} A large dengue epidemic occurred in Brazil in 2002, when nearly 800 thousand cases of the disease were reported, most of whom affected by DENV-3.⁵ In 2010, DENV-4 recirculation in Boa Vista was detected⁶ and in 2013 the largest epidemic in Brazil took place when more the 1.4 millions cases were reported.⁷

Dengue Fever (DF) might be misdiagnosed with other diseases currently circulating in Brazil and diagnostic confirmation is essential for the proper management of the patient. A careful medical history is necessary with clinical examination and specific laboratory confirmation.¹ The most used diagnostic methods in DENV infections include serological techniques for detection of specific antibodies, viral nucleic acid detection by RT-PCR¹, viral isolation in cell culture, and more recently the antigen test NS1.^{8,9}

RNAs of mosquitoes can also be extracted and viral serotype evaluated and sequenced. The phylogenetic tree obtained shows the origin of genotype found and suggests how the virus and serotype entered in a specific area.¹⁰ Since 2009, NS1 antigen-capture ELISA test was implemented by the Health Ministry in the Public Health laboratories. A network was created to collect samples for viral isolation to provide early detection of

circulating serotypes in a given area. Patients within five days of disease symptoms onset attended in health care sentinel units were included in the protocol and had the blood screened for DENV.⁹

Blood was collected and sent to the Central Laboratory (Laboratório Central - LACEN/SE) for the Platelia™ test. Positive biological samples were then forwarded to the reference laboratory in Rio de Janeiro for viral isolation. Negative and positive samples were stored in a -80°C and were provided to our group.

Faced with the epidemiological situation of dengue in Brazil, with co-circulation of the four serotypes, a sensitive and specific diagnosis is essential for disease surveillance. Thus, a rapid and effective diagnostic tests able to detect the disease in its acute phase, when the patient seeks care is needed. Commercial kits were tested in the country to detect the NS1 protein of DENV, but, the DENV-4 was not evaluated before for its sensitivity because this serotype had a long time without circulation in Brazil.¹¹ This study analyzes the diagnostic methods used in routine of the Dengue National Program for the screening of the circulating serotypes of dengue in Brazil and describe epidemiological characteristics of the dengue cases in Sergipe, Northeast Brazil.

3.5 METHODS

To investigate the co-circulation of arboviruses in the State of Sergipe, blood samples were requested from the Central Laboratory of Public Health for suspected dengue patients that were negative and positive for the NS1 antigen test (Protocol by the Research Ethics Committee No. 02872312.7.0000.0058). These blood samples were initially evaluated by semi-nested RT-PCR for dengue at the Evandro Chagas Institute (Instituto Evandro Chagas – IEC) to confirm the diagnosis.

In total, 326 samples of serum or blood from symptomatic patients collected between September 2011 and September 2012 were obtained, and sample RNA was extracted using TRIzol® Plus reagent (Invitrogen™, California, US) according to the manufacturers' instructions. Semi-nested RT-PCR was performed according to Lanciotti et al.¹², and a genomic fragment of 511 base pairs (bp) that corresponds to all DENV was obtained, followed by a semi nested PCR using specific primers for each of the four DENV serotypes. Samples were considered positive when DNA fragments measuring 482 bp (DENV-1), 392 bp (DENV-4), 290 bp (DENV-3), or 119 bp (DENV-2) were obtained. The semi-nested RT-PCR products were analyzed on a 3% agarose gel stained with SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA).

The DENV isolation was performed using mosquito cell line (Clone C6 / 36 *Aedes albopictus*) to confirm the results of samples that have their genotype studied. Each serum sample collected during the acute phase of the disease (25 µl) was diluted 1:10 with Leibovitz's medium (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) 2% and 150 µl of fetal bovine serum was added. Once diluted, the sera were inoculated into C6 / 36 cells and incubated for 07 days at 28°C. The cells were collected and infection confirmed by Indirect Immunofluorescência (IIF) using serotype-specific monoclonal antibodies.

For this study four positive samples for DENV-4 by RT-PCR test were randomly selected. They were isolated in C6 / 36 cells of *Aedes albopictus* and its identity confirmed by IIF using monoclonal antibodies to all four serotypes of DENV. They were then submitted to RT-PCR to amplifying fragments corresponding to the E gene of the structural region of the viral genome, where a single fragment of 1200 bp was produced. The resulting amplicon was submitted to sequencing reaction by the Sanger method using specific oligonucleotides. Chromatograms were generated using the analyzed SEQMAN program (DNASTAR)

software. The analysis was based on the formation of contiguous fragments which overlapped through specific oligonucleotides for each virus generated from this analysis, a consensus sequence for each sample. Then the obtained sequences were translated using the EDITSEQ program (DNASTAR) and submitted to the database GENBANK ([genbank/ncbi.nlm.nih.gov](http://genbank.ncbi.nlm.nih.gov)).

The epidemiological data of patients were obtained from the reportable diseases form (SINAN) and evaluated according the Central Laboratory of Public Health and Examination Request from Laboratory Environmental Management System (GAL) were studied through descriptive analysis, percentage distribution and layout in graphs, charts and tables. The confidence interval was used to analyze the dengue occurrence probability between groups. Kappa test was used to evaluate the reliability of diagnosis methods of the study.

For assembly, alignment and homology analysis, SEQMAN, EDITSEQ and MEGALIGN (DNASTAR) programs were used and for the dedrongrams mounting were used the Molecular Evolutionary Genetics Analysis - MEGA, versão 5.0 – 2011 program¹³ using the method neighboring clusters. The model used to neighboring clusters (NJ, neighbor-joining) was Tamura - Nei 2 parameters.

