



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

FERNANDA MONTENEGRO DE CARVALHO ARAÚJO

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA O VÍRUS
DENGUE EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO: A
DETECÇÃO DO ANTÍGENO NS1 COMO UMA NOVA
ABORDAGEM**

FORTALEZA/CE

2011

FERNANDA MONTENEGRO DE CARVALHO ARAÚJO

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA O VÍRUS
DENGUE EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO: A
DETECÇÃO DO ANTÍGENO NS1 COMO UMA NOVA
ABORDAGEM**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Júlio da Costa Sidrim

FORTALEZA/CE

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A689d Araújo, Fernanda Montenegro de Carvalho.
Diagnóstico laboratorial para o vírus dengue em líquido cefalorraquidiano: a detecção do antígeno NS1 como uma nova abordagem. / Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo. – 2011.
151 f.: il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Clínica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, 2011.
Área de Concentração: Virologia.
Orientação: Prof. Dr. José Júlio da Costa Sidrim.
1. Dengue. 2. Diagnóstico. 3. Antígenos. 4. Líquido Cefalorraquidiano. I. Título.

CDD 616.921

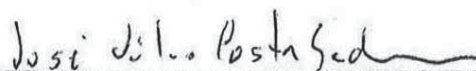
FERNANDA MONTENEGRO DE CARVALHO ARAÚJO

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA O VÍRUS
DENGUE EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO: A
DETECÇÃO DO ANTÍGENO NS1 COMO UMA NOVA
ABORDAGEM**

Defesa em: 13/10/2011

Conceito: Aprovada

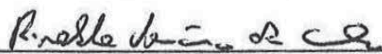
Banca Examinadora



Prof. Dr. José Julio Costa Sidrim
(Orientador UFC)



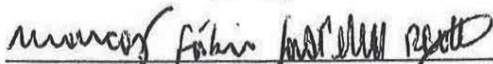
Profa. Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira
(FIOCRUZ)



Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha
(UFMS)



Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho
(UFC)



Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
(UECE)

A Deus pelo dom da vida!

*Aos meus pais, Antônio Carvalho
e Maria Luiza Montenegro
Carvalho, pelo exemplo de vida!*

*A meu marido, Maurício Araújo,
e aos meus filhos Rafael, Lia
e Paula pela compreensão e
carinho nos momentos difíceis.*

AGRADECIMENTOS

De modo especial ao Prof. Dr. José Júlio da Costa Sidrim pela orientação e pela confiança em mim depositada. Agradeço ao seu profissionalismo e às suas críticas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, na pessoa de sua coordenadora Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade pela sua dedicação para a manutenção do Programa.

À Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira pela amizade, disponibilidade e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

Aos membros da banca da qualificação: Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto e Prof. Dr. Keny Jeová Bayma Colares, que muito contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Aos membros da banca da defesa: Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira, Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, por gentilmente terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Ao Dr. Maurício de Sousa Araújo, neurologista, pela prestimosa ajuda na revisão dos casos e classificação dos diagnósticos neurológicos.

Ao colega de curso e amigo Luciano Pamplona pela elaboração e análise do banco de dados e por estar sempre disponível para esclarecer as dúvidas da análise estatística.

À Iracema Miralles pela realização das extrações do ácido nucléico viral utilizado neste estudo, tarefa realizada com muito esmero.

Aos professores Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante e Marcos Fábio Gadelha Rocha por sua prestimosa ajuda.

Aos profissionais do Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado e do Hospital São José de Doenças Infecciosas por fornecerem o material biológico utilizado na pesquisa e pela ajuda na coleta de dados dos pacientes.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública, na pessoa do Dr. Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá pelo incentivo e apoio logístico.

Aos colegas que fazem parte do setor de Doenças Exantemáticas do LACEN-CE pela amizade, incentivo e prestimosa ajuda para a realização deste trabalho.

Aos colegas que fazem parte do Núcleo de Vigilância Epidemiológica da SESA pela ajuda na coleta de dados e incentivo para a realização deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Ivone Sousa e Rita de Cássia por sua atenção e gentileza.

Aos amigos do LACEN-CE que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho com sua torcida e apoio.

*“A imaginação é mais importante que a ciência,
porque a ciência é limitada
e a imaginação abrange o mundo inteiro”.*
Albert Einstein

RESUMO

Os primeiros casos de dengue no Estado do Ceará ocorreram em agosto de 1986. A doença tornou-se endêmica, com aumento gradativo de casos graves, alguns apresentando manifestações não usuais, como o envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Com o objetivo de estudar o diagnóstico laboratorial específico de dengue em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), visando à correlação entre a dengue e o envolvimento do SNC em casos ocorridos nos anos de 2005 a 2008, foram analisadas 346 amostras de LCR coletadas de 346 pacientes: 163 provenientes de pacientes com evolução fatal que foram necropsiados no Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado (SVO); e, 183 amostras de pacientes que foram atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) com suspeita de meningite. Os métodos diagnósticos utilizados para a análise desses materiais foram: o isolamento viral, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), a pesquisa de anticorpo (Ac) IgG, Ac IgM e pesquisa de antígeno não estrutural 1 (Ag NS1). Um ensaio imunoenzimático (ELISA) comercial para detecção de Ag NS1 em soro foi avaliado para uso, pela primeira vez, em LCR apresentando uma sensibilidade de 50% (IC-29.9-70.1) e especificidade de 100% (IC-94-100). No grupo dos pacientes que evoluíram para óbito, 90 pacientes apresentaram infecção pelo vírus dengue (DENV), e destes 46 (51,1%) com positividade para dengue no LCR: um isolamento de DENV-3; sete detecções de vírus por RT-PCR (4 DENV-3; 3 DENV-2); 26 Ag NS1 e 27 Ac IgM por ELISA; 38 IgG foram positivos por imunocromatografia. O LCR acrescentou 27,8% (25/90) ao diagnóstico de dengue em pacientes negativos em outras amostras biológicas. As manifestações clínicas mais observadas nos 46 casos de óbitos em que o LCR foi positivo para DENV foram: febre, 65%; cefaléia 50%; vômito 30,4%; desorientação, 30,4%; dispnéia, 28%; polimialgia, 28%; adinamia, 28%; agitação, 26%; dor abdominal, 17%; diarreia, 16%; queda de sensório, 10,8%; tosse, 10,8%. Considerando os dados clínicos e laboratoriais que caracterizam um envolvimento do SNC nos pacientes com amostras de LCR positivas para DENV foram encontradas as seguintes patologias neurológicas: 19 (41,3%) encefalites, 14 (30,4%) meningoencefalites e 13 (28,3%) meningites. No grupo encaminhado do HSJ, as 183 amostras de LCR foram negativas para pesquisa de bactérias e fungos. Cinco casos foram positivos para DENV (2,7%): dois para Ag NS1 e três para Ac IgM. Dos positivos, quatro foram de pacientes internados e um de paciente atendido no ambulatório. Quatro pacientes evoluíram para cura e um foi a óbito. O quadro clínico associado aos casos suspeitos de meningite foi de febre, cefaléia, vômito e rigidez de nuca. A positividade para o DENV no LCR foi maior nos casos provenientes do SVO (28,2%) quando comparado com os casos encaminhados do HSJ (2,7%), com $p < 0,000$ (IC- 4,21-25,37) e Risco Relativo de 10,33 vezes. Os resultados deste estudo mostraram que houve envolvimento do SNC em casos de dengue nas duas populações trabalhadas, com um maior envolvimento nos casos encaminhados do SVO. Os resultados deste estudo sugerem que em área endêmica de dengue, pacientes com sintomatologia neurológica compatível com encefalite e meningite, apresentando ou não sinais clássicos de dengue, devem ser investigados para essa virose. Entretanto, estudos prospectivos de casos de dengue com manifestações neurológicas são necessários para conhecer e compreender melhor o envolvimento do SNC nas infecções pelos DENV.

Palavras-Chave: Dengue, diagnóstico, antígeno NS1, líquido cefalorraquidiano, sistema nervoso central.

ABSTRACT

The first cases of dengue fever in Ceará State occurred in August 1986. The disease has become endemic with a gradual increase in severe cases, some showing atypical manifestations, with involvement of the central nervous system (CNS). In order to study specific laboratory diagnosis of dengue in cerebral spinal fluid (CSF) samples aiming to implement the findings related to cases of neurological manifestations in the years of 2005, 2006, 2007 and 2008, 346 CSF samples collected from 346 patients were studied: the first group comprised 163 patients with fatal outcomes who were autopsied in Death Verification Service (DVS); the second group comprised 183 patients who attended at São José Hospital (SJH). Diagnostic methods used for CSF analysis were virus isolation in cell culture, RT-PCR, ELISA for IgM Ab and NS1 Ag detection and immunochromatography for IgG detection. A commercial kit for detection of NS1 Ag in serum was evaluated for use in CSF for the first time, and presented a sensitivity of 50% (CI 9.29-70.1) and a specificity of 100% (CI 94-100). In the first group with 163 individuals, 90 patients had infection with DENV, and from these, 46 (51.1%) were positive for dengue in CSF: one isolation of DENV-3, seven detections by RT-PCR (four of DENV-3 and three of DENV-2), 26 NS1 Ag and 27 IgM Ab by ELISA; 38 were positive for IgG by immunochromatography. CSF added 27.8% (25/90) positive cases in the diagnosis of dengue negative in other biological samples. The clinical manifestations observed in 46 cases of deaths positive for DENV in CSF were: hyperthermia 65%, headache 50%, vomiting 30.4%, disorientation 30.4%, dyspnea 28%, polymialgia 28%, asthenia 28%, agitation 26%, abdominal pain 17%, diarrhea 16%, fall sensory 10.8% and cough 10.8%. Considering the clinical and laboratory data characterizing a CNS involvement in patients with positive CSF samples for DENV were found the following neurological disorders: 19 (41.3%) encephalitis, 14 (30.4%) meningoencephalitis and 13 (28.3%) meningitis. In the second group, all 183 CSF samples were negative for bacteria and fungi. Five cases were positive (2.7%), two for NS1 Ag and three for IgM Ab. Of the positives, four patients were hospitalized and one patient was treated at the clinic. Four patients were healed and one died. The clinical associated with suspected cases of meningitis was fever, headache, vomiting and neck stiffness. The positivity for DENV in CSF was higher in cases coming from the DVS (28.2), than the cases from SJH (2.7%), $p < 0.000$ (CI 4. 21-25.37) and Relative Risk of 10.33 times. The results from the study showed that there was CNS involvement in dengue cases in both groups, with a greater involvement in the cases referred from DVS. Given what has been found, it would be convenient to suggest that, in an endemic area of dengue, patients with neurological symptoms consistent with encephalitis and meningitis, showing or not classic signs of dengue fever, should be investigated for these viruses. However, prospective studies of cases with neurological manifestations of dengue are still needed to know and better understand the involvement of the CNS infection by DENV.

Keywords: Dengue fever, diagnosis, NS1 antigen, cerebrospinal fluid, central nervous system.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	19
1.1 Histórico	19
1.2 Agente Etiológico.....	20
1.2.1 Classificação	20
1.2.2 Morfologia	21
1.2.3 Genoma Viral	21
1.2.3.1 Proteínas Estruturais	23
1.2.3.2 Proteínas Não-Estruturais	23
1.3 Replicação Viral	24
1.4 Diversidade Genética dos DENV	25
1.5 Vetores	26
1.6 Patogenia dos Vírus Dengue	27
1.7 Epidemiologia	28
1.7.1 Distribuição geográfica	29
1.7.2 Dengue nas Américas	30
1.7.3 Dengue no Brasil	32
1.7.4 Dengue no Ceará	35
1.8 A Doença	39
1.8.1 Dengue Clássica	40
1.8.2 Febre hemorrágica da dengue	40
1.8.3 Complicações da dengue	40
1.9 Diagnóstico Laboratorial	44
1.9.1 Isolamento viral	44
1.9.2 Detecção de ácido nucléico viral	45
1.9.3 Detecção de antígeno viral	45
1.9.3.1 Detecção de antígeno NS1.....	45
1.9.3.2 Imunohistoquímica	46
1.9.4 Detecção de anticorpo da classe IgM	46
1.9.5 Detecção de anticorpo da classe IgG.....	47
1.10 Prevenção e Controle	47
1.11 Perguntas de Partida	49
1.12 Hipóteses	49
2. OBJETIVOS	50

2.1 Objetivo geral	50
2.2 Objetivos específicos	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Características Gerais do Estudo	51
3.1.1 Análise estatística	51
3.1.2 Aspectos éticos	51
3.2 Etapas da Pesquisa	52
3.2.1 Etapa I - Avaliação do <i>kit</i> para detecção do Ag NS1 de DENV no LCR	52
3.2.2 Etapa II - Diagnóstico laboratorial da dengue e determinação do envolvimento do SNC nos casos positivos dos pacientes com evolução fatal encaminhados do SVO	52
3.2.3 Etapa III - Diagnóstico diferencial para dengue nos pacientes com suspeita clínica de meningite que foram atendidos no HSJ	54
3.3 Técnicas Utilizadas	55
3.3.1 Pesquisa do vírus	55
3.3.1.1 Detecção e identificação viral	55
3.3.2. Detecção do genoma viral	56
3.3.2.1 Extração do RNA viral	57
3.3.2.2 RT-PCR	57
3.3.2.3 Segunda etapa de amplificação: <i>Semi-nested</i> PCR para tipagem dos vírus dengue	58
3.3.3 Detecção do antígeno viral	58
3.3.4 Pesquisa de anticorpos	59
3.3.4.1 Detecção de anticorpos da classe IgM	59
3.3.4.2 Detecção de anticorpos da classe IgG	59
4. RESULTADOS	61
4.1. Etapa I - Avaliação do <i>kit</i> para detecção do Ag NS1 de DENV no LCR	61
4.2 Etapa II - Diagnóstico laboratorial da dengue e determinação do envolvimento do SNC nos casos positivos dos pacientes com evolução fatal encaminhados do SVO.....	64
4.2.1 Epidemiologia.....	65
4.2.2 Achados Laboratoriais	68
4.2.3 Achados Clínicos	74
4.3 Etapa III - Diagnóstico diferencial para dengue nos pacientes com	76

suspeita clínica de meningite que foram atendidos no HSJ	
4.3.1 Epidemiologia.....	76
4.3.2 Achados Laboratoriais	78
4.3.3 Achados Clínicos	79
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	
ANEXO I – Análise de Registros de Prontuários de Dengue de Pacientes que Evoluíram para Óbito	119
ANEXO II – Análise de Registro de Prontuários de Pacientes com Suspeita de Meningites Virais.....	122
ANEXO III - Parecer do comitê de ética e pesquisa do Hospital São José de doenças infecciosas.....	125
ANEXO IV - Investigação clínica, laboratorial, achados de necrópsia e histopatológico dos casos de óbitos com dengue classificados como encefalites no Ceará de 2005 a 2008	126
ANEXO V - Investigação clínica, laboratorial, achados de necrópsia e histopatológico dos casos de óbitos com dengue classificados como meningoencefalites no Ceará de 2005 a 2008	130
ANEXO VI - Investigação clínica, laboratorial, achados de necrópsia e histopatológico dos casos de óbitos com dengue classificados como meningites no Ceará de 2005 a 2008	134
ANEXO VII - Características clínicas, resultados laboratoriais e evolução dos pacientes atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas que foram positivos para DENV no LCR durante o ano de 2008	137
PUBLICAÇÕES	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – Composição esquemática de um vírus dengue	21
FIGURA 02 – Organização do genoma dos <i>Flavivirus</i>	22
FIGURA 03 – Representação esquemática do ciclo replicativo dos <i>Flavivirus</i>	24
FIGURA 04 – Transmissão do vírus dengue pelo <i>Aedes aegypti</i>	27
FIGURA 05 – Distribuição geográfica das áreas infestadas com <i>Aedes aegypti</i> e epidemias de dengue, atualizado em 2009	30
FIGURA 06 – Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> nas Américas em 1970, no final do programa de erradicação do mosquito, e em 2002	31
FIGURA 07 – Presença de Dengue 3 nas Américas 1994 - 2003.....	32
FIGURA 08 – Mapa do Risco Dengue no Brasil.....	34
FIGURA 09 – Casos notificados de dengue por semana epidemiológica segundo região, Brasil, 2010/2011*.....	35
FIGURA 10 – Número de casos notificados e incidência de dengue, no Ceará, de 1986 a 2011*.....	37
FIGURA 11 – Casos confirmados de dengue hemorrágico por mês no Ceará de 2008 a 2010*.....	37
FIGURA 12 – Análise filogenética de cepas de DENV-2 baseada na seqüência da junção dos genes E/NS1 de três cepas provenientes do Estado do Ceará (2007), através do método de Neighbor-Joining, modelo Tamura Nei e <i>bootstrap</i> de 1000 pseudoréplicas. Representantes de DENV-1, DENV-3 e DENV-4 foram utilizadas como grupos externos.....	38
FIGURA 13 – Análise filogenética de cepa de DENV-3 baseada na seqüência do gene E de proveniente do estado do Ceará (2005), através do método de Neighbor-Joining, modelo Tamura Nei e <i>bootstrap</i> de 1000 pseudoréplicas. Representantes de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 foram utilizadas como grupos externos	39
FIGURA 14 – Fluxograma da avaliação do <i>kit</i> para detecção do Ag NS1 de DENV no LCR	61
FIGURA 15 - Teste de ELISA Pan E Dengue Early realizado em 86 amostras de LCR, 26 amostras positivas e 60 negativas para DENV	63
FIGURA 16 - Fluxograma dos 163 óbitos analisados com suspeita de doença infecciosa ...	64
FIGURA 17 - Distribuição dos óbitos com dengue em relação ao total de óbitos com suspeita de doenças infecciosas do Serviço de Verificação de Óbitos do Ceará, de 2005 a 2008.....	67

FIGURA 18 - Fluxogramas dos resultados laboratoriais dos 90 óbitos com dengue	68
FIGURA 19 - Eletroforese em gel de agarose dos resultados obtidos de RT-PCR em LCR.....	69
FIGURA 20 - Placa de ELISA representando os resultados de detecção de Ag NS1 no LCR	70
FIGURA 21 - Teste de imunocromatografia para detecção de anticorpos IgM e IgG para dengue em amostras de LCR	71
FIGURA 22 - Placa de ELISA para captura de Ac IgM para dengue	71
FIGURA 23 - Positividade dos 46 LCR analisados segundo a metodologia utilizada	74
FIGURA 24 - Manifestações clínicas mais freqüentes nos casos de óbito com LCR positivo para DENV	75
FIGURA 25 - Fluxograma do diagnóstico diferencial para dengue nos pacientes com suspeita clínica de meningite que foram atendidos no Hospital São José	76
FIGURA 26 - Manifestações clínicas de 73 pacientes hospitalizados com suspeita de meningite no Hospital São José em 2008	79
FIGURA 27 - Contagem de células, dosagem de proteínas e de glicose no LCR de 73 pacientes hospitalizados com suspeita de meningite no HSJ, em 2008	80

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01- Variantes genóticas dos vírus dengue determinadas pelo seqüenciamento de 240 nucleotídeos da junção E/NS1.....	25
QUADRO 02- Distribuição dos diagnósticos de manifestações neurológicas de dengue no Brasil (1997-2010)	43
QUADRO 03 - Relação dos <i>primers</i> utilizados para reação de RT – PCR e <i>semi-nested</i> – PCR.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Acurácia diagnóstica para o <i>kit</i> de detecção de Ag NS1 por ELISA em amostras de LCR	62
TABELA 02 – Percentual de detecção de Ag NS1 de acordo com a presença de Ac IgM em 26 amostras de LCR	62
TABELA 03 – Detecção de IgM e Ag NS1 em amostras de LCR	62
TABELA 04 – Positividade para dengue nos óbitos segundo a hipótese da necropsia, no Ceará de 2005 a 2008	65
TABELA 05 – Positividade segundo a hipótese diagnóstica de dengue no momento da realização da necropsia no Serviço de Verificação de Óbitos do Ceará (2005 a 2008)	66
TABELA 06 - Positividade para dengue nos casos com outras hipóteses diagnósticas no Serviço de Verificação de Óbitos do Ceará de 2005 a 2008	67
TABELA 07 - Diagnóstico laboratorial de dengue em óbitos segundo as amostras clínicas disponíveis, Ceará de 2005 a 2008	69
TABELA 08 - Investigação da resposta imune em soro de 30 casos de óbitos com dengue dos anos de 2005 a 2008 no Ceará	70
TABELA 09 - Achados de necropsia e histopatológicos dos casos de dengue que evoluíram para óbito, por órgão acometido, Ceará de 2005 a 2008	72
TABELA 10 - Positividade dos 46 LCR analisados em relação aos materiais biológicos e métodos utilizados para o diagnóstico de dengue em amostras de óbitos do período de 2005 a 2008 no Ceará	73
TABELA 11 - Distribuição mensal de pacientes com suspeita de meningite atendidos no Hospital São José submetidos ao diagnóstico diferencial para dengue no ano de 2008	77
TABELA 12 - Pacientes com suspeita de meningite, atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas submetidos ao diagnóstico diferencial para dengue, segundo sexo	77
TABELA 13 - Pacientes hospitalizados, no Hospital São José de Doenças Infecciosas, com suspeita de meningite e $< 500 \text{ cé}/\text{mm}^3$ no LCR, segundo morbidade associada, em 2008	78
TABELA 14 - Positividade para dengue das amostras de LCR dos pacientes suspeitos de	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac – Anticorpo

Ag NS1 – Antígeno NS1

DC – Dengue clássico

DENV – Dengue vírus

dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfato

DO – Densidade óptica

ECP – Efeito citopático

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FHD – Febre hemorrágica do dengue

HSJ – Hospital São José de Doenças Infecciosas

IC – Intervalo de Confiança

IEC – Instituto Evandro Chagas

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina da classe G

IgM – Imunoglobulina da classe M

IH – Inibição da hemaglutinação

IHQ – Imunohistoquímica

LACEN-CE – Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MAC-ELISA – Ensaio imunoenzimático de captura de IgM

MS – Ministério da Saúde

NS1 – Proteína não estrutural 1

NT – Nucleotídeos

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Pares de bases

PBS- Tampão salina fosfato

RNA – Ácido ribonucléico

RPM - Rotações por minuto

RR – Risco relativo

RT – PCR – Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase

SCD – Síndrome do choque do dengue

SESA – CE – Secretaria de Saúde do Ceará

SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação

SNC – Sistema nervoso central

ssRNA – Ácido ribonucléico fita simples

SVO – Serviço de verificação de óbitos Dr. Rocha Furtado

UPb – Unidade Panbio

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

As primeiras referências de uma enfermidade clinicamente compatível com dengue se encontram em uma enciclopédia chinesa, publicada na Dinastia Chin (265 a 420 d.C.). A data exata em que a dengue foi reconhecida como doença continua obscura. Os primeiros relatos de grandes epidemias de dengue ocorreram em Java, Indonésia (Ásia), no Cairo, Egito (África), ambas em 1779 e na Filadélfia, nos Estados Unidos (América do Norte) em 1780 (SILER *et al.*, 1926). Dengue ou uma doença muito similar teve uma extensa distribuição geográfica antes do final do século XVIII, quando sua primeira pandemia conhecida começou (GUBLER, 1997).

A origem do nome dengue não está muito bem esclarecida. A doença foi chamada por diferentes nomes durante anos, até o termo dengue se sobrepôr aos demais. Em 1801, a rainha da Espanha, Maria Luísa, se referia a uma doença, a qual foi acometida, como dengue. Nas epidemias de 1823 e 1870 em Zanzibar, na África, a enfermidade foi chamada de “Ki-Dinga pepo”, que significa “câimbra súbita causada por um espírito mau”. Desse nome Swahili veio “dinga” ou “denga”, que foi levado ao Novo Mundo pelo tráfico de escravos e deu nome à epidemia de St. Thomas em 1827. A doença foi chamada de “dunga” em Cuba, durante a epidemia de 1828, mas depois mudou para “dengue”, nome pelo qual é conhecida até hoje (GUBLER, 1997). Sua introdução na literatura médica inglesa se deu entre 1827 e 1828 e, somente em 1869, o termo foi estabelecido pelo *London Royal College of Physicians* (HALSTEAD, 1980).

O envolvimento de mosquitos na transmissão da dengue foi primeiro documentado por Graham (1903). Este trabalho foi seguido por Bancroft (1906), que identificou o mosquito *Aedes aegypti* como transmissor da doença. Estudos subsequentes mostraram que o *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e o *Aedes scutellaris* também eram vetores eficientes para os vírus da dengue (SILER *et al.*, 1926; ROSEN *et al.*, 1954).

A etiologia da dengue foi determinada por Ashburn e Craig (1907), que demonstraram ser a doença causada por um organismo de tamanho ultramicroscópico e filtrável (SILER *et al.*, 1926).

Durante a Segunda Guerra Mundial, a dengue foi a maior causa de morbidade entre os soldados aliados e os japoneses, assim os militares, japoneses e americanos, formaram comissões para estudar a febre da dengue, e ambos os grupos obtiveram sucesso no isolamento do vírus. Hotta e Kimura foram os primeiros a isolar o vírus, em 1943. As importantes investigações realizadas por Sabin resultaram na identificação de dois diferentes sorotipos dos vírus dengue (DENV). As primeiras amostras foram isoladas por ele em março de 1944 a partir de soros de soldados que contraíram a infecção em Calcutá, Nova Guiné e Havaí. Os vírus provenientes de Calcutá, do Havaí e de uma das cepas de Nova Guiné, por se mostrarem antigenicamente semelhantes, foram denominados de DENV-1, e a cepa Havaí, considerada protótipo. Outras cepas de Nova Guiné apresentaram características antigênicas distintas daquelas de DENV-1 e foram classificadas como DENV-2, tendo a cepa Nova Guiné C como protótipo deste tipo sorológico. O vírus isolado pelos japoneses foi posteriormente demonstrado ser DENV-1 (GLUBER, 1997).

Em Manila, nas Filipinas, em 1956, aconteceu a primeira epidemia conhecida de dengue hemorrágico, em que foram isolados dois novos vírus, sorologicamente relacionados, que foram classificados como DENV-3 e DENV-4, e as cepas H87 (DENV-3) e H241 (DENV-4), consideradas protótipos (HAMMON *et al.*, 1960).

Nas últimas décadas, a incidência de casos de dengue vem aumentando consideravelmente, bem como a emergência de suas formas mais graves, que se intensificaram, constituindo um dos maiores problemas de saúde pública, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo o Brasil (YOUNG *et al.*, 2000). Alguns fatores têm sido apontados como a causa deste aumento de casos, como o crescimento da população, a expansão geográfica do seu principal vetor, o *Aedes aegypti* e dos vírus causadores de dengue, e a dificuldade de se implantar uma política eficaz de combate ao mosquito transmissor, resultando na co-circulação de múltiplos sorotipos dos vírus dengue (GUBLER, 1998; 2002; GIBBONS; VAUGHN, 2002).

1.2. Agente Etiológico

1.2.1 Classificação

Há quatro sorotipos conhecidos de vírus dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Eles pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, formado aproximadamente por oitenta espécies divididas em oito grupos sorologicamente relacionados. Destes, quatro grupos são

transmitidos por mosquitos, dois por carrapatos e dois não têm vetores conhecidos (WESTAWAY *et al.*, 1985; GUBLER, 1998; LINDENBACH; RICE, 2001).

1.2.2 Morfologia

Os DENV são esféricos e envelopados, com diâmetro de aproximadamente 40-60 nanômetros e genoma constituído por uma molécula de RNA de fita simples (ssRNA) de polaridade positiva (CHAMBERS *et al.*, 1990). O RNA viral é envolto por um nucleocapsídeo eletrodenso de simetria icosaédrica, com 30 nm de diâmetro, composto por uma única proteína estrutural denominada proteína de capsídeo (C). O nucleocapsídeo é englobado por um envelope, constituído por uma bicamada lipídica (que representa aproximadamente 17% do peso seco do vírus) apresenta pequenas projeções na superfície, representadas pelas proteínas estruturais de membrana (M) e envelope (E), que formam estruturas ancoradas na membrana viral (MONATH; HEINZ, 1995; CHANG, 1997; GUBLER, 1998). A figura 1 apresenta uma composição esquemática do vírus.

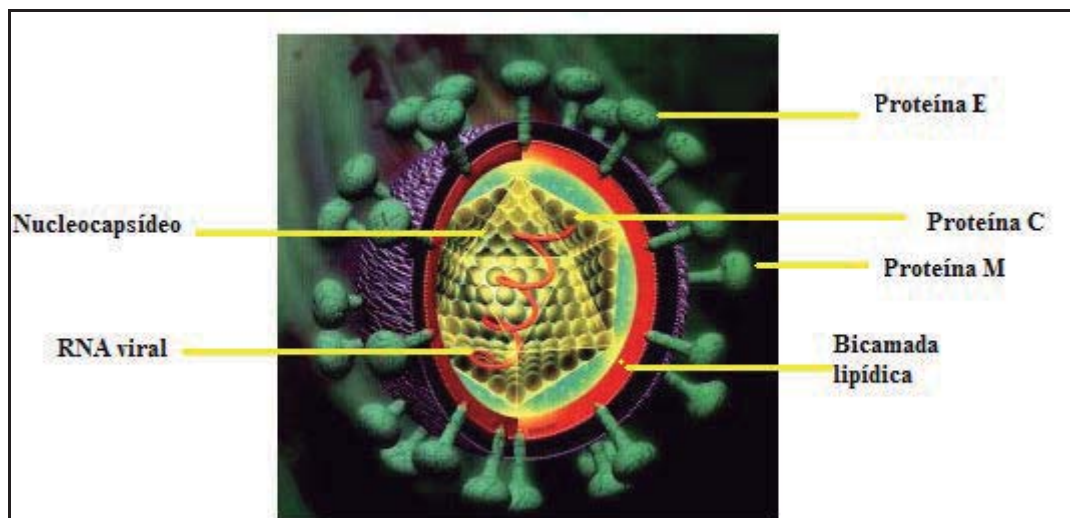


FIGURA 1: Composição esquemática de *Flavivirus*.

Fonte: Extraído e adaptado de <<http://www.iesalbayzin.org/descargas/AnimacionesBio-Geo/Animaciones08-09.htm>>. Acesso em 20/09/2011.

1.2.3 Genoma Viral

O genoma viral possui cerca de 10 Kb e peso molecular de aproximadamente 4×10^6 Da. A extremidade 5' apresenta um *cap* do tipo I, enquanto que a extremidade 3' não apresenta cauda poli-A (RICE *et al.*, 1986).

Duas regiões não-codificantes (NC), com 96 e 454 nucleotídeos, são encontradas nas extremidades 5' e 3', respectivamente, e, entre essas regiões, observa-se apenas uma única fase aberta de leitura, do inglês *Open Reading Frame* (ORF). A ORF possui 10.188, 10.173, 10.170 e 10.158 nucleotídeos no DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 e o RNA genômico codifica uma poliproteína precursora de 3.396, 3.391, 3.390 e 3.386 aminoácidos no DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente. Essa poliproteína é posteriormente clivada em proteínas estruturais - C, prM/M e E - e não estruturais - NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, como representado na figura 2. As proteínas estruturais representam um terço do genoma viral. As regiões 5' e 3', não codificantes, são importantes para a regulação da replicação viral (CHANG, 1997).

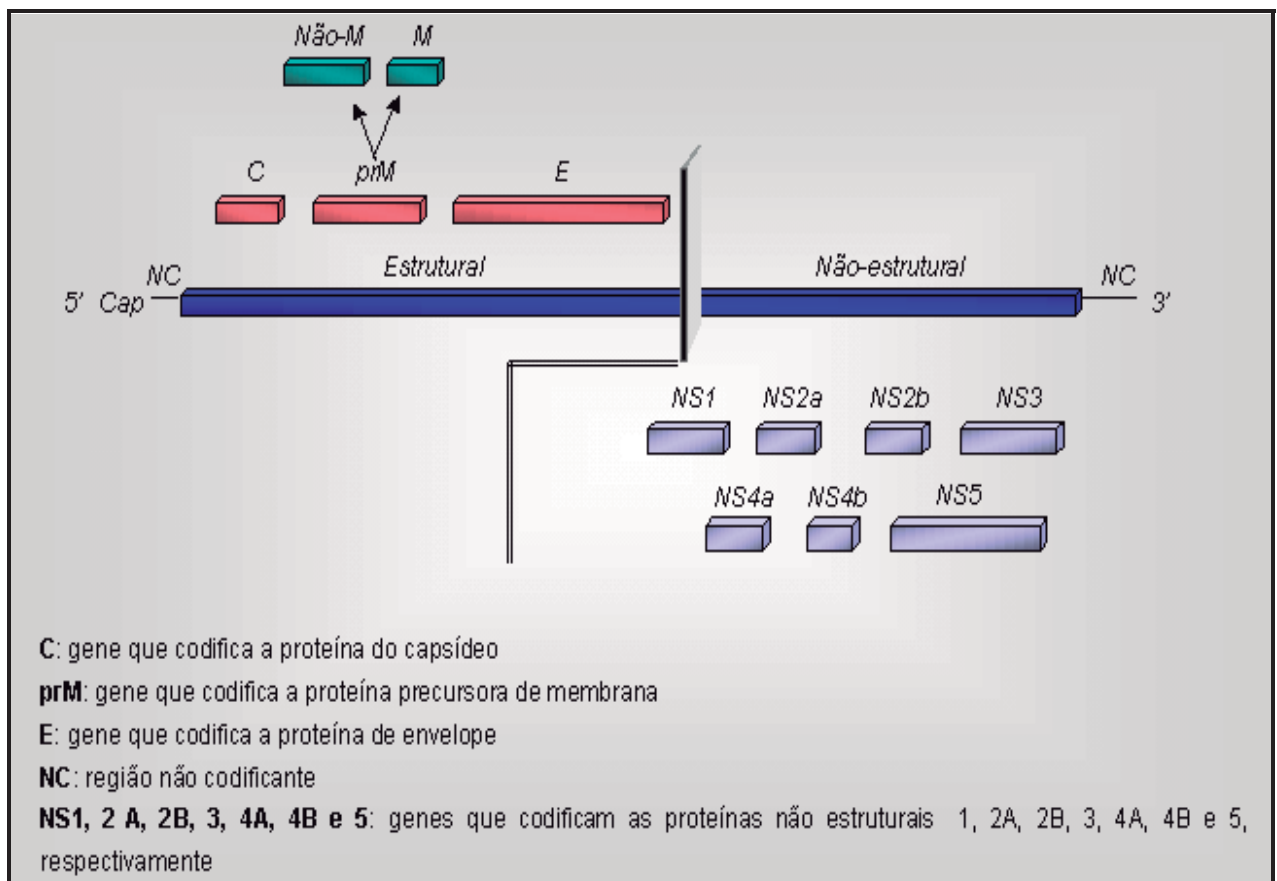


FIGURA 2: Organização do genoma dos *Flavivirus*.
 Fonte: Extraído e adaptado de CHAMBERS *et al.*,1990.

1.2.3.1 Proteínas estruturais

Dentre as proteínas estruturais, a primeira a ser sintetizada é a C; esta tem um peso molecular em torno de 11 kDa, contém 112 a 127 aminoácidos e é carregada positivamente, sendo capaz de interagir com o ssRNA viral, formando o componente estrutural do nucleocapsídeo (CHAMBERS *et al.*, 1990).

O maior constituinte da superfície do DENV é a proteína E, de 51-60 kDa; ela contém 494 a 501 aminoácidos e é responsável por atividades biológicas do ciclo viral, tais como a fusão e interação com receptores específicos existentes na superfície da célula alvo, e a montagem da partícula viral, além de ser o principal indutor de anticorpos neutralizantes e apresentar atividade hemaglutinante (CHAMBERS *et al.*, 1990; HEINZ; ALLISON, 2001).

Duas formas de proteína M têm sido caracterizadas: a prM, encontrada nos vírus intracelulares imaturos; e a M, encontrada nos vírus extracelulares maduros. A prM é uma glicoproteína de 18,1-19,1 kDa, sendo precursora da proteína estrutural M, de 7-9 kDa, com 75 aminoácidos. Ao sofrer uma clivagem proteolítica específica durante a maturação viral, dá origem à proteína M, que está envolvida no aumento da infectividade do vírus e na organização da estrutura viral (CHANG, 1997; RANDOLPH *et al.*, 1990).

1.2.3.2 Proteínas não-estruturais

A proteína NS1 é uma glicoproteína que contém 353 a 354 aminoácidos, possui peso molecular de 48 kDa e está envolvida na morfogênese da partícula viral. É expressa na superfície da célula infectada, portanto pode servir como alvo para a resposta imune (CHANG, 1997; MASON *et al.*, 1987; MUYLAERT *et al.*, 1997). Durante a infecção *in vitro* a proteína NS1 é expressa em uma forma associada à membrana intracelular, essencial para a replicação viral ou como forma associada à superfície celular que pode estar envolvida na transdução de sinal (MACKENZIE *et al.*, 1996; ALCON-LEPODER *et al.*, 2006). A proteína NS1, em solução, circula e acumula no plasma dos pacientes infectados com o vírus dengue por toda a fase clínica, podendo ser correlacionada com o desenvolvimento de formas mais graves da doença (LIBRATY *et al.*, 2002; ALCON *et al.*, 2002).

As pequenas proteínas: NS2a de 18-22 kDa com 218 a 231 aminoácidos; NS2b de 13-15 kDa com 130 a 132 aminoácidos; NS4a de 16-16,4 kDa com 149 a 150 aminoácidos; e NS4b de 27-28 kDa com 248 a 256 aminoácidos, não possuem ainda uma função bem definida. Acredita-se que estão implicadas no processo de replicação do RNA e que a NS2b é necessária para a função de protease da proteína NS3 (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2001).

A proteína NS3, de 68-70 kDa com 618 a 623 aminoácidos, apresenta atividade de protease e helicase, e a NS5, de 103-104 kDa com 900 a 905 aminoácidos, tem atividade de RNA polimerase viral, por apresentar uma seqüência semelhante a outras RNA polimerases. Ambas são altamente conservadas entre os *Flavivirus* (HENCHAL ; PUTNAK, 1990).

1.3. Replicação viral

Na replicação viral, o DENV penetra na célula por endocitose, através da ligação da proteína viral do envelope (E) com receptores da membrana plasmática. Após a entrada do vírus na célula, segue-se o desnudamento do nucleocapsídeo e a liberação do RNA viral para o citoplasma celular. A síntese de proteínas virais específicas está associada ao retículo endoplasmático rugoso e a replicação do RNA está localizada na região perinuclear (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Após a síntese da poliproteína, as proteínas virais são individualizadas através de clivagem por proteases específicas e as primeiras proteínas liberadas são as estruturais: C prM/M e E, seguida das não estruturais: NS1, NS3 e NS5. A fase inicial de latência do ciclo de replicação leva aproximadamente 12 horas, após as quais a progênie viral começa a ser liberada (Figura 03) (CHANG, 1997).

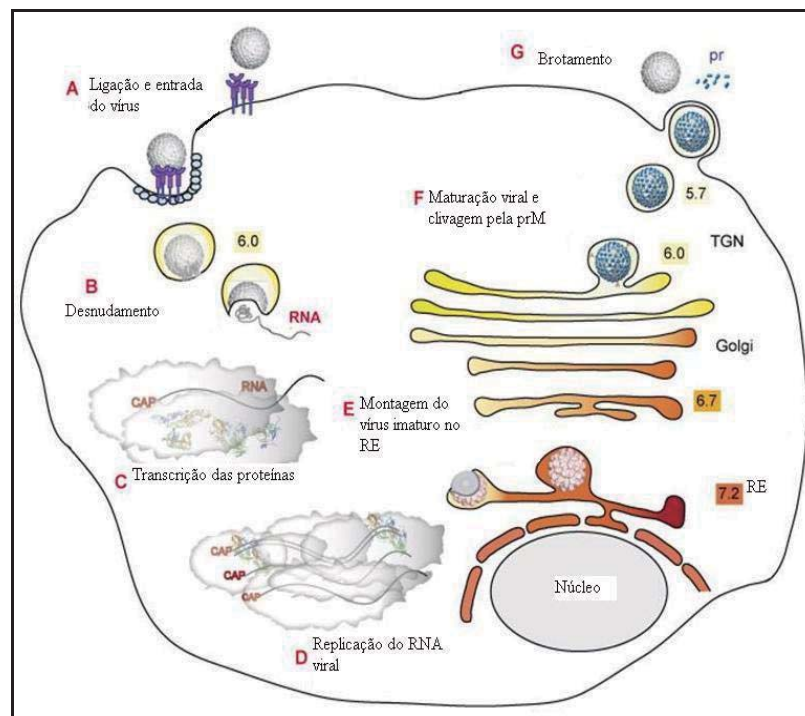


FIGURA 3 – Representação esquemática do ciclo replicativo dos *Flavivirus*.

Fonte: Extraído e adaptado de: <jiang.bio.purdue.edu/images/flavivirus.jpg>. Acesso em 17 de maio de 2010.

1.4. Diversidade genética dos DENV

Evidências de ocorrência de variação intratípica entre os DENV têm sido demonstradas desde os anos 70 (MCCLLOUD *et al.*, 1971; RUSSEL; MCCOWN, 1972), contudo, somente com o avanço das técnicas moleculares, tem sido possível determinar a variabilidade genética de cada sorotipo e, baseado nessas diferenças genéticas, agrupar as variantes (TRENT *et al.*, 1983; 1990; RICO-HESSE, 1990; LEWIS *et al.*, 1993; VORNDAM *et al.*, 1994; LANCIOTTI *et al.*, 1994; 1997). Esses estudos moleculares têm sido de grande utilidade para se determinar a origem e a evolução das amostras virais, bem como para verificar o impacto causado pela introdução de uma eventual correlação entre estas variantes e a severidade da doença (BALMASEDA *et al.*, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2000).

O quadro 1 retrata as variantes genótípicas do vírus dengue determinadas pelo seqüenciamento de 240 nucleotídeos da junção E/NS1, que permitiu a caracterização de cinco grupos genômicos para o DENV-1, cinco para os DENV-2, quatro para os DENV-3 e dois subtipos genéticos para os DENV-4.

QUADRO 1: Variantes genótípicas dos vírus dengue determinadas pelo seqüenciamento de 240 nucleotídeos da junção E/NS1.

Vírus	Genótipo	Distribuição Geográfica
DENV-1	I	Américas (1982/83/86/88), África (68/78-79/ 88), Sudeste Asiático (1974/76-77/81-82/85)
	II	Sri Lanka (1969)
	III	Japão (1943)
	IV	Sudeste Asiático (1945/73-74/78/88), Pacífico Sul (1974-75), Austrália (1981-82), México (1980)
	V	Taiwan (1987-88), Tailândia (1980)
DENV-2	I	Américas (1953/69), Pacífico Sul (1954/71-72/74)
	II	Taiwan (1981/87), Filipinas (1983/88), Nova Guiné (1944), Tailândia (1964)
	III	Vietnã (1987), Jamaica (1981-82), Tailândia (1983), Américas
	IV	Indonésia (1973/78), Seichelles (1977), Burkina Faso (1986), Sri Lanka (1981-82/85)
	V	África (1970/74/80-81)
DENV-3	I	Filipinas (1956/83), Indonésia (1973/78/85), Malásia (1974), Pacífico Sul (1989/92)
	II	Tailândia (1962/73/86-87)
	III	Sri Lanka (1981/85), Índia (1984), África (1985-86), Américas (1994)
	IV	Pacífico Sul (1965), Américas (1963/77)
DENV-4	I	Tailândia (1963/78/84), Filipinas (1956/64/84), Sri Lanka (1978)
	II	Indonésia (1973/76-77), Pacífico Sul (1979/81/83-85), Américas (1982/84/86)

A classificação dos vírus em genótipos tem sofrido algumas modificações, à medida que os métodos das análises evoluem e o banco de dados disponível se expande. Assim sendo, um novo agrupamento para o DENV-2 foi proposto por Rico-Hesse (2003), reduzindo a classificação inicial para quatro grupos. O DENV-4, por outro lado, passou por uma modificação e, na nova proposta, de dois grupos inicialmente, passou a ser definido em três genótipos (WANG *et al*, 2000). A circulação de um novo genótipo do DENV-3 foi recentemente descrita no Brasil e na Colômbia. Araújo *et al*. (2009), analisando o gene do envelope, confirmaram a classificação do novo genótipo Sul Americano em GV, passando assim o DENV-3 a apresentar cinco grupos genômicos. A atual filogenia baseada na sequência completa do gene E classifica o DENV-1 e o DENV-2 em cinco genótipos e o DENV-3 e o DENV-4 em quatro genótipos (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

1.5. Vetores

Os vetores conhecidos dos quatro sorotipos de DENV pertencem ao gênero *Aedes*. Ao subgênero *Stegomyia* pertencem os principais, dos quais foram isolados vírus na natureza (*Aedes aegypt* e *Aedes albopictus*), embora outras espécies de *Aedes* sirvam como vetor de DENV em áreas geográficas específicas (RODHAIN; ROSEN, 1997).

O *Aedes aegypti* é considerado o vetor mais importante para o homem por apresentar hábitos domésticos, estando associado a epidemias urbanas explosivas de Dengue Clássico (DC) e Febre Hemorrágica de Dengue (FHD), embora outras espécies de *Aedes* também estejam envolvidas em diferentes ciclos de transmissão rural e enzoótico destes vírus. A fêmea, que necessita de sangue para a postura dos ovos, pica o homem preferencialmente durante o dia e faz posturas parciais, podendo produzir vários focos. A oviposição é efetuada alguns milímetros acima da linha da água, tendo como criadouro a parede do recipiente. Os ovos podem permanecer viáveis por mais de um ano, retomando o seu ciclo evolutivo quando novamente em contato com a água (BRASIL, 2002a). É um artrópode holometábolo, cujo ciclo biológico possui quatro fases: ovo, quatro estágios larvários, pupa e adulto. Seu ciclo de vida pode ocorrer em menos de duas semanas e, o período de vida pode durar mais de um mês, mas em geral é de quinze a trinta dias. O mecanismo de transmissão salivar requer um intervalo de tempo, denominado de período de incubação extrínseca, que é o tempo necessário para replicação do vírus em seu interior, após repasto sanguíneo em ser humano virêmico, sendo o vírus localizado nas glândulas salivares do inseto. Após este período, que varia de oito a doze dias, os mosquitos podem transmitir a doença através da picada, ao indivíduo susceptível, determinando desta forma um novo ciclo (GUBLER, 1998; MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000). A figura 4

representa a transmissão do vírus dengue pelo *Aedes aegypti* em um ciclo que poderá se estender por mais de vinte dias.

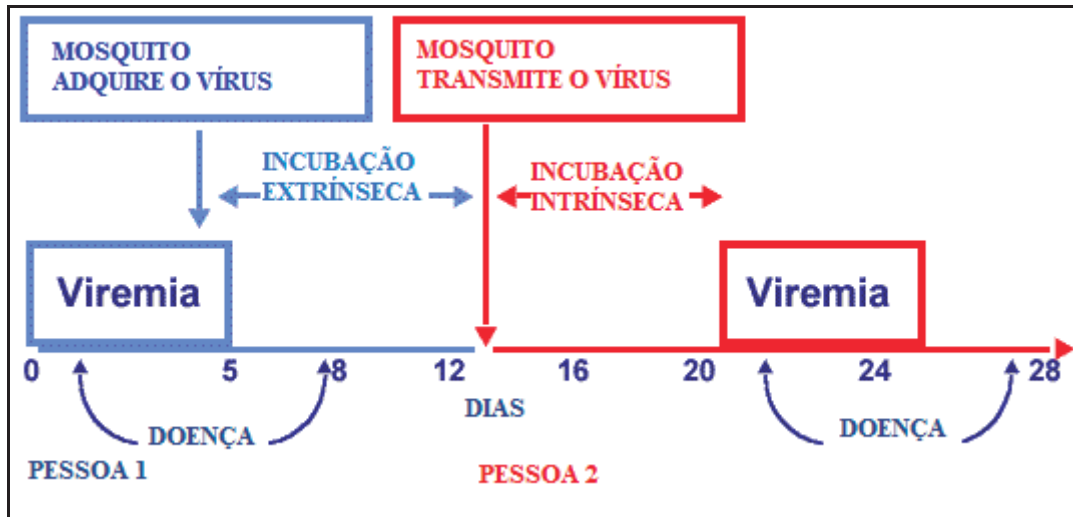


FIGURA 4: Ciclo de transmissão do vírus dengue pelo *Aedes aegypti*. Extraído e adaptado do *Center for Disease Control*.

Além da contaminação salivar, existe a transmissão transovariana ou vertical, em que o vírus é transmitido da fêmea para sua prole, dispensando a presença do homem neste ciclo (ESTEVAS; VARGAS, 2000).

Outra espécie de importância epidemiológica é o *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894, *apud* KNIGHT; STONE, 1977). Oriundo da Ásia, ele foi introduzido nas Américas através das rotas do comércio internacional (RODHAIN; ROSEN, 1997). De valência ecológica muito mais ampla que o *Aedes aegypti*, com tolerância maior ao frio e utilizando criadouros naturais e artificiais, este mosquito gera muita preocupação pela sua capacidade de sobreviver, tanto no ambiente silvestre quanto no urbano e periurbano, possibilitando a sua eventual atuação como “ponte” para a reintrodução do vírus da febre amarela em centros urbanos (RODHAIN; ROSEN, 1997; BRASIL, 2002,b).

1.6. Patogenia dos Vírus Dengue

A patogênese da FHD não está totalmente esclarecida. Apesar de estudos extensivos, a inexistência de um modelo animal que reproduza clinicamente a infecção tem dificultado a

compreensão da patogenia da dengue, levando à formação de hipóteses que tentam associar diferentes fatores de risco à gravidade da doença. Ainda que nenhuma destas hipóteses seja excludente, a mais aceita é a da infecção seqüencial, também conhecida como teoria do *enhancement*, ou exacerbação da resposta imune, que preconiza uma associação entre infecções secundárias e o aparecimento de FHD/SCD (HALSTEAD, 1988; THEIN *et al.*, 1997; MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000; VAUGHN *et al.*, 2000).

Segundo Halstead (1988), esta hipótese estaria centrada na formação de imuno-complexos dos vírus com anticorpos heterólogos da classe IgG existentes em níveis sub-neutralizantes, resultantes de uma infecção anterior. Estes complexos, ao serem reconhecidos e internalizados por fagócitos mononucleares, resultariam em infecção celular e replicação viral. Esta teoria foi posteriormente confirmada por Vaughn e colaboradores (2000) que a observaram pela primeira vez em humanos.

Crianças com idade inferior a um ano, ao adquirirem anticorpos anti dengue pela via transplacentária, poderiam ser incluídas nesta teoria. A infecção pelos DENV poderia, então, resultar nas formas mais graves da doença (BIELEFELDT-OHMANN, 1997; ROTHMAN, 1997; MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000).

Casos de FHD/SCD resultantes de infecções primárias têm sugerido que variações da virulência entre amostras de DENV poderiam ser responsáveis pela variabilidade na expressão clínica da doença (ROSEN, 1977; NOGUEIRA *et al.*, 1999a). Os fatores de virulência dentre outros, incluem a habilidade de infectar uma maior quantidade de células, gerar uma maior quantidade de provírus, causar uma inflamação mais severa e escapar dos mecanismos efetores da resposta imune.

Existem outras teorias propostas para explicar a patogênese da FHD, como a teoria do mimetismo molecular e a da cascata de citocinas (CHEN *et al.*, 2003; SUHARTI *et al.*, 2002; WILLS *et al.*, 2002; CHATURVEDI *et al.*, 2000). As evidências disponíveis sugerem que fatores virais, fatores de risco individual do hospedeiro e fatores epidemiológicos devem ser considerados na patogenia da dengue. A hipótese integral proposta por Kouri e colaboradores (1987) sugere que a interação entre estes grupos de fatores promoveria condições para o aparecimento das formas mais graves da doença.

1.7. Epidemiologia

Os fatores responsáveis pela reemergência da dengue como um problema global de saúde pública nas últimas décadas não estão bem entendidos. Contudo, parecem estar associados a mudanças demográficas e sociais nos últimos cinquenta anos. O crescimento da população mundial, aliado a uma

urbanização sem planejamento e descontrolada, tem criado condições ideais para o aumento de doenças transmitidas por mosquitos em centros urbanos tropicais. A falta de controle efetivo do vetor em áreas onde a dengue é endêmica e o intenso tráfego aéreo, que permite o deslocamento do vírus nos centros urbanos mundiais, também são fatores que contribuem para a expansão da dengue. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente três bilhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção pelos DENV (WHO, 2002). Estima-se que 50 a 100 milhões de casos de dengue ocorram anualmente em todo o mundo, dos quais cerca de 500 mil são de FDH/SCD e pelo menos 20 mil morrem em consequência da doença (GUBLER, 2002).

Do ponto de vista epidemiológico, os DENV são classificados como arbovírus, pois são mantidos na natureza através de um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, sendo o homem o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção (GUBLER, 2002).

1.7.1 Distribuição geográfica

As áreas de circulação dos DENV seguem a distribuição geográfica do mosquito vetor, que inclui os países da Ásia, Ilhas do Pacífico, África e as Américas (MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000). Na figura 6 visualizamos a distribuição do *Aedes aegypti* e do DENV.

Historicamente a Ásia tem sido a área mais afetada por epidemias de dengue, com os quatro sorotipos (DENV 1 a 4) circulando nos grandes centros urbanos da maioria dos países (GUBLER, 1998). Epidemias de dengue e casos esporádicos de FDH/SCD têm sido descritos em várias ilhas do pacífico, resultante da introdução do DENV-3 (1980) nesta região (PINHEIRO; CORBER, 1997). Na África, embora casos esporádicos de FDH/SCD tenham sido reportados, um aumento das epidemias de dengue foi observado nos últimos anos em diversas regiões do continente, como resultado da co-circulação dos quatro sorotipos dos DENV (GUBLER; TRENT, 1994; GUBLER, 1998). A figura 5 representa a distribuição geográfica das áreas infestadas com *Aedes aegypti* e epidemias de dengue.

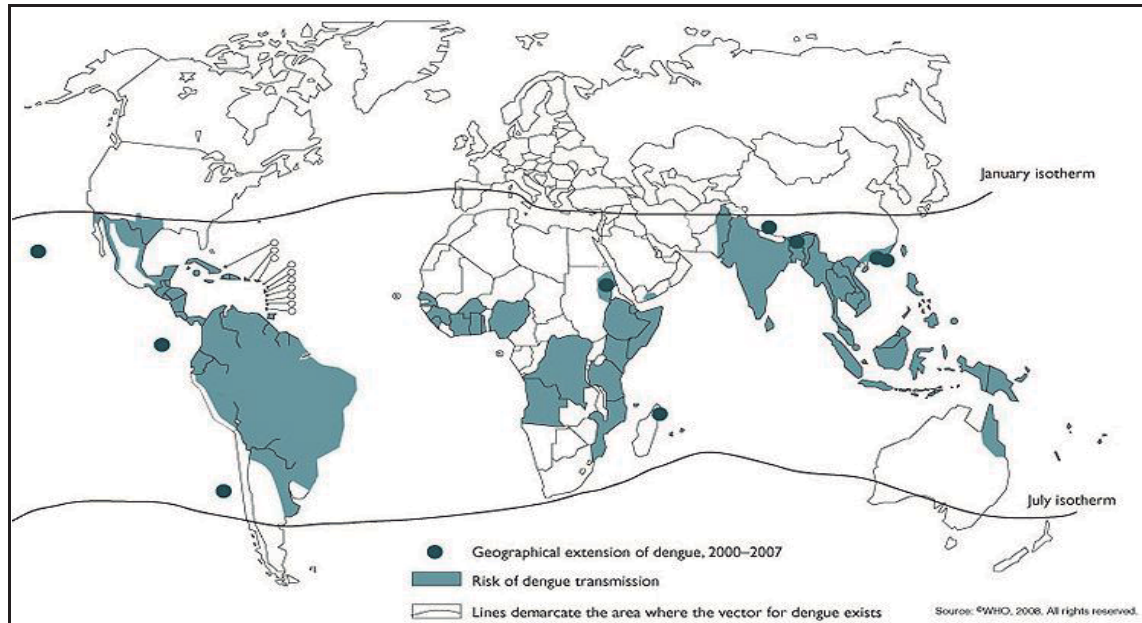


FIGURA 5: Distribuição geográfica das áreas infestadas com *Aedes aegypti* e epidemias de dengue, atualizado em 2009. Disponível em <www.cdc.gov/ncidod/dubid/dengue/map.distribution-2009.htm>. Acesso em 17 de maio de 2010.

1.7.2 Dengue nas Américas

No continente americano, embora tenham sido descritas epidemias compatíveis com infecção pelos DENV desde 1780, os sorotipos envolvidos em tais epidemias só foram conhecidos a partir de 1953, quando foi isolada a primeira amostra de DENV-2 em Trinidad (ANDERSON *et al.*, 1956). Dez anos depois, foram isoladas as primeiras amostras de DENV-3 em Porto Rico, sendo estes dois sorotipos responsáveis pelas epidemias ocorridas no continente nas décadas de 60 e 70 (PAHO, 1989; GUBLER, 1992).

Durante a década de 70, houve uma tentativa, porém sem êxito, de erradicação do mosquito *Aedes aegypti* das Américas, o que resultou, conseqüentemente, em uma reinfestação deste vetor no continente (GUBLER, 1993). Em 1977, o DENV-1 foi introduzido na Jamaica e dispersou-se rapidamente para outros países, onde, até o ano de 1980, foram notificados mais de 700.000 casos da doença no continente americano, praticamente todos estes causados pelo DENV-1 (PAHO, 1989; GUBLER; TRENT, 1994). A figura 6 representa a reinfestação das Américas pelo *Aedes aegypti*.