3.6 RESULTS AND DISCUSSION

The incidence of dengue in Sergipe was 189.9 and 224.6 per 100,000 habitants in 2011 and 2012 respectively, when this study was carried out. Surprisingly, the majority of the samples provided for us were from the hinterland city of Simao Dias (43.4%), although the capital Aracaju (23.5%) has always had the highest notification rates of the disease.¹⁴ The reported numbers of cases also point to higher notification in the capital with 5,209 (48.3%) suspected cases and 2,602 (49.9%) confirmed to DENV at the same time of the study. The

city of Simão Dias was in an epidemic year in 2012, with 688 reported cases, however, the number of cases is still far from those presented by the capital.

This fact suggests a failure in Aracaju in the admission of patients suspected of dengue for the screening by the ELISA NS1 test. The same should have happened to the other cities because they appear with high number of reported cases, but they did not have samples tested by NS1 in agreement with the number of cases (Figure 1).

The majority of the patients from Aracaju, 83.5% lives in medium-low and low income areas where the public health service dependence is considered high. As most patients who live in upper middle class areas, seek private hospitals for care who are not sentinels for the NS1 Program.

There was a higher frequency of females (58.9%) compared to males (41.1%) what is already reported in Brazil.^{10,14} Data from 1999 to 2012 confirmed this tendency with a predominance of females in the last 14 years. As the transmission is mainly in domiciliary areas, the observed difference may be justified due to their longer stay in their homes than men and are consequently more exposed. In Brazil, women frequently demand more the health services.¹⁵ The age group between 19-59 years concentrate more than half (58.7%) of the samples analyzed which is consistent to that found in other parts of Brazil.¹⁶

In this study, we found higher frequency of patients who had completed secondary level (41.5%) admitted to the NS1 Program, although this variable has been neglected in the reporting forms. Previous studies showed no positive correlation between dengue infection and the level of education. On the other hand, people with less than eight years of education tend to devalue primary health care and also comprise less the guidelines made by the health care professional.¹⁷

The four most reported symptoms by patients: fever (97.2%), headache (82.5%), myalgia (79.7%) and retro-orbital pain (51.0%) coincide with those reported in other studies in Brazil.^{17,18,19,20}

January (16.7%), February (23.2%) and March (23.5%) of 2012 had the highest number of samples collected during the studied period. However the month of April, March and May proved to be the months of highest peak of the disease in the same period of the study and the past 14 years. The epidemiological distribution of dengue in the Northeast region shows higher incidence of the diseases in the first semester in a historic series of nine years.^{14,21,22} This period in the Northeast region coincides with the warm weather and few episodes of rain. High temperatures (25-28°C) are maintained, ideal for the spread of the mosquito that transmits the disease. This weather and frequent interruption in the water supply, inducing population to keep inadequate water supply stores, provides the favorable conditions to vector proliferation.²³

The incidence of DENV from 1999 to 2012 shows a significant increase in cases of DENV in Sergipe in 2008 (Figure 2), during which the state experienced epidemic predominantly by recirculation of DENV-2. From this time, cases of DENV decreased considerably, returning to rise in 2011, with the introduction of DENV-4, which had not yet been identified at the time.

Due to the presence and easy multiplication of the mosquito, high dengue rates are kept in almost all regions of Brazil (except the South), with the movement of all dengue serotypes in different periods of transmission and sometimes simultaneously.²⁴

The DENV-4 serotype was detected in Brazil for the first time in 1982 during an epidemic of dengue in the north and was absent for 28 years after being eliminated.² In 2010

DENV-4 was isolated from samples of the city of Boa Vista, and the circulation on national territory was recognized by the Brazilian authorities.⁶

In Sergipe, the DENV-4 was not detected until March 2012, although the NS1 program for screening of samples for virus isolation was implemented since 2009. However, when analyzing blood samples from 326 patients included in the program collected between September 2011 and September 2012 using RT-PCR, we found 35.0% (114 cases) positivity for dengue with 113 cases of DENV-4 and 1 case of DENV-1, detecting cases of DENV-4 since the first month of study (Figure 3). This finding indicates an under-reporting of this serotype cases of dengue in Sergipe²⁵ and the information was reported immediately to Brazilian authorities. In the same way, the study conducted by Souza et al.²⁶ reported delays in detection and underreporting of cases of Dengue by this serotype in Brazil probably due to the low sensitivity of Platelia™ Test dengue NS1 to DENV-4, which corroborates the data from this research.

The NS1 antigen is highly immunogenic and has close relationship with the viremic phase of dengue. Assays such as enzyme immunoassays and immuno rapid tests are able to detect the viral particle in the plasma, serum and blood of infected patients in the acute phase of the disease. In general, the performance was considered excellent and the initial diagnosis of dengue is done by such assays.²⁷ However, many different groups of countries reported low sensitivity of NS1 tests in comparison with molecular methods, especially in populations who have experienced several sequential outbreaks of this disease.^{28,29,30,31,32,33,34,35,36,37}

As the low sensitivity is definitely more pronounced in the secondary infections, it has been suggested that the NS1 may be sequestered in immune complexes with IgG. Anti-NS1 antibodies were more frequently identified in secondary infection and the antigen-antibody complex prevented the ability of the assay to detect the free NS1.^{37,38}