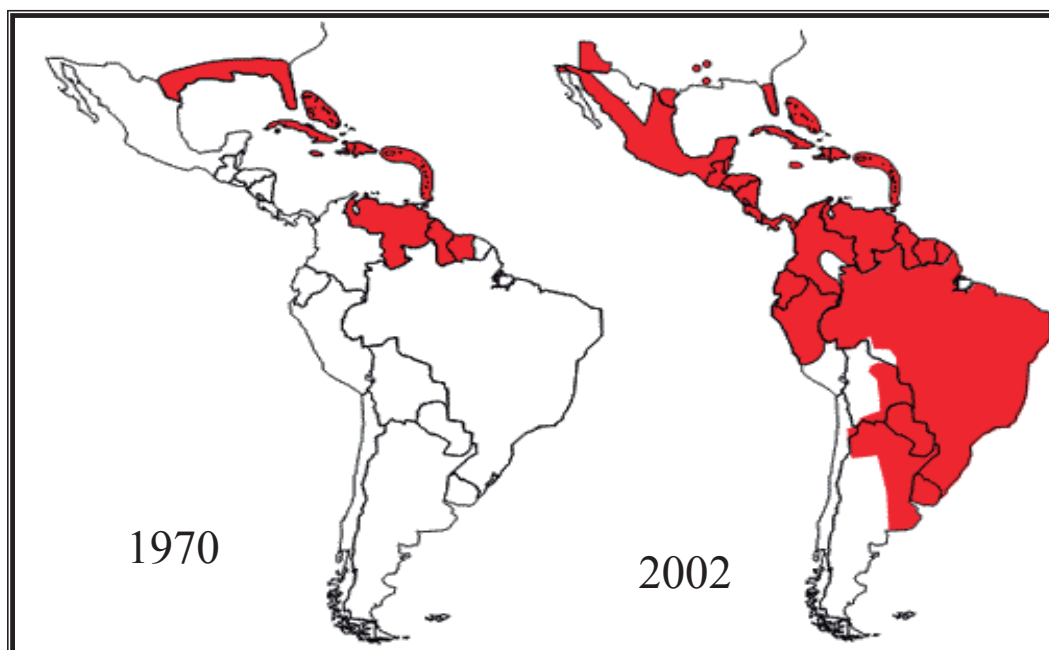


FIGURA 6: Distribuição do *Aedes aegypti* nas Américas em 1970, no final do programa de erradicação do mosquito, e em 2002. Reinfestação das Américas pelo *Aedes aegypti*. Fonte: OPAS/OMS, 2002.

No ano de 1981, o DENV-4 foi introduzido na ilha de São Bartolomeu e, após causar surtos no Caribe, América Central e América do Sul, tornou-se endêmico na região (CDC, 1981; PAHO, 1989). Durante este mesmo ano, uma nova variante do DENV-2 foi introduzida no Continente Americano, causando, em Cuba, a primeira epidemia de FDH/SCD das Américas (KOURI *et al.*, 1986; PINHEIRO; CORBER, 1997).

Durante os anos 80, Brasil, Bolívia, Equador, Paraguai e Peru registraram epidemias explosivas de dengue, após várias décadas sem a presença desta doença (PAHO, 1997).

No período de 1989 a 1990, ocorreu na Venezuela a segunda maior epidemia de FDH/SCD das Américas, onde co-circularam os DENV-1, DENV-2 e DENV-4, e cerca de 22.000 casos da doença foram notificados (PAHO, 1997; PINHEIRO; CHUIT, 1998).

A década de 90 foi caracterizada por epidemias de dengue e/ou FDH/SCD que afetaram cerca de vinte e cinco países do continente americano (PINHEIRO; CHUIT, 1998). Em 1994, o DENV-3 foi re-introduzido na Nicarágua e no Panamá. Este sorotipo esteve ausente do continente americano desde 1977, quando foi registrado o último caso isolado em Porto Rico (ANONYMUS, 1995).

Esta nova variante de DENV-3 mostrou-se geneticamente distinta daquela que anteriormente circulava nas Américas e foi caracterizada como genótipo III. Este genótipo tem sido associado à ocorrência de epidemias de FDH/SCD no Sri Lanka e Índia e em casos de FDH no México e países da América Central (GUBLER 1997; GUBLER; MELTZER, 1999). Nos anos

seguintes, o DENV-3 foi detectado em outros países do Continente, chegando à América do Sul, sendo isolado no estado do Rio de Janeiro, Brasil, em dezembro de 2000 (NOGUEIRA *et al.*, 2001). A figura 7 mostra a distribuição do Dengue 3 nas Américas por dois períodos: de 1994 a 1995 e de 1997 a 2003.



FIGURA 7: Presença de Dengue 3 nas Américas 1994 - 2003. Fonte: WHO/PAHO/CDC, Agosto de 2004.

1.7.3 Dengue no Brasil

Os primeiros relatos de dengue no Brasil datam de 1846 e descrevem surtos ocorridos simultaneamente nos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e em localidades do norte do país (MARIANO, 1917). Posteriormente, novos casos foram notificados no Paraná em 1890 (REIS, 1896), em São Paulo em 1916 (BRASIL, 2002a), no Rio Grande do Sul em 1917 (MARIANO, 1917) e no Rio de Janeiro em 1923 (PEDRO, 1923).

Em 1904, Oswaldo Cruz iniciou a campanha brasileira de erradicação do vetor *Ae. aegypti*, sendo que, somente na década de 40, com o apoio da Fundação Rockefeller, a campanha ganhou impulso nacional e culminou com a erradicação do mosquito no país até a década de 70 (FRANCO, 1961; FIGUEIREDO, 1996; 2000). Entretanto, o declínio no controle do mosquito vetor, associado à introdução de novos sorotipos virais na América Central, resultou na reintrodução dos DENV no Brasil após mais de cinquenta anos (FIGUEIREDO, 2000).

No norte do país, em Boa Vista, Roraima, em 1981, ocorreu um surto, em que foram isolados os DENV-1 e DENV-4 (OSANAI *et al.*, 1983). Todavia, foi somente a partir de 1986 que a dengue se tornou um problema de saúde pública nacional, com a introdução do DENV-1 no município de Nova Iguaçu, no Rio de Janeiro (SCHATZMAYR *et al.*, 1986). O intenso fluxo de pessoas deste município para municípios vizinhos, assim como para outros estados, explicou o rápido alastramento desta doença por todo o país, com cerca de 137.000 casos notificados (MIAGOSTOVICH *et al.*, 1993; NOGUEIRA *et al.*, 1999b; FIGUEIREDO, 2000). Até o ano de 1989, este sorotipo foi o responsável por epidemias e/ou surtos nas regiões Sudeste - Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Nordeste - Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco (VASCONCELOS *et al.*, 1993; 1995; MARZOCHI, 1994; NOGUEIRA *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 1995; CUNHA *et al.*, 1998; BRASIL, 1999).

O DENV-2 foi isolado pela primeira vez no Brasil em abril de 1990, na cidade de Niterói, Estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA *et al.*, 1990). Com a introdução deste novo sorotipo, após a circulação do DENV-1, foi observado o agravamento do quadro clínico e a notificação dos primeiros casos de FDH/SCD do país, embora casos fatais tenham sido relatados durante epidemia ocorrida em 1986 (ZAGNE *et al.*, 1994 NOGUEIRA *et al.*, 1999b). A dificuldade de se implantar uma política nacional eficaz de combate ao mosquito vetor resultou na disseminação dos DENV-1 e DENV-2 e no aumento na notificação dos casos no país.

O DENV-3 foi detectado pela primeira vez no Brasil em 1998 na cidade de Limeira, Estado de São Paulo, a partir de um caso importado (ROCCO *et al.*, 2001). Em dezembro de 2000, esse sorotipo foi detectado no município de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro, sendo o responsável pela maior e mais grave epidemia de dengue já ocorrida no Estado até então, com 288.245 casos notificados e 91 óbitos (NOGUEIRA *et al.*, 2001, 2005, 2007).

De 1981 a 2006 foram notificados 4.243.049 casos de dengue no Brasil, incluindo 5.817 casos de FHD e um total de 338 evoluções fatais. Apesar de todas as regiões terem sido afetadas, o nordeste e o sudeste registraram o maior número de notificações. Além dos sintomas usuais observados nos casos de dengue hemorrágica, manifestações não usuais envolvendo o sistema nervoso central foram reportadas no Rio de Janeiro, em Pernambuco e em Rondônia (BRASIL, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2007; CORDEIRO *et al.*, 2007; SOUZA, 2006).

No século XXI o Brasil tornou-se o país com o maior número de casos de dengue reportados no mundo, ocupando o primeiro lugar em número de casos da doença, com mais de três milhões de casos notificados de 2000 a 2005 (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

No verão de 2008 explodiu a maior epidemia de dengue já registrada no país, no Rio de Janeiro, que afetou também outras cidades do estado, onde nos primeiros quatro meses houve mais de nove mil hospitalizações, mais de mil casos de dengue hemorrágica e 110 mortes. Quase a metade desses óbitos foi de crianças, mostrando uma tendência, já observada no Brasil como um todo, do

aumento de casos em crianças menores de 15 anos (RIO DE JANEIRO, 2008; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Após mais de cinquenta anos sem casos de dengue no país, a reintrodução dos DENV em 1986 tem ocasionado inúmeras epidemias envolvendo quase todas as Unidades Federativas. No ano de 2011 foram notificados 715.666 casos até o dia dois de julho, com 310 óbitos confirmados. Diante da situação do país o Ministério da Saúde (MS) decidiu utilizar uma ferramenta, lançada em setembro de 2010, para avaliar o risco de epidemias de dengue, o risco dengue. O MS levou em consideração seis critérios básicos, dos quais quatro são do setor saúde: a incidência atual dos casos; a incidência dos casos nos anos anteriores; os índices de infestação pelo *Aedes aegypti*; os sorotipos em circulação; a cobertura de abastecimento de água e coleta de lixo; e, a densidade populacional (BRASIL, 2011a). Baseado nesses critérios classificou o risco de epidemias de dengue nos estados da federação (Figura 8). A identificação de circulação autóctone dos sorotipos DENV-1, 2 e 3 em todo o país e a recente reintrodução do DENV-4 caracteriza uma situação de hiperendemicidade (Figura 9) (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2009; BRASIL, 2011b).

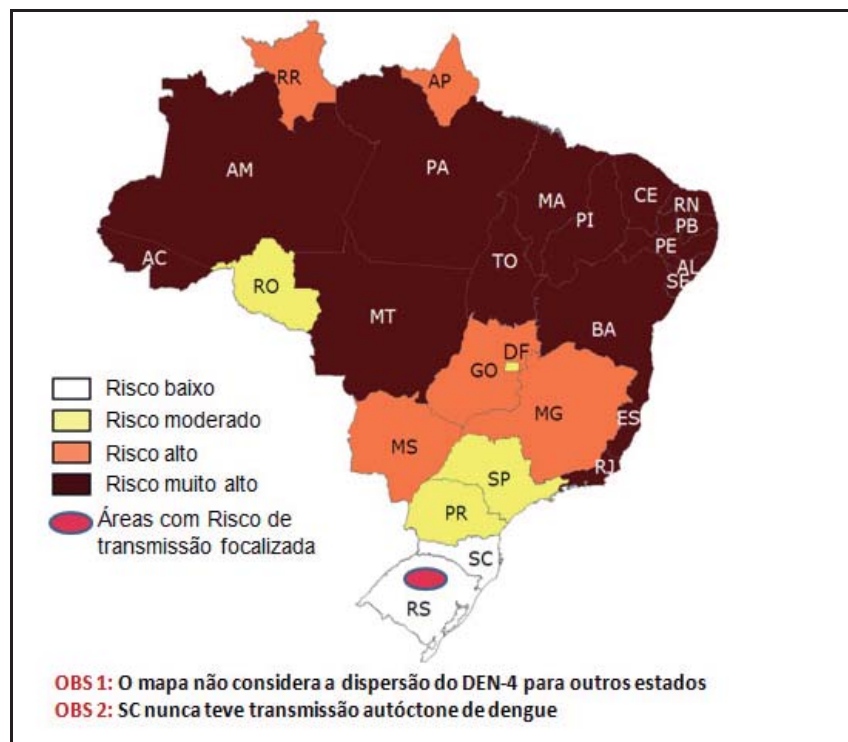


FIGURA 8: Mapa do Risco Dengue no Brasil, 2011.

Fonte: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/> Acesso em 10/09/2011.

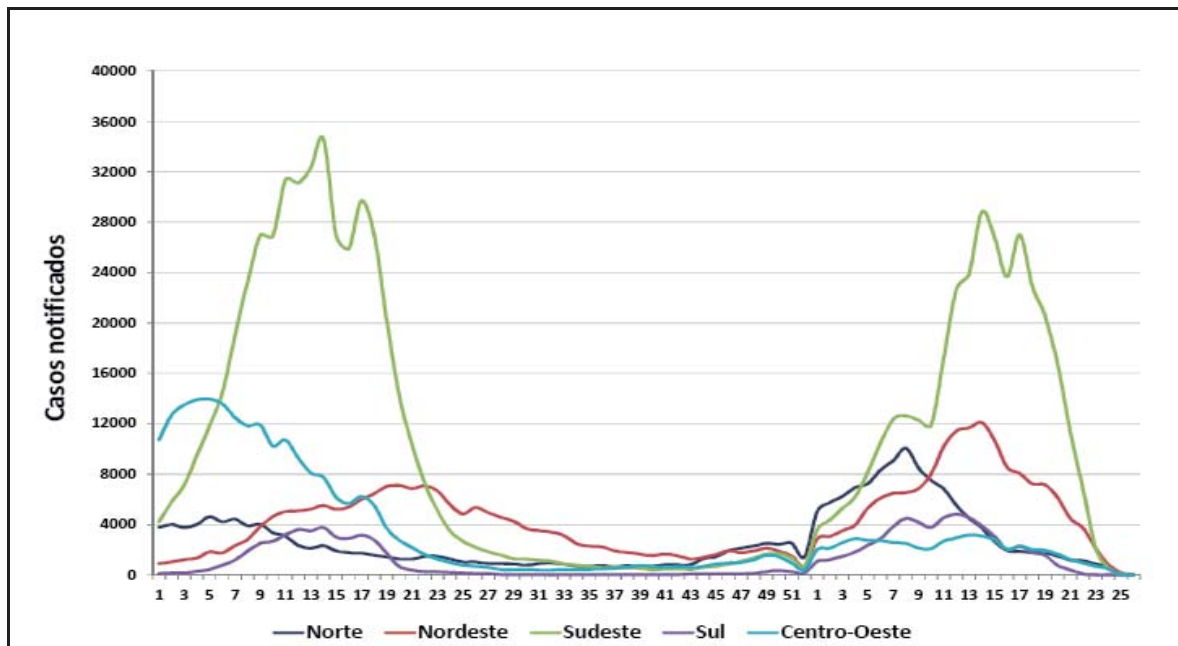


FIGURA 9: Casos notificados de dengue por semana epidemiológica segundo região, Brasil, 2010/2011*. Fonte: MS/SVS. (*) Dados até junho de 2011, sujeitos à revisão.

1.7.4 Dengue no Ceará

Os primeiros relatos que sugerem a presença do vetor comum à dengue e à febre amarela, *Aedes aegypti*, no Estado do Ceará datam de 1851. Na ocasião aconteceu uma grande epidemia de febre amarela, com 28.400 casos relatados em todo o Estado (FRANCO, 1969). O último caso da doença foi detectado em 1934 e os focos de *Aedes aegypti* no Ceará foram erradicados em 1950 pela Fundação Rockefeller, que era então a responsável pelo combate ao mosquito no Brasil (FRANCO, 1969).

Em julho de 1984 foi detectada a reintrodução do *Aedes aegypti* no Ceará, e em 1986, um levantamento realizado pela Fundação Nacional de Saúde, entre os meses de janeiro e março, revelou índices de infestação predial de até 75,93% em Fortaleza. Foram identificados outros 65 municípios infestados pelo vetor na mesma época (LIMA, 1985; ARAÚJO, 2006).

Com a introdução do DENV-1 no Estado do Rio de Janeiro em de 1986, o intenso fluxo de pessoas para outros estados e a alta densidade vetorial, o alastramento da dengue por todo o país, principalmente para os estados do sudeste e do nordeste, incluindo o Ceará, foi muito rápido (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Portanto, os primeiros casos de dengue no Estado do Ceará ocorreram em agosto de 1986, ocasionados pelo DENV-1, que no ano seguinte causou uma epidemia cujo pico foi registrado nos meses de abril e maio (SOUZA *et al.*, 1995).

A doença tornou-se endêmica no Ceará e nova epidemia ocorreu em 1990, causada pelo mesmo sorotipo DENV-1 (ARAÚJO, 2006). A dengue mantinha o seu comportamento considerado habitual, com períodos de epidemia intercalados por outros de baixa circulação viral, com poucos casos da doença notificados. No ano de 1994 explodiu a maior epidemia até hoje registrada no Estado, ocasionada pela introdução de um novo sorotipo, o DENV-2, com casos de dengue hemorrágica acontecendo pela primeira vez no Estado, dos quais 12 evoluíram para óbito (SOUZA *et al.*, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 1995).

A partir de 1994 os DENV-1 e DENV-2 co-circularam no Estado e em 2001 ocorreu uma nova epidemia, com 34.390 casos notificados, envolvendo 132 municípios; 78 casos foram classificados como dengue hemorrágico e aconteceram oito óbitos (CEARÁ, 2005). Houve a predominância do DENV-2 circulando no início do ano, e no segundo semestre predominou o DENV-1, o que continuou até o início de 2002 (ARAÚJO, 2006).

Em 1998 foi implantada a cultura do vírus dengue em linhagem celular do mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36, no LACEN-CE. A partir de então houve uma implementação na detecção do DENV pela técnica de isolamento viral, melhorando a vigilância virológica da dengue e facilitando o monitoramento da dispersão dos sorotipos circulantes bem como a entrada de novo sorotipo. Foi assim que, em março de 2002, logo após a epidemia ocasionada pelos sorotipos 1 e 2, foram isolados pelo Setor de Virologia do LACEN-CE os primeiros casos autóctones de DENV-3 no Ceará (ARAÚJO, 2006).

Com a circulação simultânea de três sorotipos e a maioria dos municípios infestados pelo *Aedes aegypti*, o Estado tornou-se uma área de alta endemicidade, onde em 2003 foi detectado o primeiro caso de infecção simultânea pelo DENV-2 e DENV-3 do Brasil, no município de Tauá (ARAÚJO *et al.*, 2006).

O ano de 2004 foi considerado interepidêmico em consequência da baixa incidência da doença (Figura 10). Em 2008, com a re-emergência do DENV-2, foram notificados 66.418 casos suspeitos de dengue em 179 municípios. Destes, 44.162 casos foram confirmados laboratorialmente em 167 municípios. Houve a confirmação de 442 casos como FHD, com 17 deles com evolução fatal, e 538 casos como dengue com complicação, com 18 óbitos. Esses casos graves procediam de mais de 40 municípios, embora a maioria fosse de Fortaleza. Os meses de abril e maio foram os que registraram o maior número de casos. A epidemia de 2008 foi a segunda maior em número total de casos, e a primeira em número de casos de FHD e dengue com complicação (CEARÁ, 2008) (Figura 11). Apesar da FHD ter acometido mais os adultos, uma mudança de faixa etária, passando os menores de 15 anos a apresentar cada vez mais esses casos graves, tem sido observada nos últimos três anos (CAVALCANTI *et al.*, 2010).

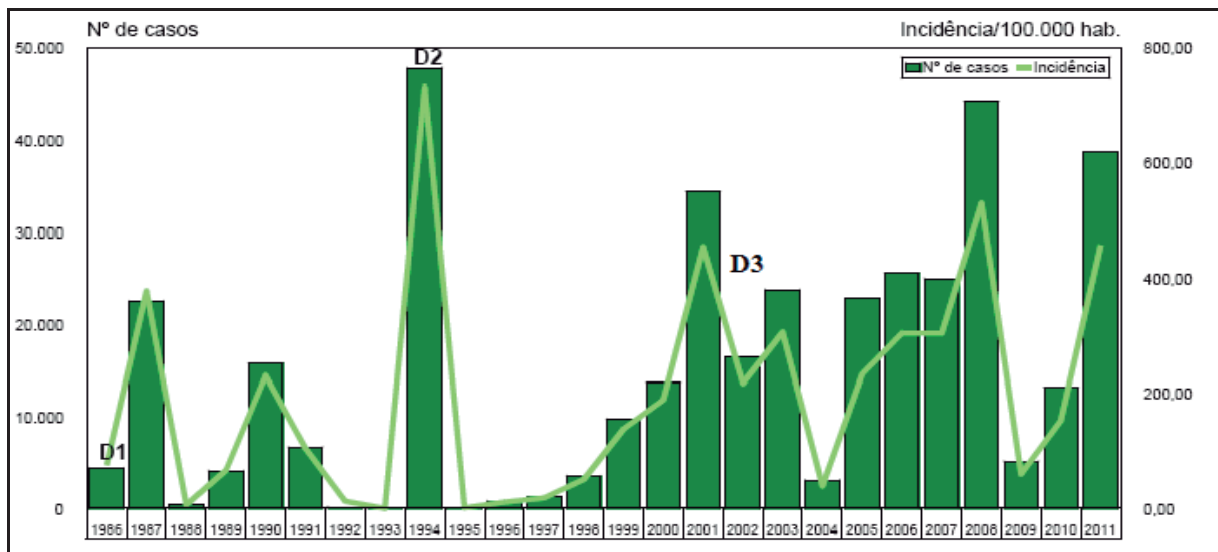


FIGURA 10: Número de casos notificados e incidência de dengue, no Ceará, de 1986 a 2011*. Fonte: SESA (*) Dados até julho de 2011, sujeitos à revisão.

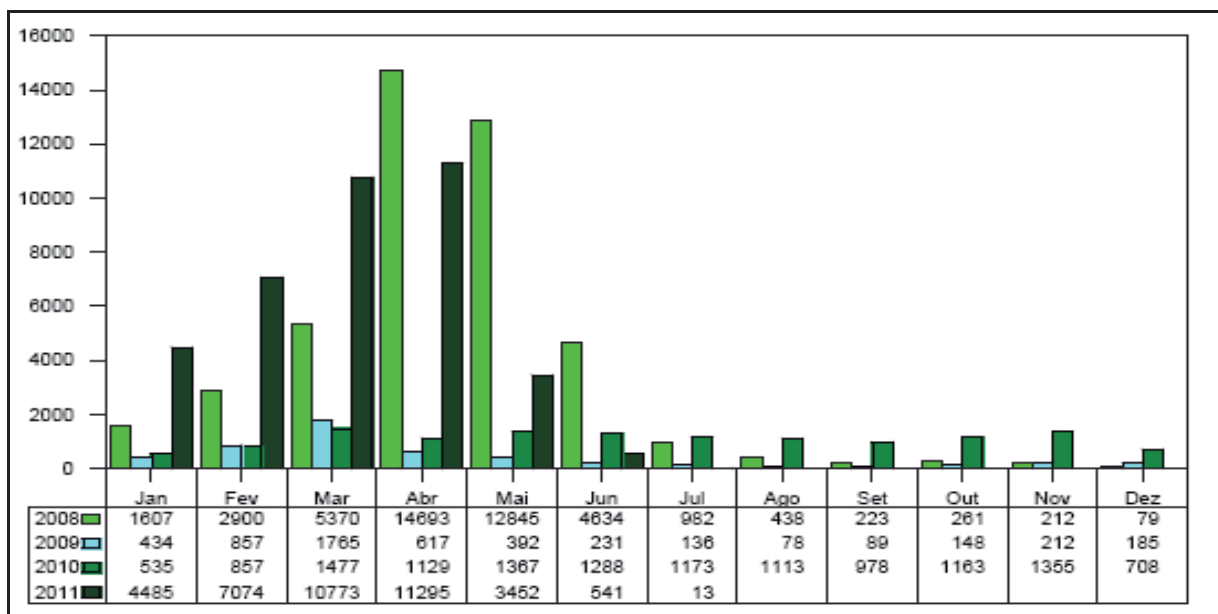


FIGURA 11: Casos confirmados de dengue hemorrágico por mês no Ceará de 2008 a 2011*. Fonte: SESA (*) Dados até julho de 2011, sujeitos à revisão.

O sorotipo DENV-3 predominou de 2003 a 2006, quando o DENV-2 retornou em 2007, após três anos sem ser detectado no Estado (ARAÚJO *et al.*, 2008). As análises filogenéticas de cepas de DENV-2 e 3 isoladas desse período identificaram os genótipos circulantes. Para o DENV-2 o genótipo circulante continuou sendo o genótipo III, mas pertencente a uma linhagem diferenciada da primeira que circulou no estado antes de 2007 (Figura 12); para o DENV-3 o genótipo continuou sendo o mesmo que circula desde a sua introdução em 2002, o genótipo III (Figura 13) (ARAÚJO *et*

al., 2006; Comunicação Pessoal). A introdução e disseminação do DENV-3 e a re-emergência do DENV-2 tem aumentado a ocorrência de casos graves da dengue no Ceará. A recirculação do sorotipo DENV-1 e a introdução do DENV-4 são riscos em potencial para novas epidemias no Estado.

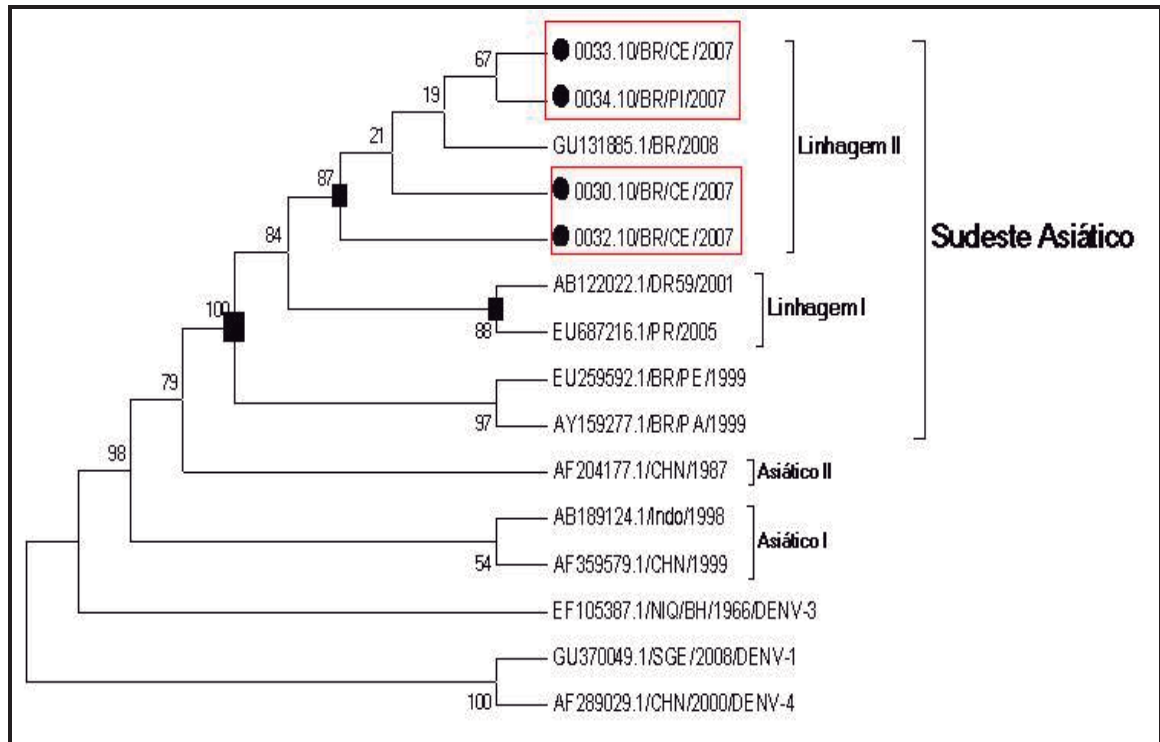


FIGURA 12 - Análise filogenética de cepas de DENV-2 baseada na seqüência da junção dos genes E/NS1 de três cepas provenientes do Estado do Ceará (2007) e Piauí (2007), através do método de Neighbor-Joining, modelo Tamura Nei e *bootstrap* de 1000 pseudoréplicas. Representantes de DENV-1, DENV-3 e DENV-4 foram utilizadas como grupos externos.

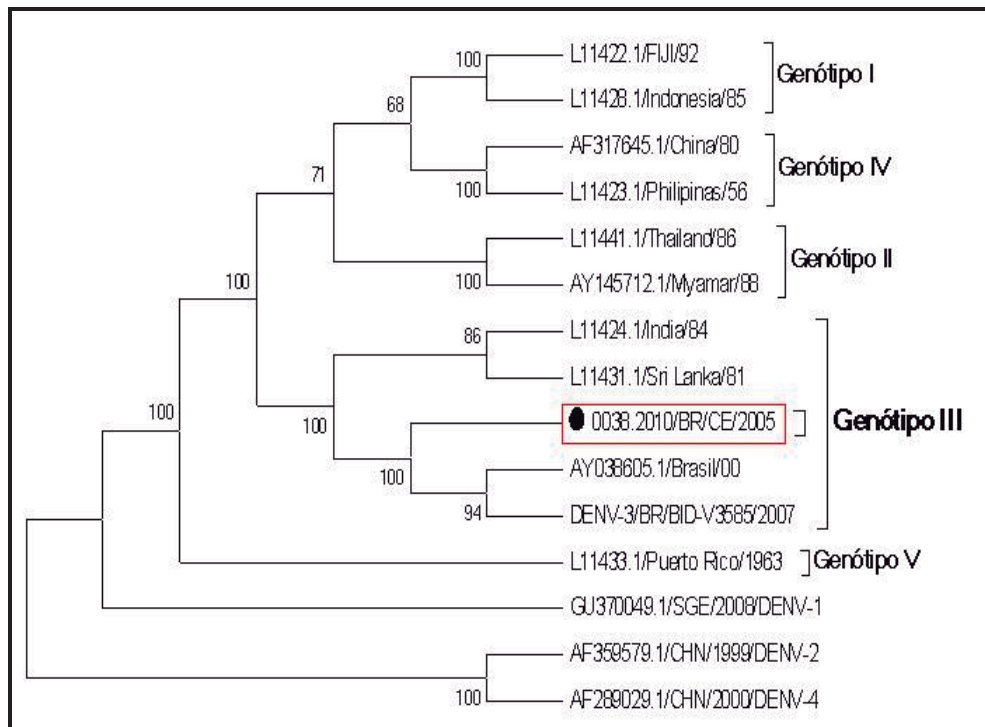


FIGURA 13 - Análise filogenética de cepa de DENV-3 baseada na seqüência do gene E de proveniente do estado do Ceará (2005), através do método de Neighbor-Joining, modelo Tamura Nei e *bootstrap* de 1000 pseudoréplicas. Representantes de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 foram utilizadas como grupos externos.

1.8 Doença

Dengue é uma doença febril, aguda, causada por um dos quatro sorotipos dos vírus (DENV 1, 2, 3 e 4). A infecção pode ser inteiramente assintomática ou apresentar-se como uma febre (DC) ou como FHD com síndrome de choque hipovolêmico variável, acompanhada por hemorragia e falência de órgãos (GUBLER, 1998).

Após o período de incubação, que varia de três a 14 dias, o indivíduo passa por um período de viremia, com conseqüente disseminação do vírus por todo o organismo. Durante a viremia, que pode variar de dois a 10 dias, os vírus podem ser isolados do sangue e dos tecidos (GUBLER, 1998).

A infecção por qualquer um dos sorotipos confere proteção duradoura contra o tipo sorológico infectante e proteção parcial e temporária, de aproximadamente três a seis meses, contra os outros. A infecção pode ser acompanhada por um estado febril, inespecífico, de curta duração, acompanhada de faringite, rinite e tosse branda. Por vezes, este quadro febril, que é freqüentemente observado em lactentes e crianças, pode ser acompanhado apenas por uma erupção maculopapular, o que dificulta o seu diagnóstico exclusivamente em bases clínicas (DIAS, 1988; GIBBONS; VAUGHN, 2002).

1.8.1 Dengue clássica

A DC é caracterizada por febre de início súbito, dor retro-orbitária, cefaléia, mialgia, artralgia, podendo ocorrer alterações gastrointestinais (náuseas e vômitos), linfadenopatias e até manifestações hemorrágicas (WHO, 1997; RIGAU-PÈREZ *et al.*, 1998). Dor abdominal generalizada tem sido observada mais frequentemente entre crianças, enquanto as manifestações hemorrágicas, tais como: petéquias, epistaxe, gengivorragia e metrorragia, têm sido relatadas mais em adultos. A doença tem duração de cinco a dez dias, todavia o período de convalescença pode ser acompanhado de debilidade física que pode prolongar-se por várias semanas (BRASIL, 2002b).

1.8.2 Febre hemorrágica da dengue

A FHD inicia como o DC, mas apresenta um agravamento do quadro por volta do terceiro ou quarto dia de doença, em geral no final da etapa febril. É caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e hipovolemia, além de diminuição da contagem de plaquetas ($< 100.000/\text{mm}^3$), o aumento da permeabilidade vascular pode ser constatado por meio da hemoconcentração, refletida por um aumento de 20% ou mais do hematócrito, por derrames cavitários e hipoproteinemia (WHO, 1997). Em alguns casos, o estado do paciente pode se agravar repentinamente, evoluindo para a síndrome do choque de dengue, que é resultante de uma perda crítica do plasma e se caracteriza quando surgem sinais de insuficiência circulatória, tais como: pele fria e congestionada, inquietação, baixa pressão do pulso, tontura postural e lipotímia (WHO, 1997). A Organização Mundial de Saúde classifica a FHD em quatro categorias, segundo a gravidade: grau I – febre acompanhada de sintomas inespecíficos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva; grau II – às manifestações do grau I soma-se hemorragias espontâneas leves (sangramentos de pele, epistaxe, gengivorragia e outros); grau III – colapso circulatório, com pulso fraco e rápido, hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação; grau IV – choque profundo com ausência de pressão arterial e pressão de pulso imperceptível (Síndrome do Choque de Dengue - SCD) (BRASIL, 2002b).

1.8.3. Complicações da dengue

Nos últimos anos o envolvimento do sistema nervoso central (SNC) e alterações hepáticas resultantes de infecções pelos DENV se tornaram mais evidentes, porém tais alterações têm sido descritas como manifestações clínicas não usuais com alta letalidade (CHIMELLI *et al.*, 1990; LAM,

1996; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997; NGUYEN *et al.*, 1997; THISYAKORN *et al.*, 1999; ANGIBAUD *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2002).

A infecção por dengue resulta, na maioria dos casos, em uma doença febril, branda, auto limitada, contudo, em algumas infecções, manifestações hemorrágicas e sinais de colapso circulatório ocorrem, podendo levar a um choque hipovolêmico, súbito e muitas vezes fatal (WHO, 1986). Não há tratamento específico para DC ou FHD/SCD, entretanto com um diagnóstico e manejo clínico apropriados, o índice de mortalidade pode ser < 1% (OOI *et al.*, 2006).

A melhoria do diagnóstico laboratorial, bem como, um maior conhecimento da expressão clínica da doença por parte dos médicos têm permitido reconhecer suas conseqüências sobre vários órgãos e sistemas (GEORGE; LUM, 1997). Um número crescente de casos de dengue tem sido associado com manifestações atípicas como encefalopatias, encefalites, miocardiopatias, insuficiência hepática e hepatite fulminante (NIMMANNITYA *et al.*, 1987; GEORGE *et al.*, 1989; CHIMELLI *et al.*, 1990; PATEY *et al.*, 1993; THISYAKORN; THISYAKORN, 1994; LUM *et al.*, 1996; ROW *et al.*, 1996; RAMOS *et al.*, 1998; CAM *et al.*, 2001; LEÃO *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2004; MARTINEZ, 2005; MÉNDEZ; GONZÁLEZ, 2006; MISRA; KALITA, 2006; MUZAFFAR *et al.*, 2006; UEHARA *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2007; SALGADO *et al.*, 2007; KULARATNE *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008; VERMA; VARATHARAJ, 2011).

A situação epidemiológica atual do país, de hiperendemicidade, com aumento dos vírus circulantes e das infecções sequenciais, leva a uma maior probabilidade de casos de FHD e dengue grave. Por conta do caso grave da doença que não se enquadra nos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) de FHD e DC, o MS passou a adotar uma terceira classificação: dengue com complicações. A dificuldade de classificar os casos de dengue com complicação em casos de DC e FHD despertou o interesse de um grupo multicêntrico. Esse grupo, através de um estudo prospectivo com pacientes de sete países, concluiu que um sistema de classificação revisado composto por duas entidades, dengue e dengue grave, deveria ser considerada. A proposta foi incorporada às orientações da OMS sobre dengue (WHO, 2009; ALEXANDER *et al.*, 2011). O quadro é caracterizado por um dos seguintes achados: alterações graves do sistema nervoso; disfunção cardiorespiratória; insuficiência hepática; plaquetopenia igual ou inferior a $50.000/\text{mm}^3$; hemorragia digestiva; derrames cavitários; leucometria global igual ou inferior a $1.000/\text{mm}^3$; óbito (BRASIL, 2005).

As manifestações clínicas do SNC podem surgir no decorrer do período febril ou mais tardiamente, na convalescença. Estão presentes tanto em adultos como em crianças e incluem: delírio, sonolência, coma, depressão, irritabilidade, psicose, demência, amnésia, sinais meníngeos, paresias, paralisias, polineuropatias, síndrome de Reye, síndrome de Guillain-Barré e encefalite (BRASIL, 2005).

Na infecção por dengue, ao contrário da maioria dos arbovírus, não é comum a ocorrência de sintomatologia neurológica. Contudo alguns casos de pacientes com encefalopatias têm sido descritos. As manifestações neurológicas têm sido atribuídas ao edema cerebral, anóxia, hemorragia, hiponatremia, falha hepática, hemorragia microcapilar, liberação de substâncias tóxicas e podem ser imuno mediados, como evidenciado em encefalomielite aguda disseminada (CAM *et al.*, 2001; PANCHAROEN; THISYAKORN, 2001; MURTHY, 2002; 2010; SUNDARAM *et al.*, 2010). Entretanto, estudos clínicos e em animais têm sugerido um potencial neurotrópico para o vírus dengue, levando em alguns casos à encefalite (CHATURVEDI *et al.*, 1991; LUM *et al.*, 1996; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997; SOARES-MORENO *et al.*, 2004; KAMATH; RANJIT, 2006; AHMED *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2007; WASAY *et al.*, 2008; AGARWAL *et al.*, 2009; MATLANI *et al.*, 2009; KHANNA *et al.*, 2011). A indução de apoptose como mecanismo fisiopatológico, resultante da ação direta do vírus, levando à morte celular dos hepatócitos, neurônios e endotélio, poderia explicar o comprometimento visceral e o dano aos tecidos que ocorre em casos de FHD (MARTÍNEZ, 2005). A apoptose tem sido sugerida como o mecanismo pelo qual os DENV podem causar a morte neuronal (DESPRÉS *et al.*, 1996). Um estudo de 378 pacientes hospitalizados por infecção do sistema nervoso central (SNC), em um hospital de referência no Vietnã, constatou que 21 tiveram diagnóstico de dengue pelos sorotipos 1, 2 e 3. O grupo incluía casos de dengue primário e secundário e cerca da metade não tinha quadro clínico compatível com dengue no momento da hospitalização. As manifestações neurológicas mais frequentes foram perturbações de consciência e convulsões. Nove pacientes apresentavam encefalite, não houve óbitos, mas seis pacientes tiveram seqüelas neurológicas (SOLOMON *et al.*, 2000).

No Brasil, com o aumento dos casos de FHD/SCD, as infecções por dengue com manifestações não usuais têm sido observadas (SOUZA *et al.*, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 1995, 1998; CORDEIRO, 1997; LEÃO *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2002, UEHARA *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2008).

O envolvimento do SNC em pacientes com dengue tem sido registrado recentemente em vários estados brasileiros (Quadro 02) e o uso de técnicas para pesquisa de Ac e material genético do vírus no LCR tem contribuído para esse diagnóstico (CORDEIRO *et al.*, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2008). Entretanto, as pesquisas no LCR de pacientes com manifestações neurológicas partiram quase sempre da suspeita clínica de dengue, não se sabe qual seria a contribuição dessa pesquisa em uma rotina de pacientes com suspeita de meningites e encefalites. Solomon e colaboradores (2000) concluíram, em seu trabalho sobre manifestações neurológicas na infecção por dengue, que em área endêmica para dengue os pacientes com encefalite e encefalopatias devem ser investigados para dengue independente de manifestarem os sinais e sintomas característicos da doença.

Quadro 02: Manifestações neurológicas de dengue no Brasil (1997-2010).

Autor	Ano	Local do Estudo	Nº de Casos Segundo a Manifestação Neurológica Apresentada
Miagostovich et al	1997	Rio de Janeiro	Encefalopatia (5)
Vasconcelos et al	1998	Ceará	Modificação do comportamento, síncope, tremor (1); rigidez de nuca (2)
Nogueira et al	2002	Rio Grande do Norte	Encefalite (1)
Leão et al.	2002	Pará	Mielite transversa (1)
Moura et al.	2004	Pernambuco	Síndrome de Guillain-Barré, encefalite, mielite, paralisia facial, convulsão e ou encefalopatia (31)
Soares-Moreno et al	2004	Rio de Janeiro	Encefalite aguda (1); síndrome de Guillain-Barré (1)
Santos et al.	2004	Bahia	Síndrome de Guillain-Barré (1)
Ferreira et al.	2005	Pernambuco	Convulsão (8); encefalite (7); síndrome de Guillain-Barré (7); outras man. neurol. (19)
Nogueira et al.	2005	Rio de Janeiro	Encefalite (1)
Souza et al.	2005	Rio de Janeiro	Encefalopatia(1)
Sousa A.M.	2006	Rondônia	Mielite transversa (26)
Brito et al.	2006	Pernambuco	Encefalomielite disseminada aguda (1)
Soares et al.	2006	Rio de Janeiro	Encefalite (7); síndrome de Guillain-Barré (4); mielite (2)
Cordeiro et al.	2007	Pernambuco	Encefalite (6); meningoencefalite (4); síndrome de Guillain-Barré (3); outras man. neurol. (19)
Domingues et al.	2008	Espírito Santo	Encefalopatia ou encefalite (17); meningite (1)
Soares et al.	2008	Rio de Janeiro	Síndrome de Guillain-Barré (7)
Soares et al.	2010	Rio de Janeiro	Meningite (1)
Aragão et al.	2010	Ceará	Neurite óptica bilateral (2)

Os estudos retrospectivos de casos fatais com suspeita de dengue também têm sido realizados através do exame histopatológico, IHQ, isolamento viral, RT-PCR e PCR em tempo real, em tecidos obtidos após a autópsia dos casos (BHAMARAPRAVATI *et al.*, 1967; BASÍLIO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005; DE ARAÚJO *et al.*, 2009).

No estado do Ceará, os pacientes que vão a óbito sem diagnóstico definido e com suspeita de doença infecciosa, são encaminhados ao Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado (SVO) da Secretaria de Saúde do Estado (SESA-CE). Os cadáveres são submetidos à autópsia e os materiais biológicos como sangue, LCR e alíquotas de vísceras são coletadas para posterior esclarecimento diagnóstico. As vísceras conservadas em formol são encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas em Belém (IEC), para a realização do exame histopatológico e a IHQ para dengue. O

sangue, as vísceras *in natura* e o LCR, são encaminhados ao LACEN-CE para a investigação laboratorial para dengue, leptospirose ou meningite, dependendo da suspeita clínica (BRASIL, 2006).

Nos anos de 2005 a 2008 a circulação de DENV foi intensa no Estado, a incidência da doença alcançou 529,78 casos por 100.000 habitantes em 2008, com os casos confirmados distribuídos em 167 municípios (CEARÁ, 2008). Os casos de FHD e DCC aumentaram, elevando também o número de óbitos causados pela doença, que foram 158 nesses quatro anos (Comunicação pessoal). O Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) é um dos hospitais de referência para o atendimento de casos suspeitos de dengue para onde é encaminhada a maioria dos pacientes de todo o estado (PONTE *et al.*, 2011).

1.9. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico conclusivo das infecções pelos DENV é realizado no laboratório através de isolamento viral, detecção do ácido nucléico ou antígeno viral no soro, líquido céfalo-raquidiano (LCR) ou tecido, e detecção de anticorpos (Ac) específicos da classe IgM e IgG no soro do paciente (WHO, 2009). Para um diagnóstico ideal duas amostras de sangue deverão ser coletadas: uma amostra de sangue na fase aguda da infecção, o mais cedo possível depois do início dos sintomas; e, uma segunda amostra na fase de convalescença após duas a três semanas da primeira (GUBLER; SATHER, 1988). Contudo nenhum teste isolado é ótimo ou perfeito para o diagnóstico (GUBLER *et al.*, 2007).

1.9.1. Isolamento viral

O estabelecimento da cultura de células de mosquito no sistema de isolamento viral representou um grande avanço aos métodos virológicos utilizados no diagnóstico da dengue (GUBLER; SATHER, 1988). Três linhagens celulares são utilizadas basicamente para esta finalidade: clone C6/36 do mosquito *Aedes albopictus*, AP-61 do mosquito *Aedes pseudoscutellaris* e TRA-284 do mosquito *Toxorhynchites amboinensis* (VARMA *et al.*, 1974, IGARASHI, 1978; KUNO, 1982). Destas linhagens, o clone C6/36 (IGARASHI, 1978) tem sido o mais utilizado nas últimas décadas, pois demonstrou ser altamente sensível à infecção pelos DENV, além de apresentar fácil manutenção, já que pode ser mantido à temperatura ambiente (NOGUEIRA *et al.*, 1988; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1993). Entretanto a inoculação intratorácica em mosquitos e a inoculação intra cerebral em larvas continuam sendo as técnicas de isolamento mais sensíveis para os DENV (ROSEN; GUBLER, 1974; LAM *et al.*, 1986).

A presença viral pode ser detectada pelo efeito citopático (ECP) na monocamada celular, que se apresenta como formações de sincícios, ou pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), com a utilização de soros hiperimunes aos quatro sorotipos dos DENV. Para a identificação dos DENV, utilizam-se anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos (DENV 1 - 4) (GUBLER *et al.*, 1984).

1.9.2. Detecção do ácido nucléico viral

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 (MORITA *et al.*, 1991; LANCIOTTI *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1996; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; DE PAULA *et al.*, 2002). Esses protocolos têm sido úteis tanto para a clínica quanto para a vigilância virológica e são importantes por identificar o sorotipo infectante. Além disso, eles podem confirmar o diagnóstico em situações nas quais o material disponível não é adequado para o isolamento viral (MORITA *et al.*, 1991; LANCIOTTI *et al.*, 1992). Atualmente a RT-PCR em tempo real tem se revelado o método molecular mais sensível e apresenta a vantagem de ser quantitativo (LANCIOTTI, 2003; KUMAR *et al.*, 2008; DE ARAÚJO *et al.*, 2009).

1.9.3. Detecção de antígeno viral

1.9.3.1 Detecção de antígeno NS1

O diagnóstico laboratorial de casos suspeitos de dengue é baseado no isolamento viral em cultura de células de mosquito, detecção de RNA viral e anticorpos específicos para os DENV em soro ou plasma (HALSTEAD, 2007). Contudo, estudos têm demonstrado que o antígeno não estrutural 1 (Ag NS1) dos DENV, uma glicoproteína altamente conservada que é essencial para a viabilidade do vírus, produzida em forma associada à membrana ou secretada, é abundante no soro de pacientes que se encontram na fase aguda da doença (YOUNG *et al.*, 2000; LIBRATY *et al.*, 2002; ALCON *et al.*, 2002; DUSSART *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2006). Essa proteína tem sido útil para diagnosticar casos de dengue no início da doença e, recentemente, novos testes para detectar o Ag NS1 foram lançados, avaliados e considerados como uma ferramenta para somar aos ensaios diagnósticos já existentes (KUMARASAMY *et al.*, 2007a; 2007b; DUSSART *et al.*, 2008; BESSOF *et al.*, 2008; BLACKSELL *et al.*, 2008; CHUANSUMRIT *et al.*, 2008; LAPPHRA *et al.*, 2008; RAMIREZ *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2010).

Quando o ensaio de Ag NS1 é usado em conjunto com o MAC-ELISA aumenta significativamente o algoritmo do diagnóstico em uma única amostra de soro (DATTA; WATTAL, 2010; DUONG *et al.*, 2011). Apesar de terem sido padronizados para o uso em amostras de soro, três testes disponíveis no mercado foram utilizados em amostras de tecidos coletadas *postmortem*, mostrando que todos foram capazes de detectar o Ag NS1 nessas amostras, com sensibilidade variando de 34,7% a 91,3% (LIMA *et al.*, 2011). Os resultados do ELISA para Ag NS1 já foram considerados superiores ao isolamento viral e à RT-PCR para o diagnóstico de infecção aguda por DENV baseado em uma única amostra de soro, e sua positividade foi maior na dengue aguda primária do que na dengue aguda secundária (KUMARASAMY *et al.*, 2007). Além do ELISA encontra-se também à disposição no mercado o teste rápido baseado em imunocromatografia que tem mostrado resultados compatíveis com os encontrados com os ELISA (DUSSART *et al.*, 2008).

1.9.3.2 Imunohistoquímica

A utilização de métodos de IHQ permite a detecção de Ag virais em casos com evolução fatal, a partir de amostras de tecidos fixados em formalina (VORNDAM; KUNO, 1997). Esta técnica tem apresentado bons resultados, possibilitando inclusive análises retrospectivas com a identificação dos DENV em fragmentos obtidos há cerca de 10 anos (MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997).

1.9.4 Detecção de anticorpos da classe IgM

Vários testes comerciais para a detecção de Ac têm sido descritos para o diagnóstico de dengue (WU *et al.*, 1997; KUNO *et al.*, 1998; LAM; DEVINE, 1998; SANG *et al.*, 1998; VAUGHN *et al.*, 1999; LAM *et al.*, 2000).

O ensaio imunoenzimático de captura de Ac da classe IgM (MAC-ELISA) tem sido, nas últimas décadas, o método de eleição para o diagnóstico das infecções pelos DENV (KUNO *et al.*, 1987). 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. Além disso, a detecção de IgM em uma única amostra de soro indica infecção ativa ou recente, dispensando a obtenção de uma segunda amostra (LAM *et al.*, 1987). Entretanto, as provas pareadas são de grande valor diagnóstico, pois possibilitam a detecção de soro-conversão e a caracterização da resposta imune - primária ou secundária (VORNDAM; KUNO, 1997; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1999).

1.9.5 Detecção de anticorpos da classe IgG

Ensaio imunoenzimático de detecção de Ac da classe IgG (G-ELISA) (CHUNGUE *et al.*, 1989; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1999) vêm sendo cada vez mais utilizados para a caracterização da resposta imune de dengue, servindo como uma alternativa ao teste de inibição da hemaglutinação (IH) descrita por Clarke e Casals (1958), por ser uma metodologia rápida e de fácil execução. Os testes rápidos de imunocromatografia são um exemplo de praticidade na caracterização da resposta imune em primária ou secundária (LAM; DEVINE, 1998).

1.10. Prevenção e controle

O desenvolvimento de vacinas anti DENV iniciou-se na década de 40, mas apesar de inúmeros estudos, ainda não está disponível uma vacina preventiva eficaz (SABIN; SCHLESINGER, 1945; WHO, 2002). Entretanto, pela primeira vez, em 60 anos, os estudos de vacinas tetravalentes para dengue parecem promissores (EDELMAN, 2007).

A dificuldade na obtenção de uma vacina contra os DENV se deve a inúmeros fatores, dentre eles a existência de quatro sorotipos virais antígenicamente distintos com um risco resultante da competição entre as cepas vacinais, e a falta de um bom modelo animal que reproduza as formas clínicas da infecção, importante para os testes de fase pré-clínica da vacina (WHO, 2002; TEYSSOU, 2009).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para a obtenção de uma vacina capaz de gerar uma resposta elevada de anticorpos: atenuação viral através de passagens seriadas em cultura de células; utilização do 17D, da vacina de febre amarela, como vetor de expressão dos DENV ou ainda por outras técnicas de engenharia genética (GUZMÁN; KOURI, 2002; HALSTEAD; DEAN, 2002; SINGHASIVANON; JACOBSON, 2009; WEBSTER *et al.*, 2009; GUY *et al.*, 2010; 2011).

Atualmente, seis projetos se encontram em fase final de desenvolvimento, sendo quatro destes voltados para a produção de vacinas quiméricas, através da inserção de genes prM e E de DENV em vírus atenuados, e os outros dois voltados para a obtenção de vacinas atenuadas, através de passagens em cultura de células não-humanas (ALMOND *et al.*, 2002; HALSTEAD; DEAN, 2002; WHO, 2002). A descoberta por Halstead de que os DENV podem propagar-se em série em células primárias de rim de cão (PDK- *Primary Dog Kidney*) tem contribuído para avançar nos estudos de vacinas atenuadas (INNIS; ECKELS, 2003).

A preparação para os testes da vacina de dengue, bem como as estratégias de introdução da nova vacina, exigem uma vigilância baseada em laboratório a nível de coordenação internacional. O *Pediatric Dengue Vaccine Initiative* tem desenvolvido um consórcio internacional envolvendo campos de aplicação na América Latina e na Ásia, que tem apoiado os projetos de vacina de dengue que se encontram em fase final de desenvolvimento. O Brasil participa desses projetos através do Instituto Butantan e da Fundação Oswaldo Cruz (LETSON, 2009).

Uma vacina tetravalente deverá ser licenciada em breve, mas enquanto uma vacina eficaz não está disponível, as medidas de controle ao vetor consistem no principal instrumento para a prevenção da infecção pelos DENV. Há necessidade que a vigilância entomológica e as ações de combate vetorial sejam desenvolvidas, com metas estabelecidas de índice de infestação que não devem ser superiores a 1%, e a vigilância epidemiológica acompanhe os trabalhos do combate ao vetor analisando continuamente o impacto das ações que forem desenvolvidas sobre a população de mosquitos, confrontando com a incidência dos casos de dengue (BRASIL, 2002; 2011).

Quando as medidas de controle do vetor falham e a dengue encontra-se endêmica na área, o resultado é o aparecimento de novos casos da doença e o potencial desencadeamento de epidemias. Nesse momento o diagnóstico preciso é importante para orientar a vigilância epidemiológica e para reconhecer precocemente as formas graves da doença a fim de evitar complicações que possam levar ao óbito.

Observando a atual situação epidemiológica da dengue no estado, de hiperendemicidade, com cada vez mais apresentações não usuais da doença, se faz necessária a implementação do diagnóstico laboratorial específico. No Ceará foram reportados três casos de dengue com manifestações neurológicas, durante a maior epidemia ocorrida no estado, em 1994 (VASCONCELOS *et al.*, 1998b). Recentemente foram reportados dois casos de neurite óptica em pacientes com dengue (ARAGÃO *et al.*, 2010). Não se sabe a frequência que esses casos acontecem, uma forma de tentar melhorar esse diagnóstico seria a pesquisa de vírus, RNA viral, anticorpos e antígenos virais de dengue no LCR dos casos que apresentem manifestações neurológicas. Porém, para que esse procedimento faça parte da rotina, há necessidade de saber qual seria a positividade dessa pesquisa no material biológico em questão.

1.11 Perguntas de Partida

1) O teste de ELISA para detecção de Ag NS1 em amostra de soro é capaz de detectar o Ag NS1 de DENV no LCR?

2) Qual a positividade para DENV em LCR de pacientes que evoluíram para óbito com suspeita de doença infecciosa e em LCR de pacientes com suspeita de meningite viral em zona endêmica de dengue?

1.12 Hipóteses

1) O teste de ELISA para detecção do Ag NS1 em amostra de soro é capaz de detectar o Ag NS1 de DENV no LCR.

2) A realização de rotina do diagnóstico diferencial para DENV no LCR de pacientes que evoluíram para óbito com suspeita de doença infecciosa e de pacientes com suspeita de meningite viral determina a frequência de infecção do SNC, diagnosticando formas não usuais de dengue que apresentam manifestações neurológicas, em ambos os casos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar o diagnóstico laboratorial de dengue em amostras de LCR de pacientes com suspeita clínica de doença infecciosa que evoluíram para óbito e de pacientes com suspeita clínica de meningite viral.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Determinar se um teste utilizado para a pesquisa de Ag NS1 do DENV em amostra de soro é capaz de detectar este Ag no LCR;
- 2) Determinar a frequência de casos de dengue nos pacientes com evolução fatal encaminhados ao SVO sem diagnóstico;
- 3) Determinar a frequência do envolvimento do SNC nos casos de dengue com evolução fatal;
- 4) Determinar a frequência do diagnóstico diferencial para DENV no LCR de pacientes com suspeita de meningite viral, encaminhados do HSJ para esclarecimento diagnóstico no LACEN.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Características Gerais do Estudo

Este estudo é retrospectivo, transversal analítico, composto por uma parte experimental, onde amostras de LCR foram trabalhadas, e por coleta de dados. Os dados secundários dos pacientes foram assim obtidos: dos registros pertencentes ao arquivo do LACEN e do Núcleo de Epidemiologia da SESA-CE; das fichas de atendimento que acompanham as amostras de necrópsias encaminhadas pelo SVO; dos prontuários dos pacientes internados e fichas dos pacientes atendidos no ambulatório do HSJ. As informações coletadas foram transcritas para duas fichas: Análise de registros de prontuários de dengue de pacientes que evoluíram para óbito (Anexo I) e Análise de registro de prontuários de pacientes com suspeita de meningites virais (Anexo II). Os resultados laboratoriais dos testes realizados no LCR foram registrados nas duas fichas referidas (Anexos I e II) que serviram de base para compor o banco de dados da pesquisa.

3.1.1 Análise estatística

Para avaliar o desempenho dos testes para detecção de Ag NS1 foram utilizadas as medidas estatísticas de sensibilidade e especificidade, calculadas com intervalo de confiança (IC) de 95%.

As medidas de frequência, média, mediana, moda, o valor de p e o risco relativo (RR) foram calculados utilizando o programa Epi-Info de análises estatísticas.

3.1.2. Aspectos éticos

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas, através do protocolo 005/2009, onde foi aprovado sob o número CAAE: 0005.0.042.000-09 (Anexo III).

3.2. Etapas da Pesquisa

A pesquisa foi realizada em três etapas: 1) Avaliação do *kit* para detecção do Ag NS1 de DENV no LCR; 2) Diagnóstico laboratorial da dengue e determinação do envolvimento do SNC nos casos positivos dos pacientes com evolução fatal encaminhados do SVO; 3) Diagnóstico diferencial para dengue nos pacientes com suspeita clínica de meningite que foram atendidos no HSJ. Em todas as etapas do estudo foi considerado como critério de exclusão o LCR com aspecto sanguinolento.

3.2.1. Etapa I – Avaliação do *kit* para detecção do Ag NS1 de DENV no LCR

Para a pesquisa de Ag NS1 em amostras de LCR não havia referência na literatura revista. Houve então a necessidade de testar um *kit* comercial, desenvolvido para a pesquisa deste Ag no soro, para determinar a viabilidade do uso desta nova ferramenta de diagnóstico em amostras de LCR.