Although the information about the immune status of patients was not available to classify dengue infection as primary or secondary, it is possible that many of the subjects were experiencing a secondary infection because of previous epidemics that took place in the state of Sergipe. Most of the infected patients belong to the age group of 19-59 years, having experienced the epidemic of 2002 caused by DENV-3 and another one in 2008.¹⁴ Sergipe is considered endemic for dengue, with a median incidence of 195 cases / 100.000 population in the last 16 years, with successive epidemics since 1996.³⁹

The Platelia™ NS1 Ag test was evaluated on multicenter research and presented an overall sensitivity ranging from 36% (Central America) to 88% (Asian countries), varying according to the serotype and the number of days from the onset of symptoms. When assessed by serotypes, DENV-4 had a sensitivity of 79% (95% CI = 67-91), though it was tested in a small number of samples.³⁷ In this study the sensitivity was 34.9% of the NS1 Ag test for dengue, comparing with the result of RT-PCR, our positive samples were 113 of DENV-4 and 1 of DENV-1. This data was much lower than those presented by Guzman et al.³⁷ in previous studies, 63-94% depending on serotype and immune status.^{9,36}

The negative predictive value was 71.5% at the screening test. This likely delayed the identification of DENV-4 in the state and probably in all the cities that used the same protocol for rapid diagnosis of dengue. These results suggest low sensitivity for DENV-4 in the region and should be considered the simultaneous presence of IgG, suggesting secondary response as a factor for the low sensitivity of the NS1 for the studied samples.

This study found a higher incidence of dengue diagnosed by NS1 Ag test until the fourth day of the onset of symptoms. This fact is consensus in different studies, where the optimal sensitivity is 0-4 days after the onset of symptoms, considering day zero the first day of fever.^{29,36} After this period, reduction in sensitivity is observed, probably due to decrease

the viremia. The same occurred with the samples from zero to four days of illness when analyzed by RT-PCR (Figure 4).

Unlike other self-limited viral diseases, dengue infection can develop and put the patient at risk of death with Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) or Dengue Shock Syndrome (DSS) in a few days. Thus, the establishment of early laboratory diagnosis of DENV infections is very important to guide the implementation of control measures aimed at preventing outbreaks and epidemics.

Although the implementation of the use of NS1 for screening viremic samples has been effective in increasing the percentage of virus isolation and determination of serotype circulating in Brazil.²⁶ The data presented here indicate that current tests should not be used alone in the Brazilian population, due to exposure to this sequential outbreaks of the disease and, as a result, the large number of false negatives.

The findings of this study strongly suggest that DENV-4 was previously circulating in lower prevalence and without being detected by the NS1 test, using molecular test we could positive samples since September 2011 while it was only detected in March 2012 in samples screened with Platelia™ dengue NS1. This delay, explain how quickly the DENV-4 spread throughout the country since its detection in the North in 2010, in South and Southeast in early 2011 and even in small municipalities in the Northeast in mid-2011.^{11,40}

In Brazil, the rapid tests of capture of NS1 antigen were only tested with known positive samples DENV-1, DENV-2 and DENV-3, not testing the sensitivity and specificity for the DEV-4, because this serotype was not circulating in the country.¹⁰ Thus, no correlation sensitivity and specificity could be calculated this serotype.

Positive samples for DENV-4 had also sequenced gene region of the envelope protein from different locations. Phylogenetic analysis of DENV-4 sequences from Sergipe, compared

with genome sequences of 16 DENV-4 obtained from GenBank database, representing the three genotypes, showed that our samples belong to genotype II, similar to findings reported since its reintroduction in Brazil in 2010 and different from DENV-4 previously circulating in Brazil, which was characterized as belonging to genotype I Asiatica origin (Figure 5).⁴¹

The DENV-4 genotype II was responsible for several outbreaks and epidemics in many countries in South America and the Caribbean.^{6,12} Phylogeny and phylogeography Studies in Brazil demonstrated the existence of two genotypes circulation (I and II), and the genotype I detected belongs to an isolated strain of dengue fever case of Bahia in 2011.⁴¹ This serotype which was reintroduced in Brazil has become a major public health problem that can cause an increase in the number of DHF.

Our studied samples had a high degree of affinity (99% of client bootstrap) grouping within the genotype II and were originated from cases of dengue fever, so no connection can be made with the clinical presentation.

In summary, this study shows that the sensitivity of the test may vary in different epidemiological and genetic contexts. Previous dengue infections may have contributed to the high number of false negative during the surveyed period, but the biological causes for the failure of NS1 test still need to be clarified.

Re-evaluation is needed of sensitivity and specificity of Platelia™ NS1 test as a screening method for monitoring the circulating serotypes of dengue.

Regional endo-epidemic profiles should also be considered, as the high prevalence of secondary response may interfere the NS1 results since the dissociation of antibody-antigen of immune complexes is not provided in commercial kits.

3.7 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

3.8 REFERENCES

1. WHO. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: **World Health Organization**. 2009.
2. Osanai CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos ADC, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista Roraima. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo 1983; 25:53-54.
3. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Santos FB, Araujo ESM, Filippis, AMB, Souza RV, Zagne SMO, Nicolai C, Baran M, Teixeira-Filho G. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1999; 94(3):297-304.
4. Teixeira MG, Costa MCN, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cad Saúde Pública**. 2005. 21:1307-15.
5. Siqueira JB, Martelli CMT, Coelho GE, Simplicio ACR, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis**. 2005; 11:1:48-53.
6. Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva, Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF 2011. Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. **Emerg Infect Dis**. 2011. 17: 938-940.