Com este propósito foram utilizadas 26 amostras de pacientes com diagnóstico laboratorial de dengue, e com o LCR positivo para dengue por outras metodologias, para testar a sensibilidade do *kit* em questão. Das 26 amostras, 24 pertenciam aos pacientes que faziam parte da segunda etapa do estudo; dois pacientes, que foram a óbito no ano de 2010, foram incluídos por apresentarem positividade para DENV-1 e este sorotipo não se encontrava representado na amostragem dos anos referentes ao estudo. Para avaliar a especificidade do *kit* foram utilizadas 60 amostras de LCR, negativas para dengue por outras metodologias, de pacientes com outros diagnósticos realizados no LACEN.

Para a detecção do Ag NS1 foi utilizado o teste Pan-E Dengue Early ELISA (NS1 Early) (Panbio Diagnostics, Brisbane, Austrália), por ter apresentado uma maior sensibilidade em um estudo piloto realizado com dois *kits* de ELISA testados, onde o outro utilizado foi o Platelia Dengue NS1 Ag da Bio-Rad (Dados não mostrados). O NS1 Early é um ELISA de microplaca em formato de sanduíche em duas etapas, para a detecção de Ag NS1 em amostra de soro. O teste utiliza Ac policlonal para a captura e Ac monoclonal para a detecção. O teste foi considerado positivo (presença de Ag NS1 detectável) quando a amostra apresentou um valor maior do que 11 unidades Panbio. Uma descrição detalhada da técnica encontra-se no item 3.3.

3.2.2. Etapa II - Diagnóstico laboratorial da dengue e determinação do envolvimento do SNC nos casos positivos dos pacientes com evolução fatal encaminhados do SVO

A etapa II foi composta por um grupo de 163 pacientes com evolução fatal, cujas amostras de LCR foram coletadas *post mortem*, nos anos de 2005 a 2008. Essas amostras foram oriundas do SVO do Ceará, selecionadas pelos médicos do serviço, a partir da suspeita clínica por ocasião da necrópsia. Todos eram suspeitos de doenças infecciosas, portanto, materiais biológicos foram coletados e enviados ao LACEN para esclarecimento diagnóstico.

A coleta não foi uniforme. Da maioria dos casos foram enviados LCR, sangue e fragmentos de vísceras, outros, LCR e vísceras, LCR e sangue ou apenas LCR. O material biológico ficou composto por:

- 93 amostras de LCR, sangue e fragmentos de vísceras;
- 26 amostras de LCR e fragmentos de vísceras;
- 15 amostras de LCR e sangue;
- 29 amostras de LCR.

A pesquisa utilizou como material biológico as 163 amostras de LCR. Os outros materiais biológicos já haviam sido trabalhados nos exames de rotina realizados pelo LACEN e IEC. Os resultados dos exames laboratoriais e necrópsia foram obtidos dos registros pertencentes ao arquivo do LACEN e ao Núcleo de Epidemiologia da SESA-CE e das fichas de atendimento das necrópsias encaminhadas do SVO. As amostras de LCR foram coletadas por punção suboccipital e encaminhadas ao LACEN, onde foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Essas amostras de LCR foram processadas para o diagnóstico de dengue através de técnicas para detecção de vírus, isolamento viral em culturas de células; de genoma viral, RT-PCR; de Ag viral, detecção de Ag NS1; detecção de Ac das classes IgM e IgG, que se encontram detalhadas no item denominado técnicas utilizadas. Para a coleta dos dados foi utilizado um formulário conforme modelo do anexo I.

A dengue já havia sido diagnosticada em outros materiais biológicos em alguns pacientes, entretanto, a pesquisa de DENV no LCR foi realizada em todos os pacientes para caracterizar comprometimento da doença no SNC e determinar o valor diagnóstico nesse espécime clínico.

Para o diagnóstico laboratorial de dengue foram utilizados os seguintes critérios para a classificação dos casos: o indivíduo com isolamento viral e/ou RT-PCR e/ou ELISA Ag NS1 e/ou Ac IgM positivo para dengue no sangue e/ou LCR, e/ou IHQ positiva para DENV em fragmento de fígado positivo foi considerado como infecção atual ou recente por DENV; o indivíduo com isolamento viral e/ou RT-PCR e/ou ELISA Ag NS1 e/ou Ac IgM positivo para DENV no LCR foi

considerado como infecção atual ou recente do SNC por DENV. A utilização do *kit* “Dengue duo cassette” da Panbio possibilitou a distinção da infecção primária e secundária: indivíduos positivos para dengue e ausência de Ac da classe IgG na amostra de soro foram classificados como apresentando resposta primária; naqueles casos em que o IgG foi positivo, a infecção foi classificada como secundária ou seqüencial.

Para os casos classificados como portadores de um diagnóstico de doença neurológica, foram adotados critérios em que se considerou a presença de pelo menos um sinal ou sintoma sugestivo de envolvimento do SNC, ou ainda, a presença de dois ou mais sinais ou sintomas gerais, mas que manifestasse de alguma forma, um grau de disfunção cerebral. Nos casos em que a história clínica colhida apresentou-se carente nas informações dos sintomas evolutivos, o laudo histopatológico foi conclusivo para a classificação do comprometimento do SNC. Os exames positivos no LCR foram considerados confirmatórios para o envolvimento do SNC: foram classificados como encefalite os casos em que os sinais ou sintomas apresentados traduziam disfunção do SNC encefálico; sinais e/ou sintomas representativos de irritação meníngea caracterizaram a meningite; os casos com presença de sinais ou sintomas de origem encefálica e meníngea e/ou associados a alterações anatomopatológicas foram consideradas meningoencefalites.

3.2.3. Etapa III - Diagnóstico diferencial para dengue nos pacientes com suspeita clínica de meningite que foram atendidos no HSJ

A etapa III foi composta por um grupo de 183 de pacientes, que foi atendido no HSJ no ano de 2008, e cuja suspeita clínica foi de meningite. Essas 183 amostras de LCR foram encaminhadas ao LACEN-CE para a pesquisa de bactérias e fungos, onde foram submetidas a uma seleção por número de células/mm³ e presença dos agentes etiológicos acima citados. Como critérios de inclusão foram utilizados os LCR com pesquisa bacteriana e fúngica negativa e a celularidade inferior a 500 células/mm³ (SÃO PAULO, 2006). Os dados foram coletados dos prontuários e fichas dos pacientes obtidos do Serviço de Atendimento Médico Especializado (SAME) no referido hospital e foram transcritos no anexo II.

As amostras de LCR foram encaminhadas ao LACEN-CE sob refrigeração. Após serem utilizadas nos setores de bacteriologia e micologia, foram encaminhadas ao setor de virologia e estocadas a -80°C até o momento do uso.

Essas amostras de LCR foram processadas para o diagnóstico de dengue através de técnicas para detecção de vírus, isolamento viral em culturas de células; de genoma viral, RT-PCR; de Ag viral, detecção do Ag NS1; detecção de Ac da classe IgM, que se encontram detalhadas no item 3.3. Os sinais e/ou sintomas representativos de irritação meníngea com alterações na citologia e /ou

bioquímica do líquido e os exames positivos para DENV no LCR caracterizaram a meningite viral por DENV.

3.3. Técnicas Utilizadas

3.3.1. Pesquisa do vírus

Culturas de células do mosquito *Aedes albopictus* clone C6/36 (IGARASHI, 1978) foram utilizadas como sistema para isolamento de vírus.

As células foram cultivadas em tubos de 1,5 x 16 cm contendo 1,0 mL de meio Leibovitz (L-15) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), com 5% de soro fetal bovino (SFB) (meio de crescimento) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) por 24 a 48 horas. Após a formação de monocamada, 1,0 mL do meio de manutenção (L-15) foi acrescentado ao tubo.

Foram inoculados 100µL de LCR na monocamada celular. Para cada grupo inoculado, foi incluído um controle de células (controle negativo). Após inoculação, os tubos foram incubados à temperatura ambiente de aproximadamente 28°C, e observados diariamente, por um período de até quatorze dias, em microscópio óptico invertido (Zeiss - Deutschland, Germany), com aumento de até 400 vezes, para observação do ECP.

3.3.1.1 Detecção e identificação viral

As culturas foram testadas com fluido hiperimune de camundongo para dengue (produzido e gentilmente cedido pelo IEC) pela técnica de IFI, sendo as reações negativas consideradas como isolamento negativo.

As culturas que apresentaram reação positiva pela imunofluorescência foram processadas pela técnica de IFI para a tipagem viral, empregando-se anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos dos DENV produzidos por Bio Manguinhos e titulados no IEC (GUBLER *et al.*, 1984).

Após agitação, os tubos de células inoculados foram submetidos à centrifugação a 1.400 rpm por dez minutos para a sedimentação. Aproximadamente 1 mL do fluido de cada tubo de cultura foi retirado e as células foram ressuspensas no meio restante.

Para a detecção viral, 25 µL de suspensão celular de cada tubo foi depositada sobre um dos 10 círculos existentes nas lâminas de 26 x 76 mm (Biolab Merieux, New Zealand). Após secagem à temperatura ambiente, as células foram fixadas com acetona P.A. (Merck, Darmstadt, Germany)

gelada durante quinze minutos em geladeira. Controles de células infectadas e não infectadas foram incluídos em cada grupo de lâminas processadas.

Após secagem à temperatura ambiente, foi adicionado em cada círculo da lâmina 25µL de um fluido ascítico hiperimune de camundongo, do inglês *mouse immune ascitic fluid* (MIAF), diluído 1:100 em tampão fosfato (PBS) pH 7,4. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,4 por 10 minutos e deixadas à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram adicionados 25µL de IgG de cabra anti-camundongo conjugado com fluoresceína (Antibodies Incorporated, USA.), diluído 1:40 em PBS pH 7,4 e incubadas em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos. Após duas lavagens em PBS pH 7,4 por 10 minutos, as lâminas foram rinsadas com água destilada, colocadas à temperatura ambiente para secagem e montadas com glicerina tamponada e lamínulas (24 x 60 mm) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

No caso da técnica de IFI para a tipagem viral, foi preparada uma lâmina para cada amostra, depositando cerca de 25µL de suspensão celular em 5 círculos. As lâminas foram colocadas à temperatura ambiente para secagem e fixadas com acetona gelada durante quinze minutos, na geladeira.

Em cada círculo, foram adicionados 25 µL de anticorpos monoclonais específicos para os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, diluídos 1:40 em PBS pH 7,4. Para cada lâmina, foi incluído um círculo para reação com o soro policlonal (MIAF diluído 1:100 em PBS pH 7,4). Controles de células foram incluídos a cada batelada de soros inoculados.

Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,4 por 10 minutos e colocadas à temperatura ambiente para secagem. A seguir, foram adicionados 25 µL de IgG de cabra anti-camundongo conjugado com fluoresceína diluída 1:40 em PBS pH 7,4. Após incubação em câmara úmida a 37 °C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,4 por dez minutos, rinsadas em água destilada, secas à temperatura ambiente e montadas com glicerina tamponada e lamínulas (24 x 50 mm).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico de epifluorescência (Olympus Model-U-ULH, Japan), com aumento de 400 vezes, equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão HBO 50 W e jogo de filtro convencional (FT 510 / LP 520).

3.3.2. Detecção do genoma viral

A detecção do genoma viral foi realizada através da extração do RNA viral seguida da técnica da RT-PCR em duas etapas de amplificação (LANCIOTTI *et al.*, 1992).

3.3.2.1 Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído do LCR através do *kit* comercial QIAmp Viral Minikit (QUIAGEM, Inc., Valência, USA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (NOGUEIRA *et al*, 2005; DOMINGUES *et al*, 2008; KUMAR *et al*, 2008).

Uma alíquota de 140µL do material clínico foi adicionada a um tubo eppendorf com 560µL do tampão AVL (isotiocianato de guanidina). Seguiu-se a homogeneização em vórtex por 15 segundos e incubação por dez minutos em temperatura ambiente (15-25°C). Foram adicionados 560µL de etanol a 100% ao tubo, seguindo-se homogeneização em vórtex por 15 segundos. Uma alíquota de 630µL foi transferida do tubo para a QIAmp mini coluna, em seguida centrifugada a 8000 rpm por um minuto até que toda solução fosse filtrada. O tubo com filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo. À coluna foram adicionados 500µL do tampão AW1 (cloridrato de guanidina) seguindo-se de centrifugação a 8000 rpm por um minuto. Novamente o tubo contendo o filtrado era descartado e coluna transferida para um novo tubo. À coluna foram adicionados 500µL do tampão AW2 (tampão de lavagem), com centrifugação a 12000rpm durante três minutos. A QIAmp mini coluna foi transferida para um tubo de 1,5mL para eluir o RNA com 60µL do tampão AVE (água livre de RNase com 0,04% de azida de sódio) . O RNA extraído foi armazenado em freezer a -80°C até o momento do uso.

3.3.2.2 RT-PCR

A metodologia descrita por Lanciotti e colaboradores (1992) foi utilizada para detecção e tipagem dos DENV em amostras de LCR. Esse protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento *semi-nested*, gerando produtos amplificados com tamanhos específicos em pares de base para cada sorotipo dos DENV. A RT-PCR constituiu-se em uma reação de duas etapas, onde na primeira foi realizada uma transcrição reversa (RT) seguida de uma reação pela polimerase em cadeia (PCR) que utilizou os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) D1 e D2 juntamente com as enzimas *transcriptase reversa* (Cloned Reverse Transcriptase - Invitrogen) e Taq polimerase (Taq DNA Polymerase Recombinant - Invitrogen) para a síntese e amplificação do cDNA viral.

O material foi amplificado a partir de uma etapa a 42°C durante 60 minutos seguidos de 30 ciclos a 94°C por 35 segundos para a desnaturação das fitas, 55°C por um minuto para a hibridização, 72°C por dois minutos para a extensão e uma etapa final de 72°C por 10 minutos para completar a extensão final das fitas formadas. O produto da amplificação foi utilizado para a realização da *semi-nested* PCR.

3.3.2.3 Segunda etapa de amplificação: Semi-nested PCR para tipagem dos vírus dengue.

Para a realização desta etapa, os produtos obtidos na etapa anterior foram diluídos 1:100 em água deionizada (PROMEGA, Madison, USA) (5 µL produto: 495 µL água). O *primer* D1 foi utilizado juntamente com os *primers* TS1, TS2, TS3 e TS4 para a caracterização dos sorotipos virais. Foram adicionados 45 µL da mistura para o semi-nested PCR e 5 µL da amostra diluída (figura 17). As amostras foram então submetidas a 18 ciclos de desnaturação (94 °C/30 segundos), hibridização (55 °C/1 minuto), extensão (72 °C/2 minutos) e extensão final (72 °C/10 minutos).

A cada 10 µL de produto amplificado, foram acrescentados 2 µL de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) e a seguir foi submetido à eletroforese (100V) em gel de agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) a 1,0% em Tris-Ácido Bórico-EDTA, do inglês *Tris-Boric acid-EDTA* (TBE) 0,5 X, acrescido de brometo de etídio 0,1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) durante aproximadamente 45 minutos, para análise dos produtos amplificados (*amplicons*) obtidos.

A descrição dos *primers* utilizados nas duas etapas está representada no quadro 03.

QUADRO 03: Relação dos *primers* utilizados para reação de RT – PCR e semi-nested – PCR

Sentido do <i>primer</i>	Sequência	Posição no genoma	Tamanho do <i>amplicon</i> (em pares de base -pb)
D1 (+)	5'-TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3'	134-161	511
D2 (-)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC- 3'	616-644	511
TS1 (-)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3'	568-586	482(D1 + TS1)
TS2 (-)	5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'	232-252	119(D1 + TS2)
TS3 (-)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3'	400-421	290(D1 + TS3)
TS4 (-)	5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	506-527	392(D1 + TS4)

Fonte: Lanciotti *et al.*, 1992.

3.3.3. Detecção de Antígeno Viral

Para a detecção do Ag NS1 foi utilizado o teste Pan-E Dengue Early ELISA (NS1 Early) (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia). O procedimento seguiu as recomendações do fabricante. Entretanto, a diluição foi de 1:2, semelhante à utilizada por Soares e colaboradores (2006) para a detecção de anticorpos IgM no LCR.

Inicialmente, foram distribuídos 50 uL do diluente, contido no *kit*, nos micropoços correspondentes às amostras e acrescentados 50 uL do LCR a cada um deles. A densidade óptica (DO) foi determinada a 450/620nm e foi proporcional à quantidade de Ag NS1 presente na amostra testada. Para o cálculo do valor de corte da reação multiplicou-se a absorvância média do calibrador pelo fator de calibração (específico do lote). Calculou-se o valor de índice e multiplicou-se por 10. Para a interpretação dos resultados, considerou-se <9 Unidades Panbio (UPb) como negativo, de 9 a 11 duvidoso ou inconclusivo e >11 UPb positivo, sendo indicativo de uma infecção primária ou secundária pelo DENV, conforme orientações do manual de instruções que acompanha o *kit*. As amostras duvidosas foram repetidas e se continuaram inconclusivas, foram consideradas como negativas.

3.3.4 Pesquisa de anticorpos

3.3.4.1 Detecção de anticorpos da classe IgM

Para a detecção de Ac da classe IgM foi utilizado o “Teste de captura ELISA – IgM de dengue” da marca Panbio Diagnóstica, conforme as especificações do fabricante, somente a diluição da amostra foi diferente, 1:2. Em resumo, Ac da classe IgM, quando presentes no LCR, se ligam aos anticorpos anti-IgM humana incorporados na superfície da microplaca. Uma mistura de antígenos de dengue e Ac monoclonal, conjugado a uma peroxidase, é adicionada à reação. Para a revelação é adicionado um sistema de substrato incolor, tetrametilbenzina/peróxido de hidrogênio. O substrato é hidrolizado pela enzima e o cromogênio muda para cor azul. A reação é interrompida com adição de ácido, tornando a cor amarela. O desenvolvimento da cor é indicativo da presença de Ac da classe IgM anti-dengue na amostra analisada. A absorvância é lida a um comprimento de onda de 450nm com um filtro de referência de 600 a 650nm (SOARES *et al*, 2006, 2008).

3.3.4.2. Detecção de anticorpos da classe IgG

O Panbio Dengue Duo Cassete foi utilizado nas amostras positivas para dengue, a fim de caracterizar a resposta imune à infecção, através da detecção de Ac da classe IgG, conforme especificação do fabricante. Nesse ensaio, a detecção de anticorpos da classe IgM e IgG são determinadas simultaneamente, utilizando uma única adição da amostra. A infecção secundária é caracterizada por níveis de Ac IgG elevados que podem ser ou não acompanhados por níveis elevados de Ac IgM. A sensibilidade deste teste foi programada de modo que nos pacientes com dengue primário, a detecção de Ac da classe IgM é positiva enquanto a detecção de Ac da classe IgG é

negativa. Nas infecções secundárias os pacientes terão um resultado de Ac da classe IgG positivo acompanhado ou não de Ac IgM positivo, segundo consta no manual do fabricante, que acompanha o *kit* (LAM; DEVINE, 1998 ; KIDWAI *et al.*, 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Etapa I – Avaliação do *kit* para detecção do Ag NS1 de DENV no LCR

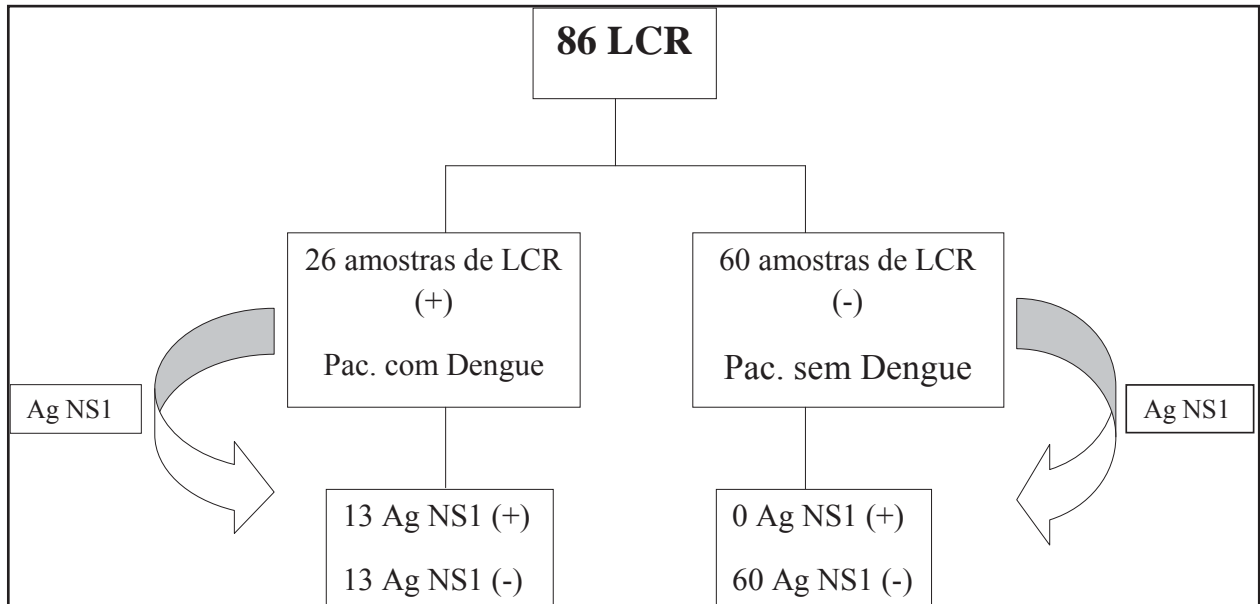


Figura 14: Fluxograma da avaliação do *kit* para detecção do Ag NS1 de DENV no LCR.

Com o objetivo de determinar se um *kit* comercial de ELISA desenvolvido para detectar o Ag NS1 de DENV no soro seria capaz de detectar este antígeno no LCR, 26 amostras de dengue positivas no LCR por outras metodologias foram utilizadas. O NS1 Early foi capaz de detectar o Ag NS1 no LCR de 13 das 26 amostras de dengue positivas. Para verificar a especificidade do *kit* em questão, 60 amostras de LCR de pacientes com outros diagnósticos: infecção pelo HIV, leptospirose, leishmaniose visceral, pneumonia, meningite fúngica, meningite meningocócica e outras meningites bacterianas foram testadas para Ag NS1 (Figura 14). Duas amostras cujos resultados foram duvidosos foram re-testadas, continuaram indeterminadas e foram então consideradas como negativas. Os resultados da sensibilidade, especificidade, calculados com intervalo de confiança de 95%, podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1 - Acurácia diagnóstica para o *kit* de detecção de Ag NS1 por ELISA em amostras de LCR.

Diagnóstico	Positivo	Negativo	Total
Dengue	13	13	26
Não Dengue	0	60	60
Total	13	73	86
Sensibilidade	50% (95% IC- 29.9 -70.1)		
Especificidade	100% (95% IC-94.0 - 100)		

Intervalo de Confiança (IC)

O percentual de detecção do teste NS1 Early no LCR de pacientes com diagnóstico laboratorial de dengue de acordo com a metodologia de detecção de Ac IgM encontra-se na tabela 2. O percentual de detecção combinada de AC IgM e Ag NS1 foi de 92,3 %, como pode ser visto na tabela 3.

Tabela 2 - Percentual da detecção do Ag NS1 de acordo com a presença do Ac IgM em 26 amostras de LCR em casos com evolução fatal.

Ag NS1	Presença de IgM	Ausência de IgM	Total
NS1 (+)	9	4	13
NS1 (-)	10	3	13
Total	19	7	26
Detecção (%)	9/26 (34.6)	4/26 (15.4)	13/26 (50)

Legenda (Ag NS1): Antígeno NS1; (IgM): Anticorpos da classe IgM; (NS1+): NS1 positivo; (NS1): NS1 negativo.

Tabela 3 – Percentual da detecção individual e em conjunto de Ac IgM e Ag NS1 em 26 amostras de LCR em casos com evolução fatal.

Teste	Positivo	Negativo	Detecção (%)
Ac IgM	19	7	73.1
Ag NS1	13	13	50
Ac IgM + Ag NS1	24	2	92.3

Legenda (NS1): Antígeno NS1; (IgM): Anticorpos da classe IgM; (Ac IgM + Ag NS1): Detecção combinada de Ac da classe IgM e Ag NS1.

Após os testes com o *kit* de detecção do antígeno viral NS1 no LCR, que apresentou uma sensibilidade de 50% (IC 29,9-70,1) e especificidade de 100% (IC 94,0-100), as amostras restantes foram então processadas para a pesquisa desse antígeno viral, pelo referido *kit*, nos outros dois grupos que fizeram parte da pesquisa. A figura 15 representa o teste NS1 Early realizado nas amostras de LCR.

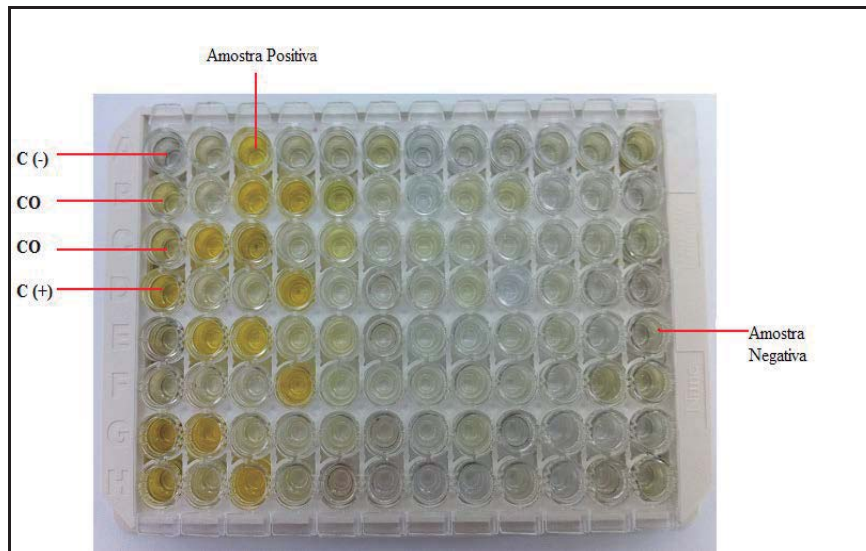


Figura 15 – Teste de ELISA Pan E Dengue Early realizado em 86 amostras de LCR, 26 amostras positivas e 60 negativas para DENV.

Legenda: C (-): Controle negativo, C (+): Controle positivo, CO: Cut-off. A coloração amarela indica uma amostra positiva.

4.2. Etapa II - Diagnóstico laboratorial da dengue e determinação do envolvimento do SNC nos casos positivos dos pacientes com evolução fatal encaminhados do SVO

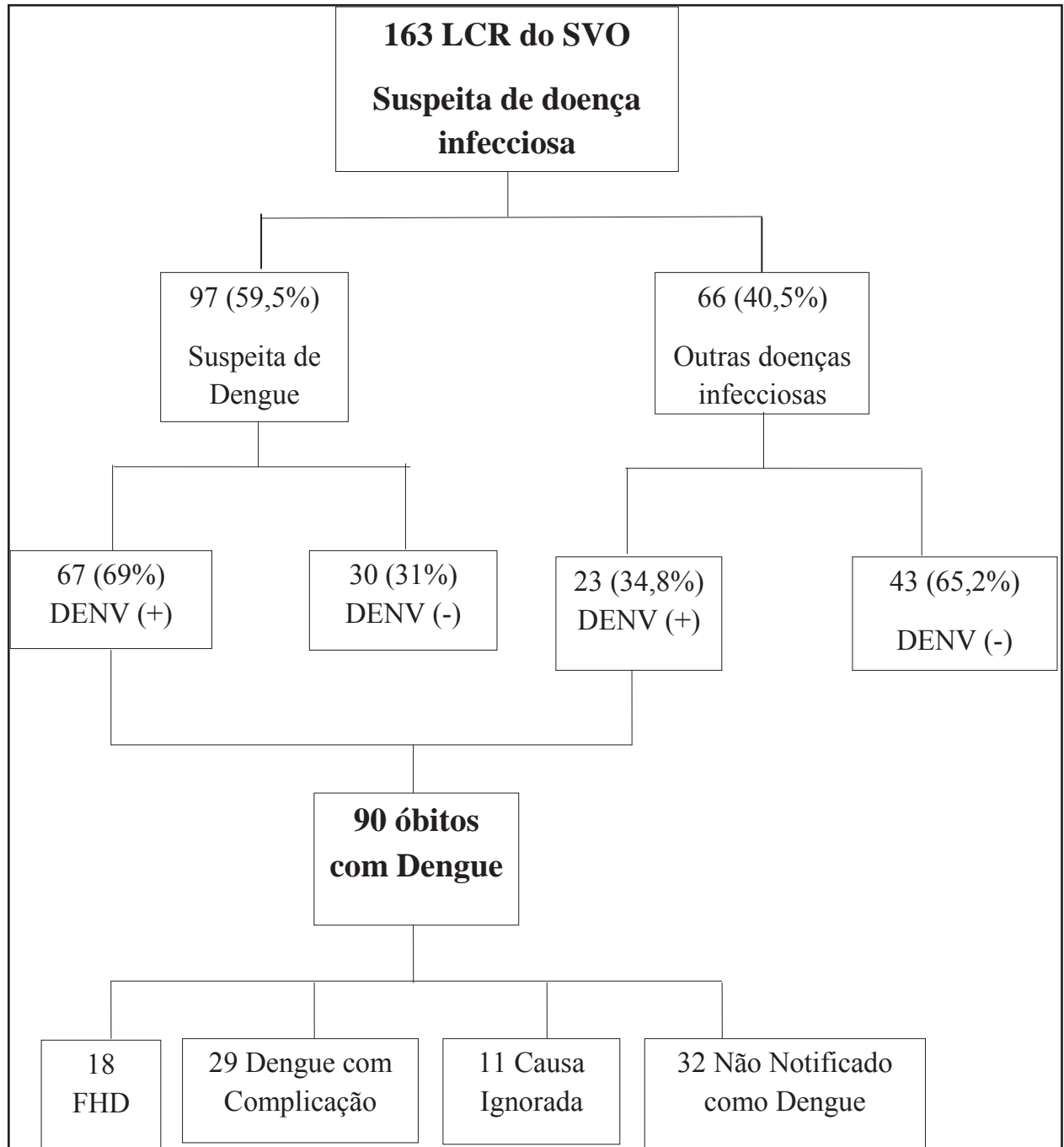


Figura 16: Fluxograma dos 163 óbitos analisados com suspeita de doença infecciosa.

4.2.1 Epidemiologia

O segundo grupo do estudo foi composto por 163 pacientes que evoluíram para óbito e, cujas amostras de LCR foram encaminhadas do SVO-CE. Dessas amostras, 65 já haviam sido positivas para dengue em sangue e/ou vísceras, analisados no LACEN-CE e IEC. Desses 163 pacientes, em 97 (59,5%) suspeitava-se de dengue e em 66 (40,5%) suspeitava-se de outras doenças infecciosas. Dos 97 suspeitos de dengue, 67(69,0%) foram confirmatórios e dos 66 suspeitos de outras doenças infecciosas, 23 (34,8%) foram positivos para dengue. Dos 90 casos de dengue que evoluíram para óbito, 18 haviam sido classificados como FHD; 29, como dengue com complicação ou dengue grave; ficando 11, como óbito por causa ignorada e 32 não foram identificados no banco de dados da SESA, uma vez que, destes, em 23 a hipótese diagnóstica não havia sido de dengue (Figura 16). A tabela 4 representa os casos de suspeita de dengue segundo a hipótese diagnóstica por ocasião da realização da necrópsia.

Tabela 4 – Positividade para dengue nos óbitos segundo a hipótese da necrópsia, no Ceará de 2005 a 2008.

Hipótese diagnóstica	D+ (%)	D- (%)	Total (%)
Dengue	67(41,1)	30 (18,4)	97 (59,5)
Outras doenças infecciosas	23 (14,1)	43 (26,4)	66 (40,5)
Total	90(55,2)	73 (44,8)	163 (100)

Legenda: (D+) Dengue positivo, (D-) Dengue negativo

Dos 163 pacientes submetidos ao diagnóstico de dengue, 90 (55,2%) tiveram pelo menos um resultado de exame positivo. Entre os pacientes positivos, 52 (57,8%) foram do sexo masculino e 38 (42,2%) do feminino. A idade média foi de 33 anos variando de menos de dois meses a 86 anos, com mediana de 32 e moda de um ano. Os pacientes procediam de 27 municípios do Estado do Ceará e um do Rio Grande do Norte. O município de Fortaleza foi responsável por 45 (50,0%) dos casos e em segundo lugar foi Caucaia com seis (6,6%). Em 66 (73,3%) pacientes com registro, o número médio de dias entre o início da doença e o óbito foi de cinco dias, variando de um a 14. O tempo médio entre o óbito e a chegada do material ao laboratório foi de um dia.

A hipótese diagnóstica de dengue esteve presente em 97/163 (59,5%) dos casos, sendo 48 (29,4%) de dengue como hipótese única e 49 (30,1%) com outras hipóteses, onde dengue ou

leptospirose foi a hipótese diagnóstica conjunta mais freqüente, seguida por dengue ou meningite. Esses dados podem ser vistos na tabela 5.

Tabela 5. Positividade segundo a hipótese diagnóstica de dengue no momento da realização da necropsia no Serviço de Verificação de Óbitos do Ceará (2005 a 2008).

Hipótese diagnóstica	D+ (%)	D- (%)	Total (%)
Dengue	31(32,0)	17(17,5)	48(49,5)
Dengue ou leptospirose	17(17,5)	04(4,1)	21(21,6)
Dengue ou meningite	09(9,3)	06(6,2)	15(15,5)
Dengue ou sepsis	04(4,1)	03(3,1)	07(7,2)
Dengue ou calazar	02(2,1)	00(0,0)	02(2,1)
Dengue ou broncopneumonia	01(1,0)	00(0,0)	01(1,0)
Dengue ou encefalite	01(1,0)	00(0,0)	01(1,0)
Dengue ou AIDS	01(1,0)	00(0,0)	01(1,0)
Dengue ou hepatite	00(0,0)	01(1,0)	01(1,0)
Total	66 (68,0)	31 (32,0)	97 (100)

Legenda: (D+) Dengue Positivo; (D-) Dengue Negativo

A hipótese diagnóstica mais freqüente nos casos não suspeitos de dengue foi a de meningite, com 41 casos. Destes, 10 apresentaram cultura bacteriana positiva no LCR. Os microrganismos isolados foram: *Klebsiella pneumoniae* (três); *Streptococcus pneumoniae* (três); *Streptococcus* sp. (um); *Staphylococcus aureus* (um); *Enterococcus* sp. (dois). Dentre os casos com infecção bacteriana citados acima, cinco apresentaram positividade também para DENV. A segunda hipótese diagnóstica mais freqüente foi a de leptospirose com seis casos, dos quais dois foram positivos para DENV e um para leptospirose. Cinco casos sem hipótese diagnóstica também foram incluídos como suspeitos de doença infecciosa por ocasião da necrópsia, sendo que, destes, dois foram positivos para DENV. A tabela 6 representa as patologias que fizeram parte dos casos não suspeitos de dengue.

4.2.2. Achados Laboratoriais

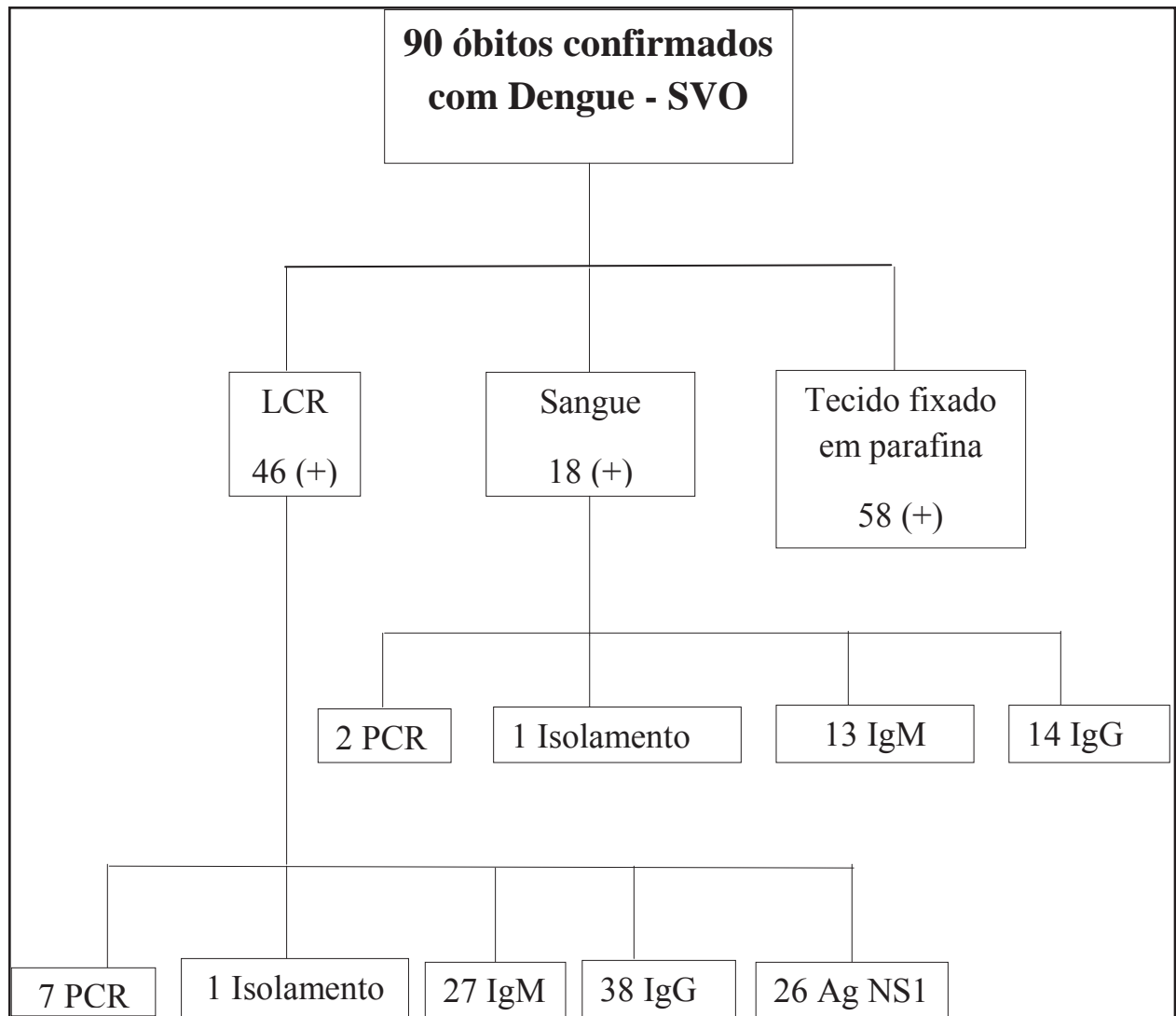


Figura 18: Fluxogramas dos resultados laboratoriais dos 90 óbitos com dengue.

Os materiais clínicos utilizados para detecção dos 90 casos de dengue foram: LCR, sangue e tecido fixado na parafina. O LCR apresentou 46 resultados positivos para DENV, o sangue, 18 e os tecidos fixados na parafina, 58. Os métodos diagnósticos utilizados para a análise desses materiais foram: o isolamento viral, a RT-PCR, a pesquisa de Ac das classes IgM e IgG, pesquisa de Ag NS1 e IHQ. A positividade do material clínico analisado em cada método de diagnóstico empregado encontra-se representado na tabela 7. A eletroforese em gel de agarose com os resultados obtidos na RT-PCR está representada na figura 19. A placa de ELISA representando os resultados de detecção de Ag NS1 no LCR pode ser vista na figura 20.

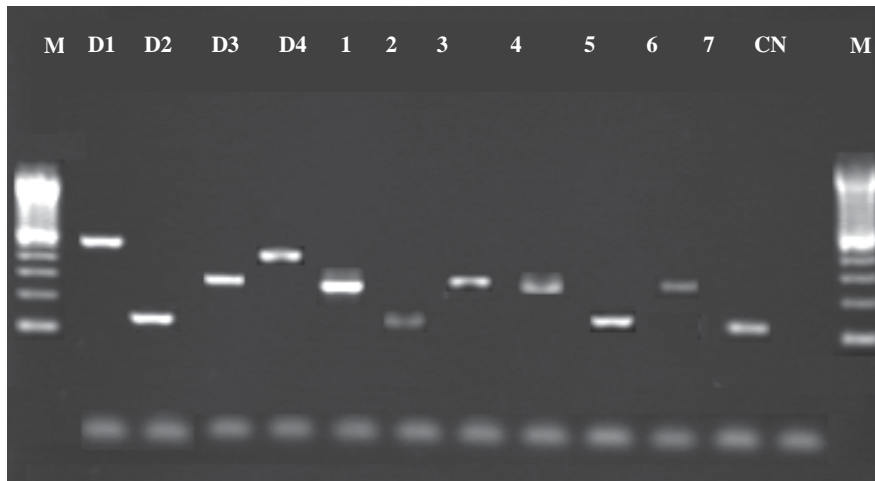


Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose dos resultados obtidos de RT-PCR em LCR

Legenda: (M) Marcador de peso molecular; (D1, D2, D3,D4) Controle positivo dos quatro sorotipos virais de dengue; (1-7) LCR de pacientes; (CN) Controle negativo.

Tabela 07. Diagnóstico laboratorial de dengue em óbitos segundo as amostras clínicas disponíveis, Ceará de 2005 a 2008.

Espécime clínico	RT-PCR Pos/Est (%)	Isolamento		IgM Pos/Est (%)	IgG Pos/Est (%)	AgNS1 Pos/Est (%)	IHQ Pos/Est (%)
		Viral Pos/Est (%)	Sorotipo detectado				
LCR	7 / 90 (7,8)	1 / 90 (1,1)	3 DENV-2 4 DENV-3	27 / 90 (30,8)	38/90 (42,2)	26/90 (28,9)	-
Soro/sangue	2 / 30 (6,7)	1 / 90 (1,1)	2 DENV-3	13 / 30 (43,3)	14 / 30 (46,6)	.	.
Tecido fixado na parafina	58 / 90 (64,4)
Total	9 / 120 (7,5)	2 / 180 (2,2)	3 DENV 2 6 DENV 3	40 / 120 (33,3)	52/ 120 (43,3)	26 / 90 (28,9)	58 / 90 (64,4)

Legenda: (RT/PCR) Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase; (Pos) Positivo; (Est) Estudado; (.) Não realizado; (IgM) Imunoglobulina M; (IgG) Imunoglobulina G; (IHQ) Imunohistoquímica; (AgNS1) Ag NS1.

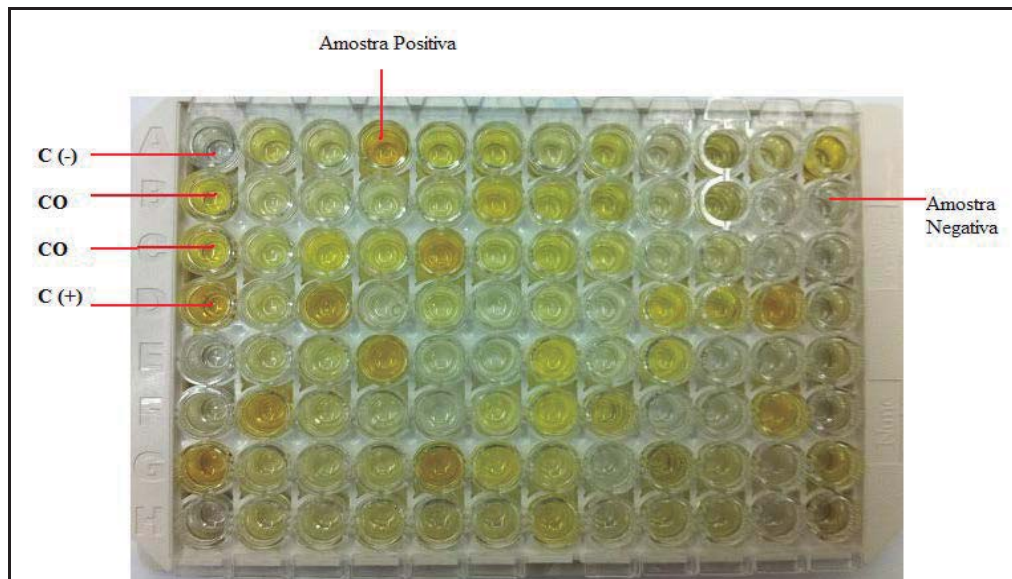


Figura 20 - Placa de ELISA representando os resultados de detecção de Ag NS1– Pan Bio no LCR. Legenda: C(-): Controle negativo; C (+): Controle positivo; CO: Cut-off . A coloração amarela indica um teste positivo.

A detecção de Ac IgG nas amostras de soro, dos óbitos com dengue, caracterizou a resposta imune à infecção. Os resultados foram: 14 (43,6%) de resposta secundária e 16 (53,4%) de resposta primária nas amostras de soro, como podem ser observados na tabela 8. Todos os 30 resultados de detecção de Ac da classe IgG no soro foram iguais aos resultados no LCR para os mesmos pacientes. Ao todo foram 38 (42,2%) resultados positivos, e 52 (57,8%) resultados negativos nas amostras de LCR; A figura 21 representa os testes de imunocromatografia para detecção dos Ac IgM e IgG no LCR. A figura 22 representa uma placa de ELISA para captura de Ac IgM para dengue (MAC-ELISA).

Tabela 8: Investigação da resposta imune em soro de 30 casos de óbitos com dengue dos anos de 2005 a 2008 no Ceará

Resposta Imune	Primária IgG - (%)	Secundária IgG + (%)	Total (%)
Pac. LCR +	8 (26,7)	12 (40,0)	20 (66,7)
Pac. LCR -	8 (26,7)	2 (6,7)	10 (33,3)
Total (%)	16 (53,4)	14 (46,6)	30 (100)

Legenda: (Pac. LCR +) Pacientes com LCR positivo para dengue; (Pac. LCR -) Paciente com LCR negativo para dengue.

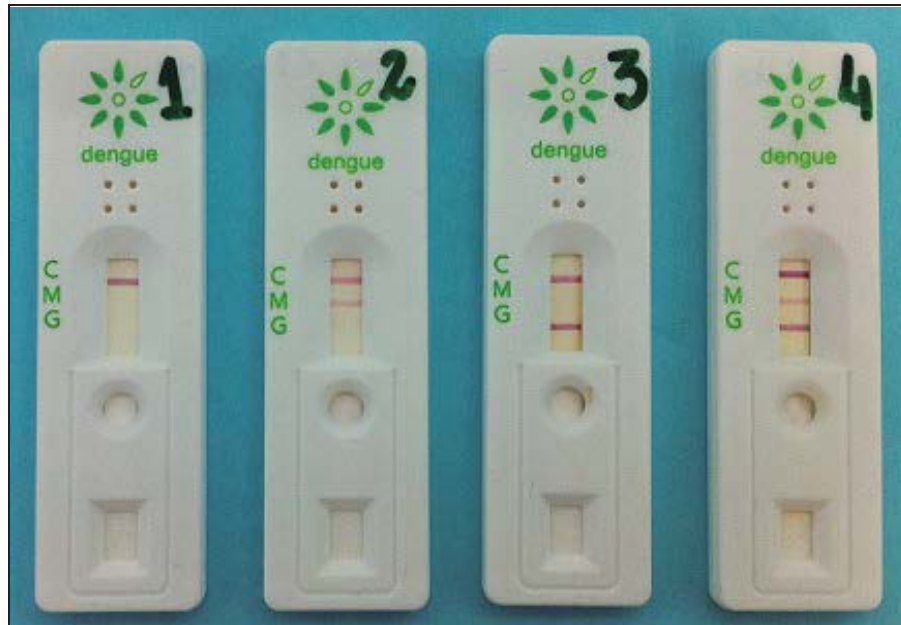


Figura 21 – Teste de imunocromatografia para detecção de anticorpos IgM e IgG – Pan Bio para dengue em amostras de LCR.

Legenda: 1-LCR negativo; 2-LCR positivo para IgM; 3-LCR positivo para IgG; 4-LCR positivo para IgM e IgG.

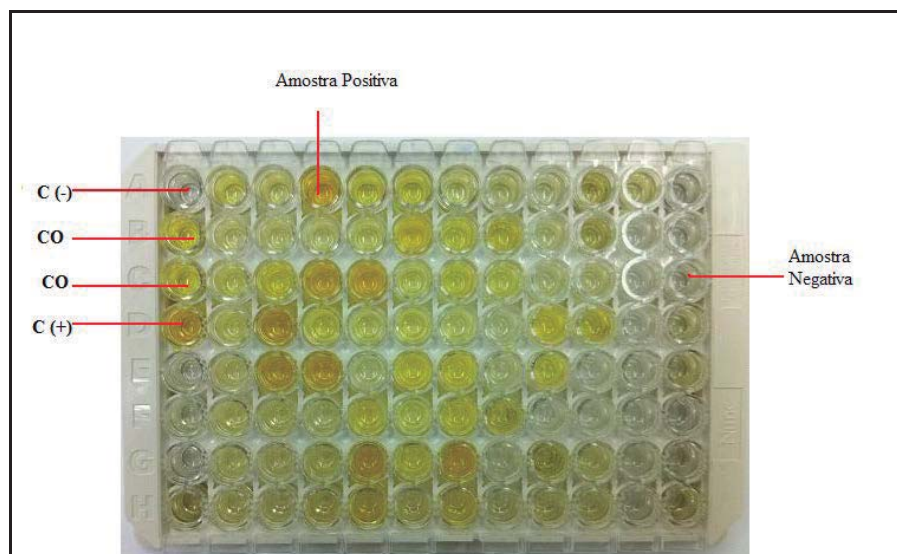


Figura 22 - Placa de ELISA para captura de Ac IgM – Pan Bio para dengue no LCR.

Legenda: C(-): Controle negativo; C (+): Controle positivo; CO: Cut-off. . A coloração amarela indica um teste positivo.

A investigação dos óbitos pelo SVO incluiu, além da macroscopia, a coleta de segmentos de vísceras para pesquisar a presença do DENV e realizar a análise histopatológica. Os resultados da macroscopia e dos exames histopatológicos para DENV podem ser vistos na tabela 9.

Tabela 9. Achados de necrópsia e histopatológicos dos casos de dengue que evoluíram para óbito, por órgão acometido, Ceará de 2005 a 2008

Achados Órgão	Congestão P/E (%)	Edema P/E (%)	Hemorragia P/E (%)	Necrose P/E (%)	Men P/E (%)	Enc P/E (%)	Hep P/E (%)	Mioc P/E (%)	Pnem P/E (%)
Encéfalo	65/75 (86,7)	66/75 (88,0)	10/75 (13,3)	4/75 (5,3)	9/75 (12,0)	3/75 (4,0)	.	.	.
Pulmão	47/73 (64,4)	40/73 (54,8)	41/73 (56,2)	0/73 (0,0)	8/72 (11,1)
Fígado	23/72 (31,9)	8/72 (11,1)	18/72 (25,0)	28/72 (38,9)	.	.	18/72 (25,0)	.	.
Baço	47/68 (69,1)	1/68 (1,5)	29/68 (42,6)	34/68 (5,9)
Rim	8/13 (61,5)	3/13 (23,0)	0/13 (0,0)	2/13 (15,4)
Coração	0/9 (0,0)	6/9 (66,7)	3/9 (33,3)	0/9 (0,0)	.	.	.	2/9 (22,2)	.
Total	190/310 (61,3)	124/310 (40,0)	101/310 (32,6)	68/310 (21,9)	9/75 (12,0)	3/75 (4,0)	18/72 (25,0)	2/9 (22,2)	8/7 (11,1)

Legenda: Men (meningite); Enc (encefalite); Hep (hepatite); Mioc (miocardite); Pnem (pneumonite); P (presença); E (estudado); (.) Não se aplica.

Dos 163 óbitos estudados, 90 foram diagnosticados como dengue e destes, 46 (51,1%) apresentaram positividade para DENV no LCR, indicando assim infecção recente por este vírus, com envolvimento do SNC. Em 13 amostras de LCR houve positividade em mais de uma metodologia, perfazendo um total de 99 análises positivas no LCR. Dessas análises, uma foi positiva pelo isolamento viral, sete foram positivas pela técnica de RT-PCR, 27 positivas pela pesquisa de Ac da classe IgM, 26 positivas pela pesquisa de Ag NS1 e 38 positivas pela pesquisa de Ac da classe IgG. O resultado do LCR quando comparado com os resultados obtidos nos outros materiais biológicos analisados, sangue e vísceras, em 21 pacientes, re-confirmaram a infecção por DENV. O LCR acrescentou 27,8% (25/90) ao diagnóstico de dengue em pacientes negativos em outras amostras biológicas. A positividade das 46 amostras de LCR encontra-se representada na tabela 10 e figura 23.

Tabela 10 - Positividade dos 46 LCR analisados em relação aos materiais biológicos e métodos utilizados para o diagnóstico de dengue em amostras de óbitos do período de 2005 a 2008 no Ceará.

Ano	Pacientes idade/sexo	Isolamento Viral		RT / PCR		IgM		IgG		AgNS1 LCR	IHQ	DN
		LCR / sangue	DENV-3	LCR / sangue	DENV-3	LCR / sangue	DENV-3	LCR / sangue	DENV-3			
2005	39/M	-	DENV-3	DENV-3	DENV-3	-	-	+	+	-	-	E
2005	24/M	-	-	-	.	+	+	+	+	+	+	E
2005	70/M	DENV-3	-	DENV-3	DENV-3	-	-	-	-	+	-	M
2005	32/F	-	-	DENV-3	-	-	-	-	-	+	.	ME
2005	48/F	-	.	DENV-3	.	+	.	-	.	+	.	M
2006	15/M	-	.	-	.	-	.	+	.	+	-	M
2006	84/F	-	.	-	.	+	.	-	.	-	.	E
2007	1/F	-	-	-	.	+	.	+	.	-	-	ME
2007	27/M	-	.	-	.	-	.	-	.	+	.	M
2007	72/F	-	-	-	.	+	.	-	.	-	+	ME
2007	39/M	-	-	-	.	-	.	-	.	+	-	E
2007	19/M	-	-	DENV-2	.	-	.	+	.	-	-	E
2007	45/M	-	-	-	.	-	.	-	.	+	-	ME
2007	48/M	-	-	-	.	-	.	+	.	+	.	ME
2007	31/M	-	-	DENV-2	.	+	.	-	.	-	-	M
2007	17/F	-	-	-	.	+	.	+	.	-	-	ME
2007	47/F	-	.	-	.	+	.	+	.	-	-	ME
2007	<1/M	-	-	DENV-2	.	+	.	-	.	+	.	E
2007	<1/M	-	-	-	.	+	.	-	.	-	+	E
2007	49/M	-	-	-	.	-	.	-	.	+	+	E
2007	42/F	-	-	-	.	+	.	-	.	-	+	M
2007	16/M	-	-	-	.	+	.	-	.	+	.	M
2007	45/M	-	-	-	.	+	.	+	.	+	-	M
2007	16/F	-	-	-	.	+	.	+	.	-	-	E
2007	53/F	-	-	-	.	+	+	-	-	-	-	E
2008	6/F	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	ME
2008	2/F	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	E
2008	18/M	-	.	-	.	-	.	+	.	+	.	M
2008	32/F	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	M
2008	12/F	-	-	-	-	-	.	-	.	+	-	ME
2008	57/F	-	-	-	.	-	-	-	-	+	-	E
2008	20/F	-	-	-	.	+	+	+	+	+	-	E
2008	24/F	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	E
2008	3/F	-	-	-	.	+	+	+	+	-	-	ME
2008	42/M	-	-	-	.	+	+	+	+	-	+	ME
2008	43/M	-	-	-	.	-	.	-	.	+	-	E
2008	48/F	-	-	-	-	+	.	+	.	+	+	E
2008	15/M	-	-	-	.	-	-	-	-	+	+	ME
2008	<1/F	-	.	-	.	+	+	-	-	+	.	E
2008	19/F	-	-	-	.	-	-	+	+	+	.	M
2008	43/M	-	.	-	.	-	.	-	.	+	.	M

2008	49/F	-	-	-	.	+	-	+	+	-	+	E
2008	28/F	-	-	-	.	+	+	+	+	-	+	ME
2008	76/F	-	-	-	.	+	+	-	-	-	+	ME
2008	51/F	-	-	-	.	-	-	-	-	+	+	E
2008	1/M	-	.	-	.	+	.	-	.	+	.	M
Total	46	1	1	7	2	27	11	22	12	26	14	

Legenda: (RT/PCR) Transcrição reversa seguida da reação em

cadeia pela polimerase; (IgM) Imunoglobulina M; (IgG) Imunoglobulina G; (IHQ) Imunohistoquímica; (AgNS1) Ag NS1; (DN) Diagnóstico neurológico; (DENV 3) Dengue vírus sorotipo 3; (DENV 2) Dengue vírus sorotipo 2; (+) Positivo; (-) Negativo; (.) Não realizado; (E) Encefalite;(M) Meningite; (ME) Meningoencefalite.

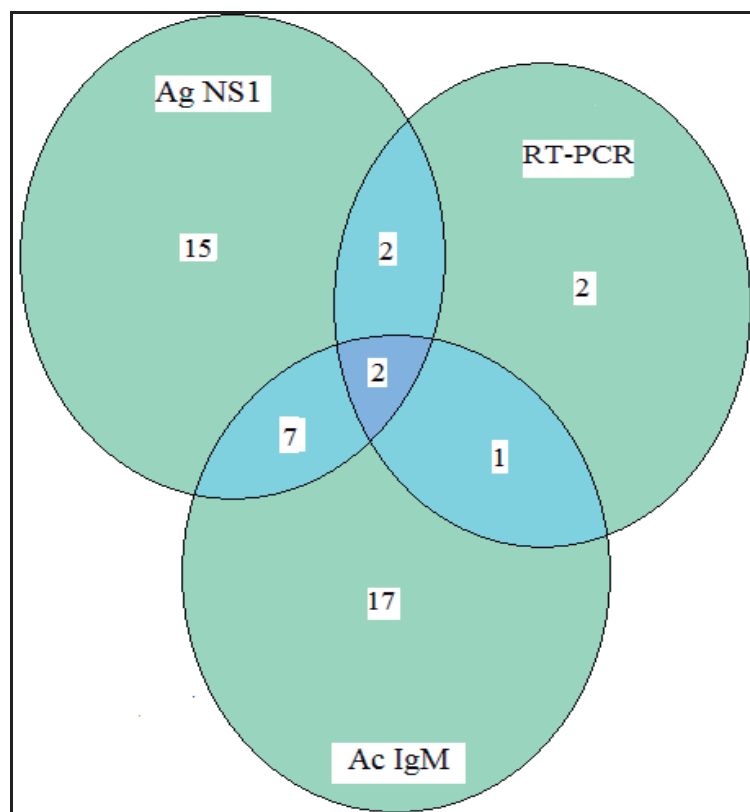


Figura 23 – Positividade dos 46 LCR analisados segundo a metodologia utilizada.