7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **MS atualiza dados sobre infestação do mosquito em municípios**. Brasília, 2014. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/15473-ms-atualiza-dados-sobre-infestacao-do-mosquito-em-municipios>> Acessado em: 10 jul. 2015.
8. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol**. 2000. 8:1053–1057.
9. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol**. 2002. 40:376-81.
10. Lima MRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Santos FB. Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. 2010. 4(7): e738.
11. De Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM: Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? **PLoS Negl Trop Dis**. 2009;3:e390.
12. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G-J, Vorndam AV. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. Mar, 1992. P. 545-551. **American Society for Microbiology**.

13. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol.** 2011. 28:2731–9
14. Alves JAB, Santos JRS, Mendonça EN de, Abud ACF, Nunes M da S, Fakhouri R, Inagaki AD de M, Machioro M, Antonioli AR. Epidemiological aspects of dengue in Aracaju, State of Sergipe, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2011; 44(6):670-673.
15. Bastos MS. Perfil soro epidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação da Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001), 2004. Rio de Janeiro. 85p. Dissertação (**Mestrado em Ciências na área da Saúde Pública**). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca.
16. Piovenzan R, Rosa SL, Pensuti M, De Azevedo TS, Visockas A, Zuben CJV. Epidemiological study of dengue cases in the municipality of Santa Bárbara d'Oeste/SP. **BEPA.** 2012. V(9):104.
- 17 Vasconcelos PFC, Lima JWO, Rosa APTA, Timbó MJ, Rosa EST, Lima HR, et al. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: Inquérito soropidemiológico aleatório. **Rev Saúde Pública.** 1998; 32(5): 447-54.
18. Figueiredo LTM, Batista WC, Igarashi A. A simple reverse transcription-polymerase chain reaction for dengue type 2 virus identification. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1997. 92(3):

395-398.

19. Nunes-Araújo FRF, Ferreira MS, Nishioka SA. Dengue fever in Brazilian adults and children: assessment of clinical findings and their validity for diagnosis. **Ann Trop Med Parasitol.** 2003;97(4):415-9.

20. Cavalcanti LPG, Coelho ICB, Vilar DCLF, Holanda SGS, Escóssia KNF, Souza-Santos R. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2010; 43(4):355-8.

21. Câmara FP, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRFG, Câmara DCP, Matos RRC. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2007 Vol. 40, No. 2, p. 192-196.

22. Monteiro ESC, Coelho ME, Cunha IS, Cavalcante MAS, Carvalho FAA. Aspectos epidemiológicos e vetores da dengue na cidade de Teresina, Piauí-Brasil, 2002 a 2006. **Epidemiologia Serviço Saúde,** 2009. V. 18 (4):365-374.

23. Marteis LS, Steffler LM, Araújo KCGM, Santos RLC. Identificação e distribuição espacial de imóveis-chave de *Aedes aegypti* no bairro Porto Dantas, Aracaju, Sergipe, Brasil entre 2007 e 2008. **Cad Saúde Pública,** fev 2013; 29(2): 368-378.

24. Bastos MS, Figueiredo RMP, Ramasawmy R, Itapirema E, Gimaque JBL, Santos LO, Figueiredo LTM, Mourão MPG. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in

Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. **Rev Soc Bras Med Trop**, 2012. 45(3):393-394.

25. Sea VRF, Cruz ACR, Gurgel RQ, Nunes BTD, Silva EVP, Dolabella SS, dos Santos R La C. Underreporting of Dengue-4 in Brazil Due to Low Sensitivity of the NS1 Ag Test in Routine Central Programs. **PloS One**, 2013. 8(5) e64056

26. De Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, Silveira VR, Silva SJ, Azevedo RM, Tolentino FM, Assis JC, Bassi MG, Dambrós BP, Tumiotto GL, Gregianini TS, Souza LT, Timenetsky M do C, Santos CL. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the veil. **PloS Neg Trop Dis**. 2011. 5(12): e1439.

27. Felix AC, Romano M, Centrone C de C, Rodrigues CL, Vilas-Boas L, Araújo ES, de Matos A.M, Carvalho KI, Martelli CMT, Kallas EG, Pannuti CS, Levi JE. Low sensitivity of NS1 Protein tests Evidenced during a Dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. **Clin Vaccine Immunol**. 2012, 19 (12): 1972.

28. Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, He LJ, Yuen KY, Che XY. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J Clin Microbiol**. 2006. 44:2872-2878.

29. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, Storck- Herrmann C, Cesaire R, Morvan J, Flamand M, Baril L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clin Vaccine Immunol**. 2006.

13:1185-1189.

30. Sekaran SD, Ew CL, Kantesh BM, Appana R, Subramaniam G. Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. **J Infect Developing Countries**. 2007. 1: 182-188.

31. Blacksell SD, Bell D, Kelley J, Mammen Jr MP, Gibbons RV, Jarman RG, Vaughn DW, Jenjaroen K, Nisalak A, Thongpaseuth S, Vongsouvath M, Davong V, Phouminh P, Phetsouvanh R, Day NP, Newton PN. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. **Clin Vaccine Immunol**. 2007. 14:1458-64.

32. Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, Chakorn T, Yoksan S, Wattanamongkolsil L, Thamlikitkul V. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2008. 60:387-391.

33. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. **Pediatr Infect Dis J**. 2008. 27:43-48.

34. Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hungle Q, Binh TQ, Nam NV, Groen J, de Vries PJ. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2009. 63:372-8.

35. Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2009. 64:91-2.
36. Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, Van Ngoc T, Hien TT, Farrar J, Wills B, Simmons CP. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. **PLoS Negl Trop Dis**. 2009. 3:e360.
37. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Hang VTT, Sekaran SD, Kroeger A, Vazquez S, Ruiz D, Martinez E, Mercado JC, Balmaseda A, Harris E, Dimano E, Simmons CP. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS Negl. Trop. Dis**. 2010. 4:e811.
38. [Koraka P](#), [Burghoorn-Maas CP](#), [Falconar A](#), [Setiati TE](#), [Djamiatun K](#), [Groen J](#), [Osterhaus AD](#). Detection of immune-complex-dissociated non- structural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. **J Clin Microbiol**. 2003. 41:4154 – 4159.
39. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011; 2012.** http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incidencia_de_dengue_brasil_1990_2011_21_06_12.pdf.
40. Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, de Lima CP S, Carvalho VL, da

Silva EV P, Cardoso JF, Sousa EC, Nunes KN. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. **Emerg Infect Dis.** 2012;18:1858–1864.

41. Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, de Lima CP S, Carvalho VL, da Silva EV P, Cardoso JF, Sousa EC, Nunes KN. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. **Emerg Infect Dis.** 2012;18:1858–1864.

3.9 FIGURES AND SUBTITLES

Figure 1: Distribution of the number of cases notified to dengue from 2007 to 2012, according to city of residence of the participants. Aracaju, SE, 2013.

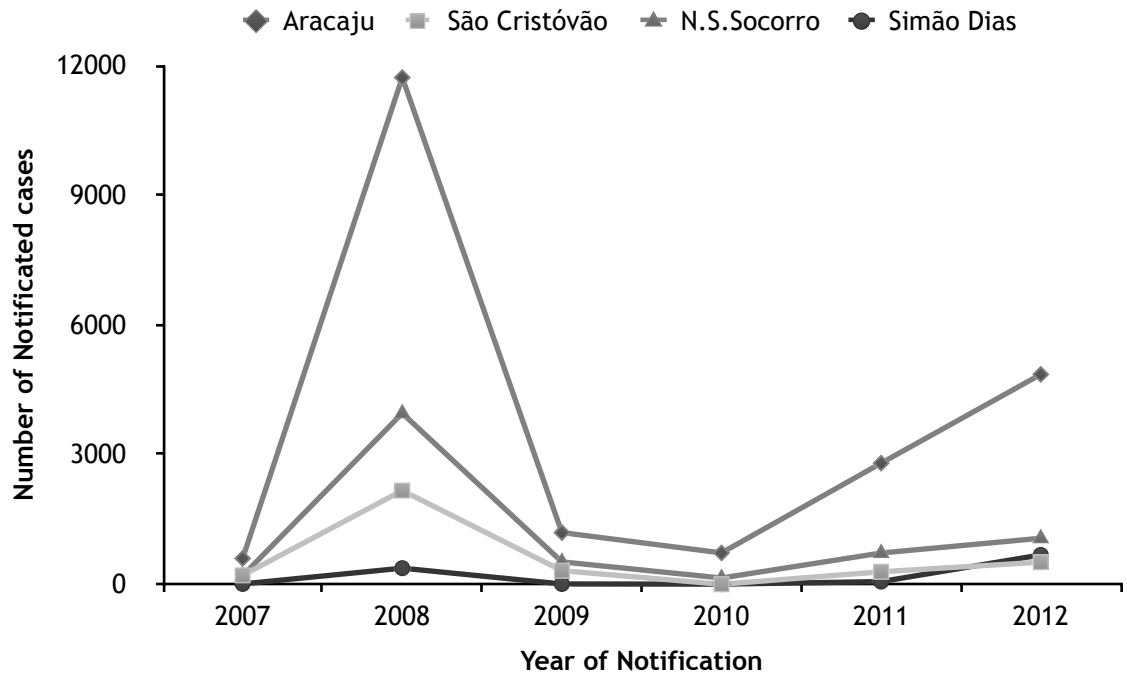


Figure 2. Distribution of the number of notified cases, confirmed and incidence for DENV according to the year of notification from 1999 to 2012. Aracaju, SE, 2013.