Legenda: (Ag NS1) Antígeno NS1; (Ac IgM) Anticorpo IgM; (RT-PCR) Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase.

4.2.3 Achados Clínicos

Levando em consideração os dados clínicos e laboratoriais que caracterizam um envolvimento do SNC, nos 46 pacientes com amostras de LCR positiva para DENV foram encontradas as seguintes patologias neurológicas: 19 (41.3%) encefalites, 14 (30.4%) meningoencefalites e 13 (28.3%) meningites (Anexos IV, V e VI). Dos 46 pacientes com LCR positivo para DENV, em 19 (41,3%) a histopatologia do encéfalo não foi realizada.

As manifestações clínicas mais observadas nos 46 casos de óbitos em que o LCR foi positivo para DENV foram: febre, 30 (65%); cefaléia 23 (50%); vômito 14 (30,4%); desorientação, 14 (30,4%); dispnéia, 13 (28%); polimialgia, 13 (28%); adinamia, 13 (28%); agitação, 12 (26%); dor abdominal, 8 (17%); diarréia, 7 (16%), sendo uma sanguinolenta; queda de sensório, 5 (10,8%); tosse, 5 (10,8%). As manifestações clínicas podem ser observadas na figura 24.

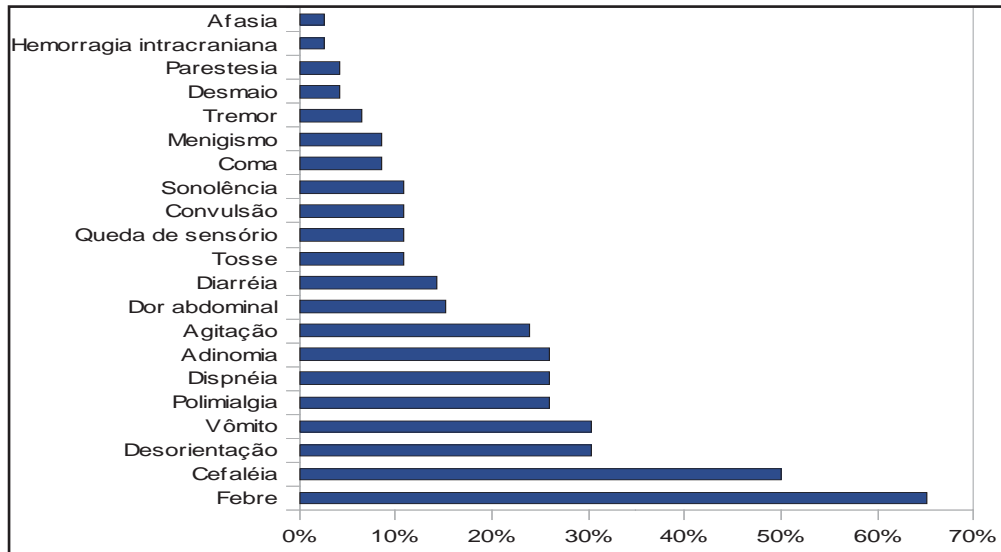


Figura 24 - Manifestações clínicas mais frequentes nos casos de óbito com LCR positivo para DENV.

Alguns pacientes do grupo com envolvimento do SNC apresentaram co-morbidades ou condições fisiológicas diferenciadas: cinco apresentaram meningite bacteriana; dois eram alcoólatras; duas estavam gestantes uma com 12 e outra com 28 semanas; um apresentou seqüela por projétil de arma de fogo; um apresentava Doença de Wilson; um era portador do vírus HIV; um com infecção pelo vírus influenza e outro era hipertenso de longa data.

4.3. Etapa III - Diagnóstico diferencial para dengue nos pacientes com suspeita clínica de meningite que foram atendidos no Hospital São José

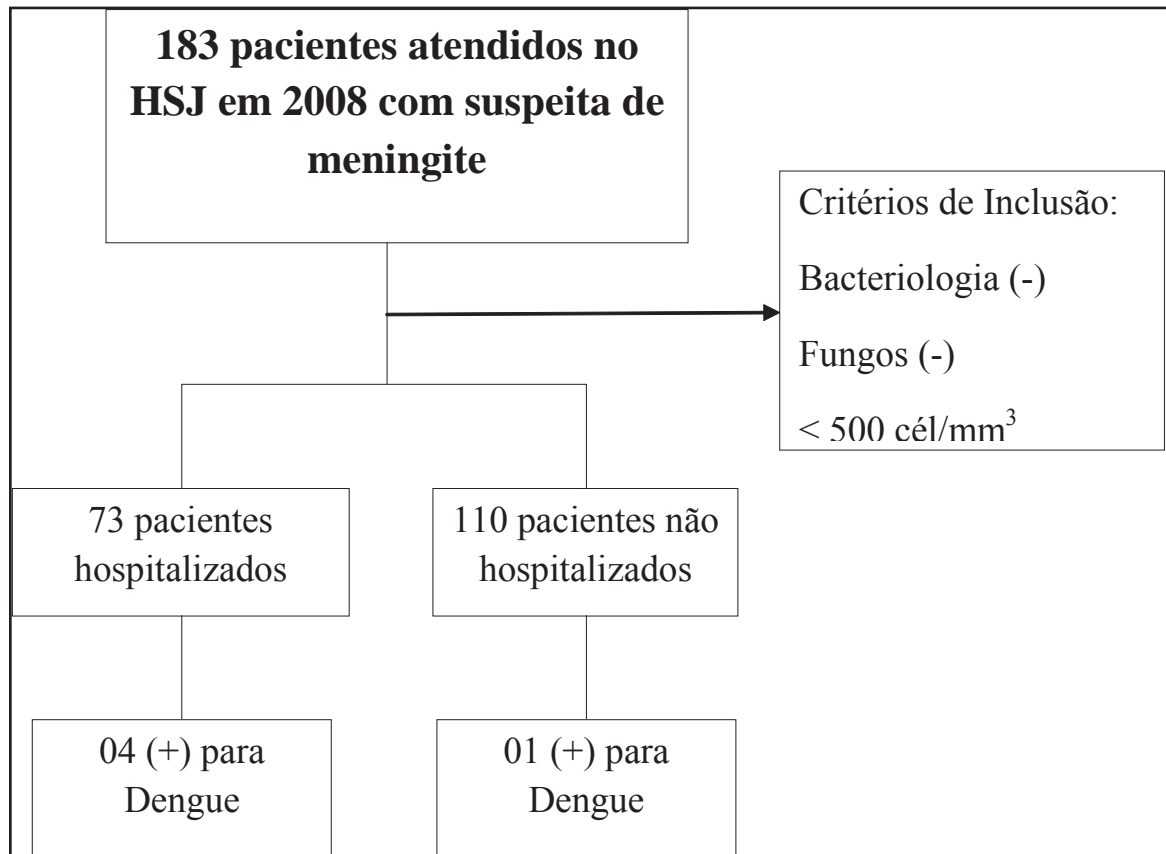


Figura 25: Fluxograma do diagnóstico diferencial para dengue nos pacientes com suspeita clínica de meningite que foram atendidos no Hospital São José

4.3.1. Epidemiologia

O terceiro grupo foi composto por 183 pacientes que foram atendidos no HSJ com suspeita de meningite, no ano de 2008, e cujo LCR foi encaminhado ao LACEN-CE para a pesquisa de bactérias e/ou fungos. Desses pacientes, 110 tiveram somente atendimento ambulatorial e 73 foram hospitalizados (Figura 25). A distribuição do atendimento ao longo do ano pode ser vista na tabela 11. Os meses de janeiro e outubro destacaram-se por apresentar um percentual de atendimento superior aos demais 13,6 % e 13,7%, respectivamente.

Tabela 11 - Distribuição mensal de pacientes com suspeita de meningite atendidos no Hospital São José submetidos ao diagnóstico diferencial para dengue no ano de 2008.

Meses	Não hospitalizados	Hospitalizados	Total (%)
Janeiro	17	8	25 (13,7)
Fevereiro	2	3	5 (2,7)
Março	14	2	16 (8,7)
Abril	5	1	6 (3,3)
Maio	7	2	9 (4,9)
Junho	12	6	18 (9,8)
Julho	4	3	7 (3,8)
Agosto	9	6	15 (8,2)
Setembro	8	11	19 (10,4)
Outubro	11	14	25 (13,7)
Novembro	10	9	19 (10,4)
Dezembro	11	8	19 (10,4)
Total	110	73	183 (100,0)

Os 183 pacientes com suspeita de meningite foram submetidos ao diagnóstico diferencial para dengue, destes, 106 eram do sexo masculino e 77 do sexo feminino, como pode ser visualizado na tabela 12.

Tabela 12 - Pacientes com suspeita de meningite, atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas submetidos ao diagnóstico diferencial para dengue, segundo sexo.

Pacientes	Sexo masculino (%)	Sexo feminino (%)	Total (%)
Não hospitalizados	65(35,6)	45(24,6)	110(60,1)
Hospitalizados	41(22,4)	32(17,4)	73(39,9)
Total	106 (58,0)	77 (42,0)	183 (100,0)

Dos pacientes hospitalizados, 27 (37,0) apresentaram uma morbidade associada, como pode ser observado na tabela 13.

Tabela 13 - Pacientes hospitalizados, no Hospital São José de Doenças Infecciosas, com suspeita de meningite e < 500 células/mm³ no LCR, segundo morbidade associada, em 2008.

Co-Morbidade	Quantidade (%)
Cardiopatia	3/73 (4,2)
Asma	4/73 (5,6)
Dermatite	3/73 (4,2)
Epilepsia	3/73 (4,2)
Diabetes	3/73 (4,2)
Doença hematológica	3/73 (4,2)
Doença renal	4/73 (5,6)
Hipertensão	4/73 (5,6)
Total	27/73 (37,0)

A idade média dos pacientes foi de 16 anos, variando de menos de um ano a 86 anos, com mediana de 10 e moda de cinco anos. O tempo entre a internação e o início dos sintomas foi de três dias, variando de 0 a 18, com mediana de dois e moda de um dia. Destes pacientes, 29 (33%), relataram atendimento prévio à internação.

4.3.2 Achados laboratoriais

O material clínico utilizado para a detecção de casos de dengue na amostragem de casos suspeitos de meningite foi o LCR encaminhado do HSJ. Os métodos diagnósticos utilizados para a análise desse material foram: o isolamento viral, a RT-PCR, a pesquisa de anticorpos das classes IgM e a pesquisa de Ag NS1. Cinco casos foram positivos (2,7%), sendo um pertencente ao grupo dos pacientes não hospitalizados, e quatro ao grupo dos pacientes hospitalizados. A positividade segundo a metodologia aplicada está representada na tabela 14.

Tabela 14 – Positividade para dengue das amostras de LCR dos pacientes suspeitos de meningite atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas segundo a metodologia aplicada.

Metodologia Aplicada	Positivo
Isolamento Viral	0
RT-PCR	0
Pesquisa de IgM	3
Pesquisa de NS1	2
Total	5

Dos cinco pacientes atendidos no HSJ com diagnóstico confirmado, três evoluíram para cura, um deles apresentou um tumor cerebral e foi encaminhado para tratamento cirúrgico em outro hospital, e um evoluiu para óbito (Anexo VII).

O paciente que evoluiu para óbito também se encontra representado no primeiro grupo do estudo, mas a suspeita, por ocasião da necrópsia, foi de dengue.

4.3.3 Achados clínicos

As manifestações clínicas freqüentes nos casos suspeitos de meningites foram febre, cefaléia, vômito e rigidez de nuca. Outras manifestações, menos relatadas, foram observadas nesses pacientes (Figura 26).

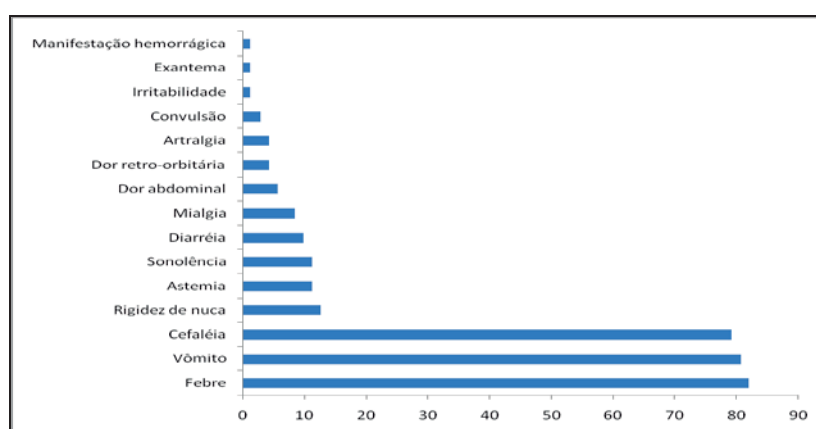


Figura 26 - Manifestações clínicas de 73 pacientes hospitalizados com suspeita de meningite no Hospital São José em 2008.

A celularidade média, com a contagem diferencial, a média das dosagens de proteínas e da glicose no LCR dos pacientes hospitalizados com suspeita de meningite, encontra-se representada na figura 27.

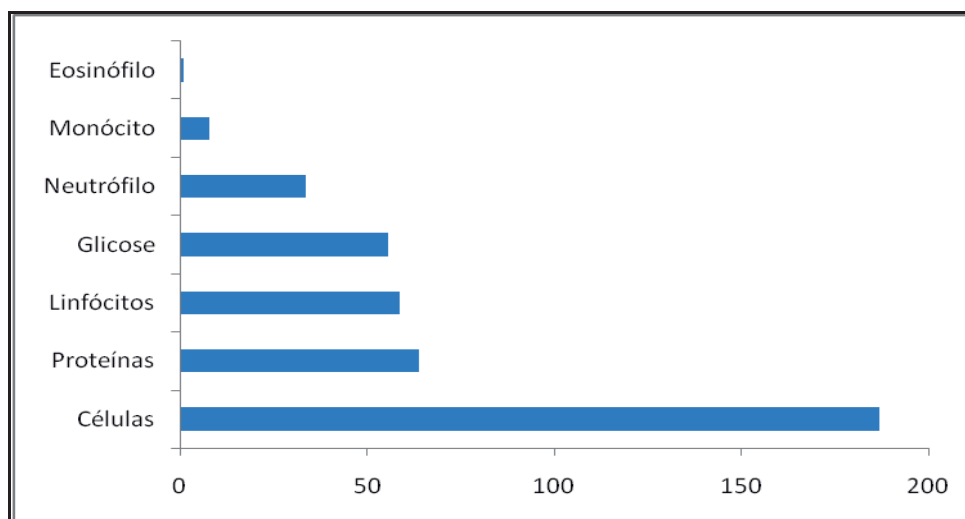


Figura 27 - Contagem de células, dosagem de proteínas e de glicose no LCR de 73 pacientes hospitalizados com suspeita de meningite no HSJ, em 2008.

Em resumo, foram trabalhadas 346 amostras de LCR nos casos de óbito por doenças infecciosas, encaminhados do SVO, e suspeita de meningite viral, encaminhados do HSJ. A positividade para o DENV foi maior para os casos provenientes do SVO (Tabela 15). A chance (Risco Relativo) de identificar LCR positivo para dengue em pacientes do SVO foi 10,33 vezes maior que nos pacientes do Hospital São José ($p < 0,0000$, IC 4,21 – 25,37).

Tabela 15- Investigação da infecção pelos DENV em 346 amostras de LCR de casos suspeitos de doença infecciosa segundo o local de origem da amostra, Ceará de 2005 a 2008.

Dengue	SVO (%)	Hospital São José (%)	Total (%)
Pos no LCR	46 (13,3)	5 (1,4)	51 (14,7)
Neg no LCR	117 (33,8)	178 (51,5)	295 (85,3)
Total	163 (47,1)	183 (52,9)	346 (100)

Legenda: Pos (positivo); Neg (negativo); LCR (líquido céfalo-raquidiano)

5. DISCUSSÃO

Os casos de dengue associados com manifestações atípicas ou não usuais têm sido mais frequentes à medida que as infecções por esses vírus tornam-se mais comuns (GULATI; MAHESHWARI, 2007). Dentre essas manifestações encontram-se as que envolvem o SNC, com ocorrência de sinais e/ou sintomas como convulsões, espasticidade, queda de sensório e parestias.

As manifestações neurológicas eram relacionadas como secundárias à vasculite com extravasamento de fluido, edema cerebral, hipoperfusão, hiponatremia, injúria hepática ou renal, sendo referidas como encefalopatias (HENDARTO; HADINEGORO, 1992; KULARATNE *et al.*, 2008). Não se pensava em encefalite ou infecção do SNC diretamente pelo vírus até o DENV ser isolado ou detectado por PCR no LCR e sua presença ser demonstrada por IHQ no SNC (LUM *et al.*, 1996; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997). No entanto, Rosen e colaboradores (1999), não conseguiram evidenciar replicação do vírus no cérebro em infecções humanas fatais pelo DENV. Segundo a Organização Mundial da Saúde, existem poucos relatos de isolamento viral ou detecção de Ac da classe IgM no LCR (OMS, 2009).

O estudo do LCR tem se mostrado de extrema importância para diferenciar a encefalopatia, ocasionada por alterações metabólicas sistêmicas, da encefalite e de outras manifestações neurológicas causadas pelo DENV. A pesquisa de DENV no LCR inclui técnicas de detecção de anticorpos, como os das classes IgM e IgG; isolamento viral; e detecção de RNA viral, como a RT-PCR (SOLOMON *et al.*, 2000). Na última década, o Ag NS1 do DENV mostrou-se promissor para diagnosticar precocemente a infecção por DENV (DATTA; WATTAL, 2010). Nesse contexto tornou-se oportuno avaliar se um *kit* comercial desenvolvido para a detecção de Ag NS1 em soro poderia ser utilizado em LCR.

Neste estudo, foi possível detectar o Ag NS1 em LCR utilizando um *kit* comercial para a detecção desse antígeno em soro: o NS1 Early. Não há um *kit* disponível para detectar anticorpos IgM no LCR, entretanto, essa detecção é feita com *kits* comerciais para uso em soro padronizando a diluição. Soares e colaboradores (2006) utilizaram a diluição de 1:2 no LCR para a detecção de Ac IgM. Essa foi a mesma diluição empregada para a detecção do Ag NS1 neste estudo; este *kit* tem a vantagem de ser mais sensível no período da viremia, possibilitando um diagnóstico mais precoce que a detecção de IgM (GUZMÁN *et al.*, 2010).

O Ag NS1 foi detectado em 50% dos casos em que já haviam sido positivos para DENV no LCR por outros métodos (Tabela 1). Em estudos anteriores, a detecção de Ag NS1 no soro, utilizando o NS1 Early, variou de 60,4% a 91,6% (SERAKAN *et al.*, 2007; DUSSART *et al.*, 2008). O valor de especificidade de 100% para o *kit* NS1 Early encontrado quando testado no LCR foi

semelhante a outros relatados na literatura com o uso de soro (DUSSART *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2010). No entanto, Guzmán e colaboradores (2010) encontraram especificidade de 90% quando testados em doadores de sangue saudáveis e pacientes com outros diagnósticos confirmados. Sabe-se que a quantidade de Ac IgM encontrada no LCR é menor quando comparada ao soro (CHEN *et al.*, 1991; PUCCIONE-SOHLER *et al.*, 2009). O mesmo pode acontecer em relação à presença de Ag NS1 no LCR. Considerando que não há parâmetros na literatura consultada para comparar os resultados obtidos nesse estudo, a detecção de Ag NS1 no LCR poderá ser mais uma ferramenta acrescentada ao diagnóstico de dengue neste tipo de material, abrindo a discussão sobre sua aplicabilidade na amostra biológica em questão.

Um estudo realizado com soros utilizando o *kit* NS1 Early mostrou que, quando o Ac IgM estava presente no soro, a sensibilidade da detecção do Ag NS1 caiu de 91,6% para 48,3% (SERAKAN *et al.*, 2007). A diminuição de sensibilidade nas amostras de LCR aqui estudadas em relação à presença de IgM, não alcançou a mesma proporção, passou de 50,0% para 34,6% (Tabela 2). Este fato provavelmente se deve a gravidade do caso, uma vez que todas as amostras foram obtidas de pacientes com desfechos fatais, e sabe-se que altos níveis da glicoproteína NS1 circulantes no plasma estão relacionados aos níveis de viremia possibilitando o desenvolvimento de formas graves da doença (LIBRATY *et al.*, 2002), embora muitos indivíduos com altos níveis de viremia nunca venham a desenvolver complicações clínicas. No entanto, a síndrome grave tem sido observada em indivíduos que apresentam anticorpos heterotípicos de dengue circulantes em altas concentrações (HALSTEAD, 2009).

Esta avaliação mostra que o *kit* NS1 Early para detecção do Ag NS1 no soro pode ser usado em amostras de LCR de pacientes diagnosticados com dengue. O seu uso conjunto com a detecção de Ac IgM aumentou a sensibilidade do diagnóstico para 92,3% (Tabela 3), o que está de acordo com uma recente avaliação do uso desse *kit* em soro relatado por Blacksell e colaboradores (2008). A detecção do Ag NS1 combina a precisão e rapidez da RT-PCR com a praticidade da técnica de ELISA, proporcionando um resultado confiável, que facilita o manejo clínico de pacientes com manifestação neurológica em zonas endêmicas de dengue.

O Brasil vem registrando epidemias de dengue desde 1986 e a primeira epidemia do Estado do Ceará foi em 1987, devido ao DENV-1. Em 1994, o DENV-2 foi introduzido causando a maior epidemia de dengue do Estado com registro dos primeiros casos de FHD e 12 óbitos. Em 2002, o DENV-3 foi encontrado pela primeira vez no Estado e, desde então, os casos de dengue grave tornaram-se mais comuns (SOUZA *et al.*, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2006; CEARÁ, 2010). Durante surtos de dengue no Estado foram relatados casos fatais com uma rápida evolução do início dos sintomas ao óbito dificultando a confirmação do diagnóstico durante a vida. Assim, este estudo foi realizado com múltiplas abordagens para avaliar a contribuição de

diferentes metodologias em casos fatais que ocorreram durante o período epidêmico analisado. Casos de envolvimento do SNC foram relatados e o estudo do LCR *post mortem* foi realizado para observar a contribuição deste espécime clínico na confirmação do diagnóstico laboratorial de dengue.

Este estudo mostrou que 90 (55,2%) pacientes dos 163 suspeitos de doenças infecciosas, que evoluíram para óbito, foram infectados por DENV (Tabela 4). Esta alta frequência encontrada é, provavelmente, devido à situação epidemiológica do estado, onde havia três sorotipos circulantes, DENV-1, 2 e 3, caracterizando a região como hiperendêmica, com um aumento do número de casos graves de dengue (ARAÚJO *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2007; CEARÁ, 2011a).

A gravidade da dengue tem sido classificada desde os anos 70 de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS, entretanto, no período anterior a essa data, o óbito foi arbitrariamente selecionado como indicador de gravidade da doença (KUNO, 2009). Ainda hoje o MS utiliza o desfecho fatal como um dos requisitos para a classificação de dengue com complicação, quando os critérios para a classificação do caso como FHD não são preenchidos (BRASIL, 2002 b). Dos 90 casos de dengue estudados, 52,2% já haviam sido classificados como dengue, enquanto que 48,8% não constavam nos registros da Secretaria de Saúde do Estado com esse diagnóstico (Comunicação Pessoal). Esses dados alertam para a necessidade de um estudo mais detalhado dos óbitos por causa desconhecida submetidos à necropsia e cuja hipótese diagnóstica, após necropsiados, resultou em suspeita de doença infecciosa.

A maioria dos sinais e sintomas que acompanham a infecção por DENV são comuns a muitas doenças febris resultando em um largo espectro de diagnóstico diferencial, incluindo infecções virais, bacterianas e causadas por protozoários. O diagnóstico laboratorial de dengue foi concordante em 68% com a hipótese diagnóstica clínica única ou conjunta de dengue e outras doenças que fazem parte do diagnóstico diferencial (Tabela 5) (BRASIL, 2002b). Entretanto, apesar da necropsia, de 66 hipóteses diagnósticas para outras doenças, 23 foram confirmadas como dengue, reforçando a importância do diagnóstico laboratorial para definir o caso (Tabela 4).

A média de idade dos indivíduos foi de 33 anos. No Brasil, dengue e FHD haviam sido caracterizadas por uma maior incidência na população adulta (VASCONCELOS *et al.*, 1998; SIQUEIRA *et al.*, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2007), embora haja uma tendência a mudar, com um aumento significativo na proporção de FHD em indivíduos menores de 15 anos (TEIXEIRA *et al.*, 2009). No sudeste da Ásia as duas formas da doença são mais frequentes em crianças (OMS, 2009). Em Porto Rico, durante uma epidemia, 65,4% dos pacientes tinham menos de 30 anos, com uma média de 21 anos, e, a maior incidência aconteceu na faixa etária de 10 a 14 e 15 a 19 anos (RIGAU-PÉREZ *et al.*, 2001).

A hipótese diagnóstica mais frequente por ocasião da necropsia foi de dengue, como hipótese única ou conjunta, com 68% de acerto (Tabela 5). Os resultados positivos para dengue de

fato acompanharam a curva de distribuição dos óbitos por suspeita de doenças infecciosas do SVO do Ceará, de 2005 a 2008 (Figura 17). Dentre os casos positivos para dengue a leptospirose foi a hipótese conjunta com maior número de suspeitos, justificada pela semelhança com o período de incubação, sintomas mais comuns com a dengue (febre, dor de cabeça, náuseas, dores musculares) e o período que a doença se manifesta com maior destaque em nosso estado, que é no primeiro semestre de cada ano (KO *et al.*, 1999; SANDERS *et al.*, 1999; BRUCE *et al.*, 2005; CÂMARA *et al.*, 2007; CEARÁ, 2011,b). Casos de leptospirose são reportados no Ceará desde os anos 80, no ano de 2008 foram notificados 192 casos e destes, 79 confirmados em 18 municípios (NORONHA *et al.*, 1991; DAHER *et al.*, 1999; CEARÁ, 2011,b).

A segunda hipótese diagnóstica mais freqüente foi a de meningite, que foi também a mais apontada nos casos não suspeitos de dengue. Indivíduos com febre, cefaléia, vômitos, rigidez de nuca, sinais de irritação meníngea, convulsões e/ou manchas vermelhas no corpo são considerados casos suspeitos de meningite, que podem também ser confundidos com casos de dengue com envolvimento do SNC (SOARES *et al.*, 2010). A doença meningocócica corresponde a uma das etiologias da meningite cuja forma grave se apresenta com febre, dores articulares e/ou dores no corpo, estado geral comprometido, evoluindo com o aparecimento de petéquias e/ou sufusões hemorrágicas, que pode ser confundida com um caso de FHD (CEARÁ, 2011c). Tanto a meningite quanto a leptospirose fazem parte do diagnóstico diferencial para dengue e este estudo mostrou que, mesmo após a necropsia, o diagnóstico é difícil necessitando uma investigação laboratorial mais específica (Tabela 6).

A detecção do antígeno de DENV através da IHQ em tecido hepático apresentou uma positividade maior (67,8%) do que todas as outras técnicas empregadas neste estudo (Tabela 7). Estes achados foram semelhantes aos resultados encontrados no Rio de Janeiro, em vigilância retrospectiva de infecção por DENV em casos fatais, onde, usando IHQ em 22 amostras de fígado, 63,6% foram positivos (DE ARAÚJO *et al.*, 2009). Esta técnica tem sido útil para revelar a presença de antígenos de DENV em diversos tecidos e também em células mononucleares fagocíticas, indicando que a infiltração de macrófagos infectados poderia ser um dos caminhos utilizados pelo vírus para entrar no cérebro, em encefalites causadas pelo DENV (MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997).

A detecção de antígenos de DENV no SNC, até então, só havia sido demonstrada por procedimento de IHQ (MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997). Recentemente, foi detectado o Ag NS1 de DENV em amostras de tecido cerebral (LIMA *et al.*, 2011). A viabilidade de encontrar Ag NS1 de DENV no LCR por ELISA foi considerada como uma nova ferramenta podendo ser utilizada em pacientes com manifestações neurológicas associadas à infecção pelo DENV.

A presença do Ag NS1 de DENV tem sido relacionada com a replicação do vírus e nível de viremia, com risco de desenvolver dengue hemorrágica (DUONG *et al.*, 2011). Ele pode ser encontrado no plasma de pacientes com infecção aguda por DENV sendo plausível encontrá-lo no

LCR de pacientes que apresentam infecção aguda por DENV com sinais ou sintomas neurológicos (LIBRATY *et al.*, 2002). Neste estudo, o Ag NS1 de DENV foi detectado em 26 amostras de LCR (Tabela 7).