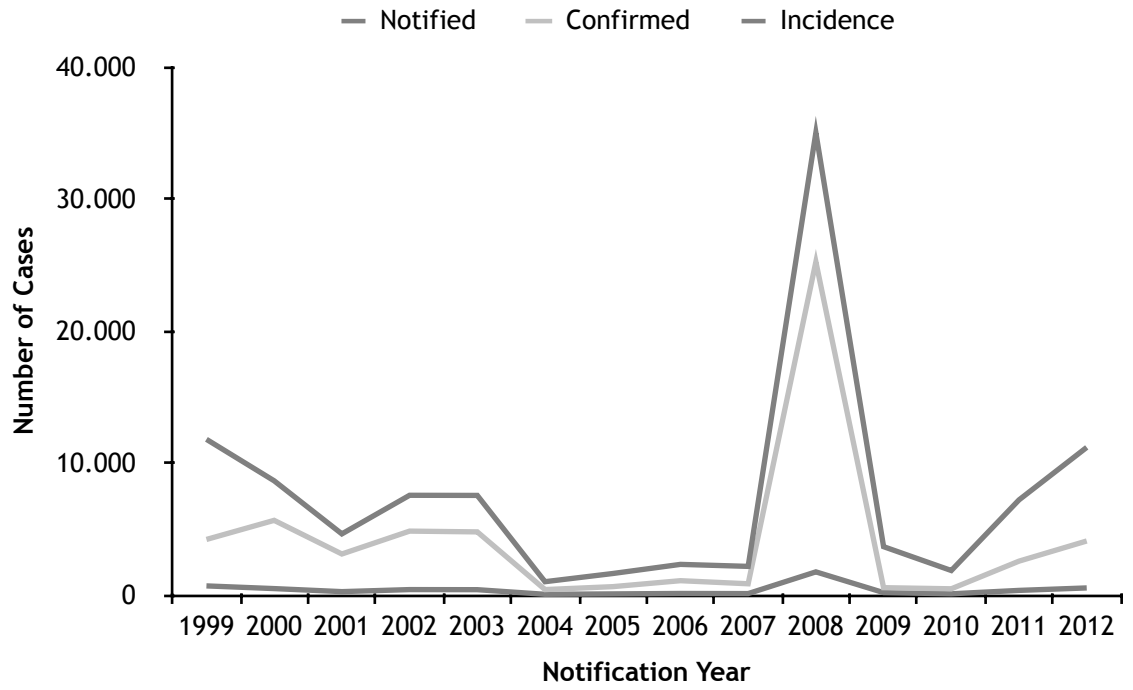


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of amplicons obtained from the semi-nested RT-PCR for detection of dengue in clinical samples of symptomatic patients Sergipe. Lines 1, 2, 3 and 4: clinical samples positive for DENV-4. D1: positive control for DENV-1. D2: positive control for DENV-2. D3: positive control for DENV-3. D4: positive control for DENV-4. CN: negative control. PM: molecular weight marker.

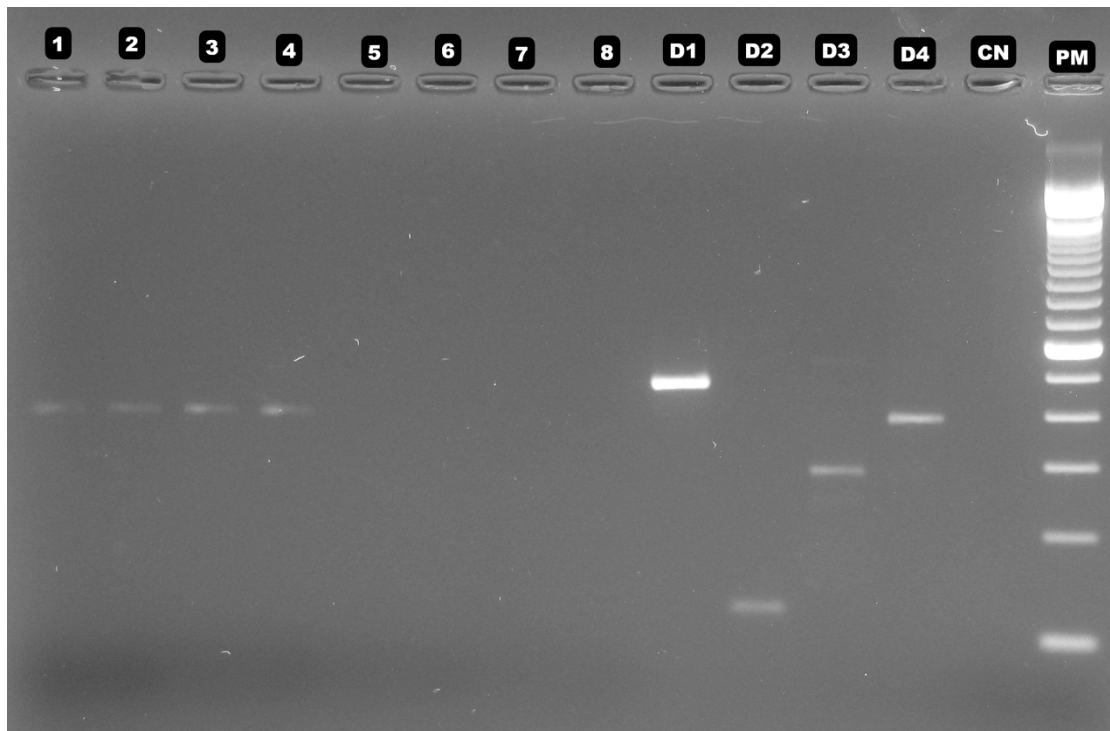


Figure 4. Results of NS1 Ag and RT-PCR tests according to the days of the beginning of symptoms. Aracaju, SE, 2013.

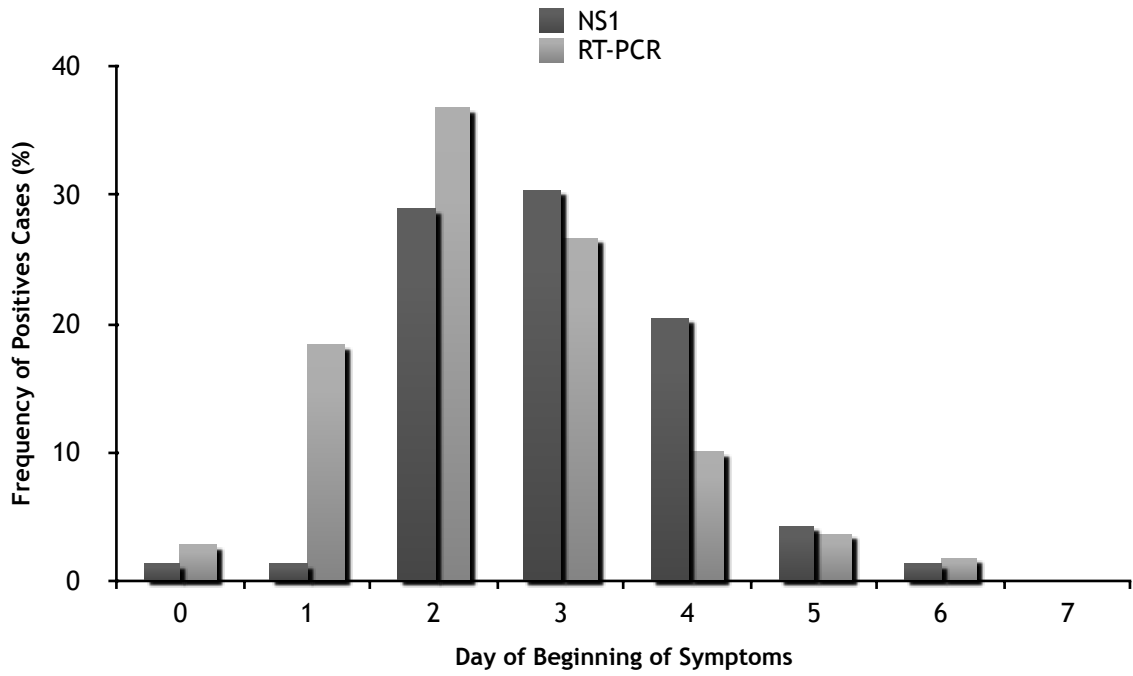
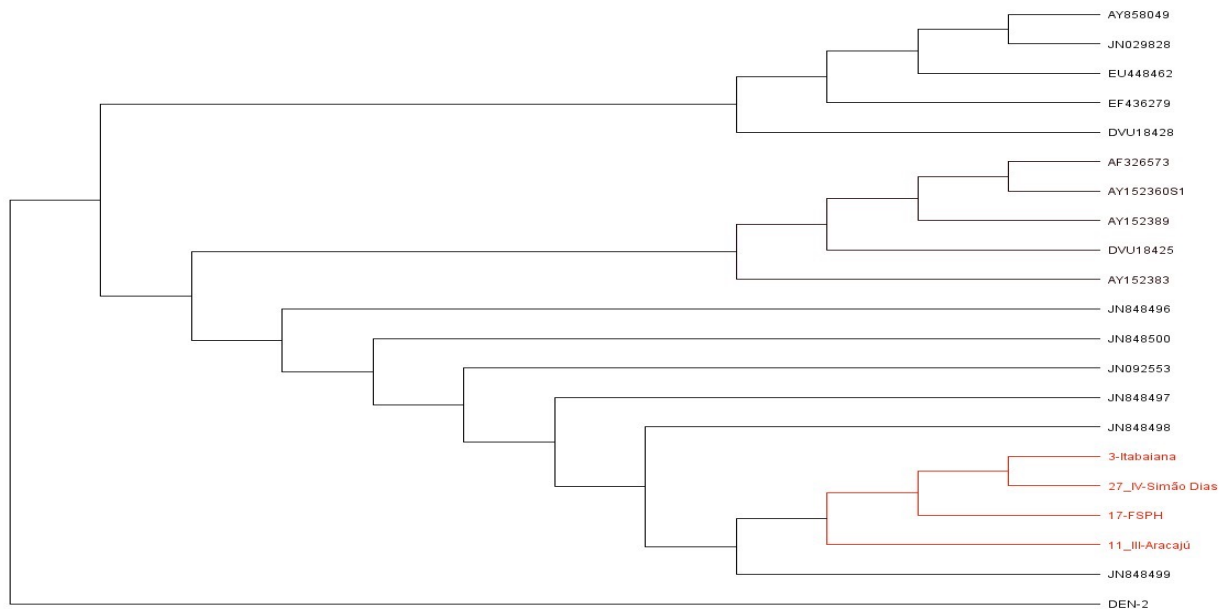


Figure 5: Phylogenetic analysis of the E gene of DENV-4. 16 references sequences of genotypes I, II and III obtained in the GeneBank (accession number Table 1). The analysis was performed using the method neighboring groups and the nucleotide distance calculated by the method of Tamura - Nei 2 parameters. The values of bootstrap were calculated after 1,000 pseudo-replicas and are listed only in the main branches Sequence DENV- 2 NGC FJ390389 was used as out-groups for the analysis. The Brazilian isolates analyzed in this work are marked in red.



APÊNDICE A

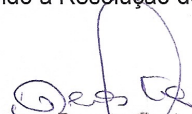
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA: **Investigação de arboviroses emergentes em área endêmica de dengue**

MESTRANDO: Vanessa Ramos de Faria Sea
ORIENTADORA: Dr^a. Roseli La Corte dos Santos

TERMO DE CIENCIA E CONSENTIMENTO


Eu, Daniza Duarte Costa, RG 1390351, diretor do Laboratório Central de Saúde Pública, Parreiras Horta (LACEN/SE), declaro estar ciente que esta pesquisa tem como objetivo principal identificar arboviroses emergentes em amostras de soro ou sangue de pacientes com suspeita clínica de dengue, utilizando métodos de biologia molecular para identificação de *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*, para o qual será necessária a utilização das amostras de sangue coletadas para a pesquisa do antígeno NS1 estocadas em nosso laboratório. Dessa forma, autorizo o uso das amostras de soro e sangue coletadas de pacientes inseridos no programa NS1 do Ministério da Saúde e dos dados coletados nas Fichas de Notificações, para os fins a que se destina esta pesquisa, inclusive para divulgação e publicação dos resultados. O segredo da identidade e da confidencialidade dos sujeitos da pesquisa serão mantidas, respeitando a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 1996/96.


Daniza Duarte Costa
Superintendência
LACEN-FSRH

Aracaju, SE, 20 de novembro de 2012

SINAN		SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO		Nº
República Federativa do Brasil		Ministério da Saúde		
FICHA DE INVESTIGAÇÃO DENGUE				
CASO SUSPEITO: Paciente com febre com duração máxima de 7 dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaléia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, prostração, exantema e com exposição à área com transmissão de dengue ou com presença de <i>Aedes aegypti</i> nos últimos quinze dias.				
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação		2 - Individual	
	2 Agravado/enferma		DENGUE	
	4 UF		5 Município de Notificação	
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		7 Data dos Primeiros Sintomas	
Notificação Individual	8 Nome do Paciente		9 Data de Nascimento	
	10 (ou) idade		11 Sexo M - Masculino F - Feminina 1 - Ignorado	
	12 Gestante		13 Raça/Cor	
	14 Escolaridade		15 Número do Cartão SUS	
Dados de Residência	17 UF		18 Município de Residência	
	20 Bairro		21 Logradouro (rua, avenida,...)	
	22 Número		23 Complemento (apto., casa, ...)	
	25 Geo campo 2		26 Ponto de Referência	
	28 (DDD) Telefone		29 Zona	
	24 Geo campo 1		27 CEP	
	29 Zona		30 País (se residente fora do Brasil)	
Dados laboratoriais e conclusão (dengue clássico)				
Dados laboratoriais	31 Data da Investigação		32 Ocupação	
	33 Data da Coleta		34 Resultado	
	37 Data da Coleta		38 Resultado	
	40 Resultado		41 Resultado	
Conclusão	42 Classificação Final		43 Critério de Confirmação/Descarte	
	44 O caso é autóctone do município de residência?		45 UF	
	47 Município		48 Distrito	
	50 Doença Relacionada ao Trabalho		51 Evolução do Caso	
52 Data do Óbito		53 Data do Encerramento		

ANEXO II

 República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial - GAL Requisição de Exame		
REQUISIÇÃO	1) Nº Requisição:		2) Unidade de Saúde (ou outra fonte):*	
	3) CNES:*			
	4) Município de Atendimento:		5) Código IBGE:*	
	6) UF:			
	7) Nome do Profissional de Saúde:*		8) Registro Conselho/Matrícula:*	
9) Assinatura:				
10) Data de Solicitação:*		11) Data dos Primeiros Sintomas:		
12) Caso:		1 - Suspeito 2 - Comunicante 3 - Acompanhamento 4 - Controle 5 - Óbito 6 - Caso grave 7 - Surto 9 - Ignorado		
13) Tratamento: Quantidade: 1 - Dia 2 - Semana 3 - Mês 4 - Ano 9 - Ignorado		14) Etapa de Tratamento: 1 - Pretratamento 2 - Tratamento 3 - Retratamento 4 - Avaliação de Resistência 9 - Ignorado		
15) Paciente Tomou Vacina? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		16) Data da Última Dose:		
17) Qual Vacina?		18) Finalidade: 1 - Campanha 2 - Inquérito 3 - Investigação 4 - Programa 5 - Protocolo 6 - Projeto 9 - Ignorado		
19) Nome do Paciente:*				
20) Data de Nascimento:*		21) Idade:*		
22) Sexo:*		23) Idade Gestacional:		
24) Nacionalidade:				
25) Raça/Cor: 1 - Branca 2 - Preta 3 - Parda 4 - Amarela 5 - Indígena 99 - Sem Informação		26) Etnia:		
27) Nome da Mãe:				
28) Documento do Paciente 1: 1 - RG 2 - CPF 3 - CNH 4 - CNS Número 5 - CNASC 6 - PRONT 7 - INFCPEN		29) Documento do Paciente 2: 1 - RG 2 - CPF 3 - CNH 4 - CNS Número 5 - CNASC 6 - PRONT 7 - INFCPEN		
30) Logradouro: (Rua, Avenida...)		31) Número:		
32) Complemento do Logradouro:		33) Ponto de Referência:		
34) Bairro:				
35) Município de Residência:*		36) Código IBGE:*		
37) UF:				
38) CEP:		39) DDD / Telefone:		
40) Zona: 1 - Urbana 2 - Periurbana 3 - Rural 9 - Ignorado		41) País (Se reside fora do Brasil):*		
AMOSTRA / EXAME	42) Exame Solicitado:*	43) Material Enviado:*	44) Amostra:*(1ª, 2ª, 3ª, Única)	
	45) Tipo de Amostra: 1 - IN 2 - IS 3 - LM 4 - MTB 5 - MTV	46) Data da coleta:*	47) Usou medicamento antes da data da coleta? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado Especifique:	
SINAN	48) Agravo/Doença:		49) CID 10:*	
	50) Nº Notificação do SINAN:*		51) Data de Notificação:*	
	52) Unidade de Saúde Notificante:		53) CNES:*	
	54) Município de Notificação:		55) Código IBGE*	
56) UF:				
DADOS CLÍNICOS/LABORATORIAIS	57) Dados Clínicos/Laboratoriais:			

*Campo de preenchimento obrigatório