A detecção de Ac IgM em LCR tem mostrado uma alta especificidade. No Rio de Janeiro, foi encontrada uma taxa de 97% de especificidade para o diagnóstico neurológico associado à dengue (SOARES *et al.*, 2006). Esse achado pode estar relacionado à neurovirulência do DENV e sua capacidade de causar encefalite (LAM *et al.*, 1996). Os Ac IgM foram encontrados em 27 amostras de LCR (Tabela 7). Uma pesquisa de Ac IgM em amostras de LCR e soro, pareados, de pacientes com dengue mostrou que o título de Ac no LCR foi sempre mais baixo do que o encontrado no soro (CHEN *et al.*, 1991). Considerando as informações acima citadas e o fato que neste estudo, os dias da doença variaram de um a 14 dias, com a média de cinco dias, quando uma IgM positiva no LCR foi encontrada, considerou-se uma infecção aguda ou recente por DENV.

O acometimento neurológico em infecções por dengue tem sido referido como encefalopatia e atribuído ao extravasamento de líquidos, edema cerebral, hiponatremia, insuficiência hepática e/ou renal e não a encefalite por invasão local do SNC (HENDARTO; HADINEGORO, 1992; KULARATNE *et al.*, 2008). A literatura tem demonstrado a presença do DENV no cérebro e no LCR por PCR, isolamento viral e detecção de Ac das classes IgM e IgG fornecendo forte evidência que os DENV têm propriedades neurovirulentas (SOLOMON *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2006; DE ARAÚJO *et al.*, 2009; PUCCIONE-SOHLER *et al.*, 2009).

O envolvimento do SNC em pacientes com infecção aguda por DENV tem sido descrito em diferentes regiões do mundo. Pancharoen e Thisyakorn (2001) encontraram manifestações neurológicas em 5,4% das crianças com dengue na Tailândia. Solomon e colaboradores (2000) mostraram infecção por dengue em 4% de todos os casos de infecção do SNC no Vietnã. Domingues e colaboradores (2008) relataram 21,2% de envolvimento do SNC em pacientes com dengue admitidos em um hospital terciário em Vitória. A prevalência entre os estudos parece variar com a gravidade dos casos da dengue e pode não representar a prevalência verdadeira do envolvimento do SNC em pacientes com dengue (DOMINGUES *et al.*, 2008). Neste estudo foi encontrada uma alta frequência, 51,1% do total de casos fatais com dengue apresentavam algum sintoma neurológico e positividade no LCR por DENV, apesar de 10% terem apresentado co-infecção bacteriana. Infecções bacterianas simultâneas já haviam sido encontradas em óbitos relacionados com dengue em Porto Rico e Taiwan (RIGAU-PÉREZ *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2005); na Tailândia foi relatado um caso de meningite bacteriana e FHD em uma criança que tratada adequadamente se recuperou (KAMATH; RANJIT, 2006). Na Índia foram descritos três casos de dengue com sepsis bacteriana que foram tratados e se recuperaram (ARYA; AGARWAL, 2008). Ao considerar as amostras de LCR positivas apenas para DENV, o estudo mostrou que 41% do total de casos fatais

com dengue apresentavam infecção neurológica. Wiwanitkit (2005), revendo a magnitude e o padrão de patologia neurológica entre casos fatais de FHD na Tailândia, encontrou 21 manifestações neurológicas em 51 óbitos, com uma taxa de incidência de 41,2%, o que foi considerada uma importante complicação fatal. Sumarmo e colaboradores (1983) relataram que 70% dos pacientes com dengue que evoluíram para óbito apresentaram um ou mais sinais de encefalite, em um estudo de casos de dengue confirmados com isolamento viral em amostras de soro na Indonésia.

Ao analisar o LCR dos casos de óbito com suspeita de doença infecciosa foi obtido um resultado de 46 amostras positivas e a detecção de dois sorotipos, DENV-2 e DENV-3 (Tabela 10). Durante o período da epidemia de dengue estudado, estes foram os sorotipos circulantes no Ceará (CEARÁ, 2011a). Estes sorotipos já haviam sido previamente detectados no LCR, evidenciando que DENV tem propriedades neurovirulentas e pode causar encefalite em infecções primárias e secundárias (DOMINGUES *et al.*, 2008). A detecção do vírus no LCR não apresenta uma boa sensibilidade. Nesta pesquisa, pela técnica de isolamento viral foi identificado apenas um DENV-3. Solomon e colaboradores (2000) pesquisando DENV no LCR em um estudo prospectivo de pacientes menores de 15 anos e adultos suspeitos de infecção do SNC, atendidos em uma unidade de tratamento intensivo de um hospital no Vietnã, encontraram dois DENV-2 utilizando a técnica de inoculação em mosquito, que é mais sensível do que o isolamento em cultura celular de mosquito *Aedes albopictus*, que foi a técnica utilizada neste estudo (ROSEN; GUBLER, 1974). A detecção por RT-PCR identificou três DENV-2 e quatro DENV-3 o que proporcionalmente foi um pouco maior, 15,2% (7/46) que a encontrada pelo grupo citado anteriormente, que foi 14,4% (3/21), apesar das amostras terem sido coletadas *post mortem* e armazenadas por dois a cinco anos antes da realização da pesquisa. Se a técnica de RT-PCR em tempo real tivesse sido utilizada, a positividade das amostras de LCR poderia ter sido maior. Kumar e colaboradores (2008) utilizando a técnica citada detectaram 72,4% (21/29) de genomas virais de DENV no LCR.

De acordo com a teoria da infecção sequencial por DENV, a infecção secundária por estes vírus pode causar uma doença mais grave (HALSTEAD, 1988). Cordeiro e colaboradores (2007) encontraram uma diferença estatisticamente significativa na infecção secundária como um fator de risco para FHD. Neste estudo a infecção secundária por DENV, com base na detecção de Ac da classe IgG no soro, foi encontrada em 46,7% (14/30) de infecção secundária, contrapondo o que mostra a teoria da infecção sequencial por DENV (HALSTEAD, 1988, 2009; GUZMÁN *et al.*, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2005) (Tabela 8). Entretanto, vários estudos têm demonstrado comprometimento neurológico em dengue primário e secundário (ONG *et al.*, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2008)

Os casos fatais foram encaminhados ao SVO sem diagnóstico. A média de dias entre o início da doença e o óbito foi de cinco dias, às vezes apenas de um dia, portanto em alguns casos não houve tempo suficiente para investigar ou, a investigação não foi eficiente para fazer um diagnóstico.

O Ministério da Saúde do Brasil para reconhecer que há uma infecção por dengue em um caso fatal, recomenda que o óbito seja investigado; um teste de laboratório positivo para dengue é necessário para a classificação final do caso (BRASIL, 2005). As necrópsias foram realizadas para investigar as possíveis causas dos óbitos. Os achados de necrópsia e histopatológicos mostraram o envolvimento de vários órgãos (Tabela 9). O fígado encontra-se entre os órgãos mais estudados e tem sido demonstrado que ele é a fonte de algumas das alterações fisiopatológicas, como uma deterioração grave do *status* mental (LUM *et al.*, 1993). A combinação de sinais neurológicos e disfunção hepática em pacientes com FHD é considerada como indicador de prognóstico ruim por alguns pesquisadores (HUERRE *et al.*, 2001).

Neste estudo, o cérebro apresentou congestão, edema, hemorragia e necrose, além de lesões meníngeas e neuronais como achados histopatológicos (Tabela 9). A alteração mais freqüente foi o edema cerebral, descrita anteriormente como achado de necropsia predominante em encefalopatia de casos de dengue (HOMMEL *et al.*, 1998). Hemorragia intracraniana foi encontrada em 13,3% (10/75) dos cérebros neste estudo. Um caso de hemorragia cerebral já havia sido descrito em uma paciente do Rio de Janeiro que recuperou suas funções orgânicas e foi submetida à fisioterapia para a recuperação das funções motoras (SOUZA *et al.*, 2005). Dois casos de hemorragia subaracnóidea foram relatados anteriormente em pacientes com diagnóstico de dengue no Brasil (FERREIRA *et al.*, 2005). Outros cinco casos foram tratados em Unidade de Neurocirurgia na Índia, onde dois pacientes com sangramento profundo deterioraram muito rapidamente e faleceram (KUMAR *et al.*, 2009). Em outro estudo foram analisados 21 casos fatais com patologia neurológica, seis apresentaram hemorragia intracraniana, o que foi considerado um achado comum para aqueles casos (WIWANITKIT, 2005). As lesões meníngeas e os danos neuronais encontrados nesse estudo são compatíveis com a infecção do SNC. Um estudo retrospectivo sobre os casos fatais de dengue no Brasil relatou a detecção de antígenos virais ou RNA viral em tecido cerebral de oito pacientes (DE ARAÚJO *et al.*, 2009). Anteriormente, a quebra da barreira hemato-encefálica havia sido demonstrada em casos fatais de dengue (MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997).

A literatura sobre registros de necrópsias em casos de óbito com dengue ainda é escassa. Alguns dados de necrópsia e histopatológico estão incompletos. A coleta desses dados secundários foi uma limitação apresentada por este estudo, uma vez que se trata de um estudo retrospectivo. Na Tailândia, um estudo sobre a histopatologia dos casos de óbito por dengue concluiu que o dano vascular e suas alterações fisiológicas são os efeitos básicos da doença e que algum grau de hemorragia estava invariavelmente presente na maioria dos órgãos (BHAMARAPRAVATI *et al.*, 1967). Neste estudo foram analisados 310 tecidos de 75 pacientes com dengue, destes 101 apresentaram hemorragia em alguns dos órgãos corroborando com o achado de literatura citado acima (Tabela 9).

As manifestações mais comuns do envolvimento do SNC que podem ser encontradas em infecções por DENV são: dor de cabeça, tontura, insônia, sonolência, agitação, irritabilidade, depressão e alterações sensoriais como letargia, confusão e coma. Todas essas manifestações podem ser vistas neste estudo além de outras consideradas menos freqüentes, como convulsões, rigidez de nuca e paresias (Figura 24). Em relação à doença neurológica encontrada, os principais diagnósticos foram encefalite e meningoencefalite, responsáveis, respectivamente, por 46,3% e 34,1%, das manifestações neurológicas (Tabela 10). Uma avaliação do envolvimento do SNC em infecções por DENV na Jamaica relatou 51,8% de encefalite, e no Vietnã, 42,8% (SOLOMON *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 2008). Por outro lado, na Tailândia, uma pesquisa realizada com 80 crianças que apresentavam manifestações neurológicas em infecções por DENV, relatou apenas um caso de encefalite que foi confirmada por estudo histopatológico. A análise de Ac da classe IgM e PCR para DENV no LCR foi realizada em 16 pacientes, sendo negativo em todos (PANCHAROEN; THISYAKORN, 2001). Em Pernambuco, a encefalite e a meningoencefalite foram responsáveis por 31,2% das manifestações neurológicas em 32 pacientes com FHD (CORDEIRO *et al.*, 2007). No Ceará, três casos de dengue com manifestações neurológicas foram relatados em uma epidemia ocorrida em 1994 com a predominância de DENV-2 (VASCONCELOS *et al.*, 1998 b). Mais recentemente, dois casos de neurite óptica bilateral após infecção com DENV que recuperaram a acuidade visual sem tratamento foram descritos (ARAGÃO *et al.*, 2010).

As co-morbidades foram importantes na análise dos casos fatais por dengue em Porto Rico, onde 70% dos óbitos aconteceram com pacientes que apresentaram co-morbidades, como hipertensão e alcoolismo (RIGAU-PÉREZ; LAUFER, 2006); o mesmo não aconteceu em Singapura, onde a presença simultânea de outra patologia não foi significativamente diferente entre o grupo de dengue associado à mortalidade e o grupo de dengue sem complicação (ONG *et al.*, 2007). As co-morbidades ou co-infecções observadas neste estudo foram encontradas somente em 28,2% dos pacientes que apresentaram envolvimento do SNC, o que induz a avaliar a patologia neurológica como causa importante de complicação nos óbitos. Houve cinco casos de co-infecção bacteriana pondo em dúvida se as manifestações neurológicas desses pacientes foram devidas tão somente à infecção bacteriana ou também à infecção do SNC pelo DENV. Um paciente era HIV positivo; um estudo em Singapura mostrou cinco pacientes com HIV e infecção por DENV que evoluíram bem, nenhum desenvolveu FHD ou SCD (SIONG *et al.*, 2008). Havia também no grupo estudado: um hipertenso, dois alcoólatras, um com seqüela por projétil de arma de fogo, um com gripe, um com Doença de Wilson e duas gestantes (Anexos IV, V e VI).

Os efeitos da dengue durante a gestação têm sido estudados principalmente para conhecer o impacto dessa infecção nos recém-nascidos (CARLES *et al.*, 2000; MALHOTRA *et al.*, 2006; TAN *et al.*, 2008). No Brasil, foi realizado um estudo de coorte retrospectivo, analisando 13 casos de

pacientes grávidas com infecção confirmada por sorologia, durante uma epidemia por DENV-3 no Rio de Janeiro. Das 13 gestantes, 11 foram infectadas no terceiro trimestre da gravidez; seis (54,5%) resultaram em partos prematuros e quatro (30,7%) foram classificados como FHD, dos quais dois (15,4%) tiveram evolução fatal (ALVARENGA *et al.*, 2009). Nesta casuística de óbitos por dengue há duas gestantes. Uma com 24 anos de idade, gestante com 12 semanas, apresentou quadro clínico sugestivo de FHD com a detecção de Ac das classes IgM e IgG específicos para DENV no soro e no LCR (Anexo IV). O segundo caso, uma gestante com 19 anos de idade, com 28 semanas, com suspeita de meningite, apresentou positividade no LCR para Ag NS1, Ac da classe IgG para DENV e cultura bacteriana positiva para *Streptococcus pneumoniae* (Anexo VI). Tratava-se de um caso de meningite bacteriana e co-infecção com DENV. Os dois casos foram de dengue secundária, comprovados pela detecção de Ac da classe IgG e enquadram-se na classificação de FHD e dengue com complicação.

As características clínicas da encefalite, os achados de necrópsia e histopatológicos do cérebro e os resultados laboratoriais positivos no LCR, que podem indicar a presença do DENV, induzem que o SNC foi infectado pelo DENV e que a patologia neurológica foi uma importante complicação nos casos fatais com dengue estudados.

No ano de 2008, 448 pacientes foram notificados à SESA do Ceará como suspeitos de meningite viral, com LCR límpido (comunicação pessoal). Destes, 183 (40,9%) foram atendidos no HSJ, onde foi realizado o estudo da celularidade do LCR. Os meses de janeiro e outubro apresentaram um percentual de atendimento superior aos demais (Tabela 11). Nesses meses foram detectados quatro, dos cinco casos de dengue, nos casos suspeitos de meningite. No ano de 2008 o Ceará enfrentou a segunda maior epidemia de dengue em número de casos e a maior em número de casos de FHD. Embora o pico epidêmico tenha sido nos meses de abril e maio, os meses onde ocorreram os casos de dengue em pacientes inicialmente suspeitos de meningite foram janeiro, julho e outubro, com 1607, 982 e 261 casos confirmados de dengue, respectivamente (CEARÁ, 2010).

Dos cinco pacientes suspeitos de meningite que resultaram positivos para dengue no LCR (Tabela 14), três que evoluíram para a cura apresentaram febre, cefaléia, rigidez de nuca e vômitos. Nenhum sinal ou sintoma de dengue como mialgia, dor nas articulações, sangramento, diarreia, exantema ou referência à dengue anterior foi observado. Meningite determinada por infecção oligossintomática de dengue já foi reportada anteriormente no Brasil (SOARES *et al.*, 2010).

Um paciente que apresentou um tumor cerebral, além de dor de cabeça, vômitos e adinamia, mostrou rebaixamento de consciência e delírio, sintomas que podem ser associados à presença do tumor. Entretanto, esse paciente apresentava Ac das classes IgM e IgG positivas para DENV no LCR coletado após cinco dias do início dos sintomas, indicando uma infecção secundária aguda por DENV no SNC. Além disso, a pleocitose com linfocitose, um leve aumento nas enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, uma glicorraquia normal e as

culturas bacterianas e fúngicas negativas indicaram a presença da infecção viral, que no paciente em questão, poderia ser por DENV (Anexo VII). A infecção do SNC, provavelmente, desencadeou as manifestações neurológicas indicando que o crescimento insidioso do tumor selar com expansão supra selar (característico dos tumores nessa localização) neste caso, se manifestou em decorrência da apresentação simultânea de um processo infeccioso (CZEPIELEWSKI *et al.*, 2005).

O paciente com evolução fatal foi o único dos cinco com dengue que apresentou na sintomatologia, além da febre e da cefaléia, alguns sinais e sintomas da doença, tais como adinamia intensa, tosse seca com dispnéia e epigastralgia que são achados relatados em casos fatais de FHD (GUZMÁN *et al.*, 1984). Esse paciente foi a óbito sem diagnóstico definido sendo então encaminhado ao SVO para investigação. A suspeita por ocasião da necrópsia foi de dengue. Foram coletados sangue, LCR e vísceras, encaminhados ao LACEN-CE para análise. As vísceras foram enviadas ao IEC para estudo IHQ cujo resultado foi positivo para Ag de DENV no fígado. A pesquisa de DENV no sangue foi negativa, entretanto, a pesquisa de Ag NS1 de DENV no LCR foi positiva, indicando infecção do SNC por este vírus (Tabela 14; Anexo VII). A pesquisa de Ag NS1 no soro tem sido útil como marcador precoce de infecção por DENV (DATTA; WATTAL, 2010). Neste estudo, a detecção de Ag NS1 foi usada pela primeira vez em LCR sendo útil para diagnosticar casos com manifestações neurológicas.

Não foi possível a detecção viral por isolamento e RT-PCR no material dos pacientes atendidos no HSJ. Provavelmente o manuseio da amostra de LCR para o diagnóstico bacteriológico e fúngico, antes de ser encaminhado para a pesquisa viral, foi responsável por esse fato, uma vez que o DENV é termo lábil e o isolamento e a detecção do RNA viral nesse tipo de amostra é difícil (ROSEN *et al.*, 1999)

Os valores encontrados para a contagem de células, dosagem de proteínas e de glicose no LCR dos pacientes internados no HSJ são compatíveis com um quadro de infecção viral, indicando que outros vírus além do DENV podem ser responsáveis pela infecção do SNC (Figura 27). A literatura revisada mostra que a maioria das meningites e encefalites virais têm como agente etiológico os enterovirus e os herpesvirus (YONG *et al.*, 2008; DOMINGUES; TEIXEIRA, 2009; SOARES *et al.*, 2011). O DENV ocasionando meningite tem sido pouco relatado, entretanto alguns casos já foram descritos. Na Jamaica, um estudo realizado com 401 casos suspeitos de infecção viral do SNC que foram investigados para DENV mostrou que 54 (13,5%) foram positivos para dengue, com 33,3% (18/54) dos casos apresentando manifestações clínicas de meningite (JACKSON *et al.*, 2008). Entretanto, considerando a suspeita inicial de infecção do SNC a frequência de meningite descrita na literatura consultada acima foi de 4,5% (18/401). Solomon e colaboradores pesquisando dengue em pacientes com suspeita de infecção do SNC encontraram 4,2% (16/378) positivos para DENV e apenas um paciente apresentava meningite (0,3%). A frequência de dengue nos casos suspeitos de

meningite desta casuística foi de 2,7% (5/183), embora não representando suspeita mais geral de envolvimento do SNC, o resultado encontra-se dentro dos limites observados anteriormente, corroborando com o encontrado na literatura citada. No Brasil foi descrito um caso de meningite em paciente, oligossintomático para dengue, em Vitória e outro no Rio de Janeiro (DOMINGUES *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2010).

A positividade das amostras de LCR para o grupo originado do SVO foi superior à encontrada para as amostras dos pacientes atendidos no HSJ ($p < 0,000$), sugerindo uma maior gravidade para os casos em que há evidência da presença do DENV nesse material biológico (Tabela 15). A relação entre infecção do SNC pelos DENV e um pior prognóstico, com possível evolução fatal, foi relatada anteriormente, com índice de mortalidade variando entre 5% e 22% (PANCHAROEN; THISYAKORN, 2001; CAM *et al.*, 2001). Wasay e colaboradores (2008), em um estudo de encefalite e mielite associado com infecções por DENV no Paquistão, relataram que 32% dos pacientes evoluíram para óbito. O risco relativo dos pacientes com evolução fatal encaminhados do SVO apresentarem um exame positivo para DENV no LCR foi 10,3 vezes maior que dos pacientes que foram atendidos e encaminhados do HSJ, onde apenas um evoluiu para óbito.

A dificuldade de diagnosticar dengue com manifestações não usuais já foi relatada em uma revisão de Gulati e Maheshwari em 2007. Um dos relatos mais antigos de manifestações do SNC associadas com dengue foi feito por Rush durante a epidemia da Filadélfia em 1780 (RUSH *apud* LAM *et al.*, 1996). Posteriormente, a relação entre dengue e manifestações neurológicas foi descrita em 1976 e, somente 20 anos depois o DENV pode ser evidenciado no LCR (SANGUASERMSRI *et al.*, 1976; LUM *et al.*, 1996). Apesar dos primeiros relatos de dengue com envolvimento do SNC datarem de mais de dois séculos ainda são escassas as informações sobre a neurovirulência e a patogênese das manifestações neurológicas dos DENV.

Os resultados deste estudo mostraram que houve envolvimento do SNC em casos de dengue nas duas populações estudadas. Entretanto, estudos prospectivos de casos de dengue com manifestações neurológicas são necessários para conhecer e compreender melhor o envolvimento do SNC nas infecções pelos DENV no estado do Ceará, que é uma região endêmica de dengue.

6. CONCLUSÕES

A avaliação do *kit* comercial para a detecção de Ag NS1 de DENV em amostras de LCR apresentou 50% de sensibilidade e 100% de especificidade, compatíveis com os testes realizados em soro, possibilitando o uso desse material clínico para detectar o Ag NS1.

A utilização combinada da detecção do AgNS1 e IgM anti-dengue no LCR alcançou um percentual de 92,3%.

A utilização do LCR como material clínico aumentou 27,8% a positividade do diagnóstico de dengue em casos de óbitos negativos para DENV em outros materiais biológicos, aumentando a frequência de casos de dengue nessa amostragem.

A pesquisa de vírus, RNA viral, Ag e Ac no LCR de pacientes com infecções por DENV e evoluções fatais revelou o envolvimento do SNC em casos de dengue nas populações estudadas encaminhadas do SVO e do HSJ.

O diagnóstico diferencial realizado em pacientes com suspeita de meningite viral, encaminhados do HSJ, apresentou 2,7% de positividade para DENV no LCR.

A frequência da positividade para DENV em amostras de LCR de pacientes com evolução fatal foi 10,3 vezes maior quando comparada com a dos pacientes com suspeita de meningite viral, sugerindo que o envolvimento do SNC é um fator importante no agravamento do prognóstico e desfecho fatal do caso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, J. P.; BHATTACHARYYA, P. C.; DAS, S. K.; SHARMA, M.; GUPTA, M. Dengue encephalitis. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 40, p. 54-55, 2009.

AHMED, S.; ALI, N.; TARIG, W.U. Neurological manifestations as presenting feature in dengue fever. **J. Coll. Physicians Surg. Pak.**, v. 17, p. 236-237, 2007.

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme Linked Immunosorbent Assay to Specific 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.**, v. 40, p.376-381, 2002.

ALCON-LEPODER, S.; SIVARD, P.; DROUET, M.-T.; TALARMIN, A.; RICE, C.; FLAMAND, M. Secretion of Flaviviral Non-Structural Protein NS1: from Diagnosis to Pathogenesis. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 233-347, 2006.

ALEXANDER, N.; BALMASEDA, A.; COELHO, I. C. B.; DIMAANO, E.; HIEN, T. T.; HUNG, N. T.; JANICH, T.; KROEGER, A.; LUM, L. C. S.; MARTINEZ, E.; SIQUEIRA, J. B.; THUY, T. T., VILLALOBOS, I.; VILLEGAS, E.; WILL, B. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. **Trop. Med. Int. Health**, v. 16, p. 936-948, 2011.

ALMOND, J.; CLEMENS, J.; ENGERS, H.; HALSTEAD, S.; KHIEM, H. B.; PABLOS-MENDEZ, A.; PERVIKOV, Y.; TRAM, T. T. Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children, 5-8 December 2001, Ho Chi Minh City, Vietnam. **Vaccine**, v. 20, p. 3043-3046, 2002.

ALVARENGA, C. F.; SILAMI, V. G.; BRASIL, P.; BOECHAT, M. E. H.; COELHO, J.; NOGUEIRA, R. M. R. Dengue during pregnancy: a study of thirteen cases. **Am. J. Infect. Dis.**, v. 5, p. 288-293, 2009.

ANDERSON, C. R.; DOWNS, W. G.; HILL, A. E. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. **Science**, v. 124, p. 224-225, 1956.

ANGIBAUD, G.; LUAUTE, J.; LAILLE, M.; GAULTIER, C. Brain involvement in dengue fever. **J. Clin. Neuroscience**, v. 8, p. 63-65, 2001.

ANONYMUS. Dengue 3 in Central America. Summary. San Juan, Puerto Rico. Division of Vector-Borne Infectious Diseases (CDC). **Dengue Surveillance**, v. 70, p.4, 1995.

ARYA, S. C.; AGARWAL, N. Concurrent dengue fever and bacterial septicemia during the 2008 dengue outbreak in Delhi. **Dengue Bulletin**, v. 32, p. 226-227, 2008.

ASHBURN, P. M.; CRAIG, C. F. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. **J. Infect. Dis.**, v. 4, p. 440-475, 1907.

ARAGÃO, R. E. M.; BARREIRA, I. M. A.; LIMA, L. N. C.; RABELO, L. P.; PEREIRA, F. B. A. Bilateral optic neuritis after dengue viral infection: case report. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 73, p. 175-178, 2010.

ARAÚJO, F. M. C.; NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; RAMALHO, I. L. C.; RORIZ, M. L. F. S.; MELO, M. E. L.; COELHO, I. C. B. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 925-928, 2006.

ARAÚJO, F. M. C. **Vigilância virológica e sorológica de dengue no estado do Ceará nos anos de 2002 e 2003**. 2006. 140p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ARAÚJO, F. M. C.; MELO, M. E. L.; RORIZ, M. L. F. S.; MIRALLES, I. S.; RAMALHO, I. L. C.; HOLANDA, S. G. S.; VILAR, D. C. L. F., The impact of the dengue virus type 3 emergence and dengue virus type 2 re-emergence in Ceará, Brazil. In. THE SECOND INTERNATIONAL CONFERENCE ON DENGUE AND DENGUE HAEMORRHAGIC FEVER, 2., 2008, Phuket, **Abstract Book**, Phuket Tailândia, 2008. p. 296.

ARAÚJO, J. M. G.; BELO, G.; SCHATZMAYR, H. G.; SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R. Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 526-529, 2009.

BANCROFT, T. L. On the etiology of dengue fever. **Austr. Med. Gazette**, v. 25, p. 17-18, 1906.

BALMASEDA, A.; SANDOVAL, E.; PÉREZ, L.; GUTIÉRREZ, C. M.; HARRIS, E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 893-897, 1999.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue fever: a call for local, national and international action. **Lancet**, v. 372, p. 205, 2008.

BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, C. A.; AGUIAR, G. R.; BALDANZA, M. S.; BARTH, O. M.; EYER-SILVA, W. A.; PAES, M. V. Pathologic Study of a Fatal Case of Dengue-3 Virus Infection in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, p. 341-347, 2005.

BESSOF, K.; DELOREY, M.; SUN, W.; HUNSPERGER, E. Comparison of two Commercially Available Dengue Virus (DENV) NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Single Clinical Sample for Diagnosis Of Acute DENV Infection. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, p. 1513-1518, 2008.

BIELEFELDT-OHMANN, H. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. **Trends in Microbiol.**, v. 5, p. 409-413, 1997.

BHAMARAPRAVATI, N.; TUCHINDA, P.; BOONYAPAKNAVIK, P. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 61, p. 500-510, 1967.

BLACKSELL, S. D.; MAMMEN, M. P. Jr.; THONGPASEUTH, S.; GIBBONS, R. V.; JARMAN, R. G.; JENJAROEN, K.; NISALAK, A.; PHETSOUVANH, R.; NEWTON, P. N.; DAY, N. P. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. **Diagn. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 60, p. 43-49, 2008.

BRASIL, 1999. Casos notificados segundo local de residência e ano de ocorrência: Brasil e unidades federadas, 1980-1998. **Boletim Eletrônico**, ano 3. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_epi_edicao_especial.pdf>. Acesso em 10 set 2010.

BRASIL, 2002. Roteiro para capacitação de multiplicadores de agentes do Pacs/ PSF nas ações de controle da dengue. **Brasília**, 2002, p. 41(a)

BRASIL, 2002. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Brasília**, 2002, p. 203-230. (b)

BRASIL, 2005. Dengue diagnóstico e manejo clínico. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**, 2ª edição. Brasília, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria 1.405 de 29 de junho de 2006**. Institui a Rede Nacional de Serviço de Verificação de Óbito e Esclarecimento da Causa Mortis (SVO).

BRASIL, 2011a. **Inf. Epid.** Dengue, semana epidemiológica. p. 1-26.

BRASIL, 2011b. Ministério da Saúde. Nota Técnica Número 33, CGPNCD/DEVEP/SUS/MS, SMS-MANAUS. Isolamento do sorotipo DEN4 em Manaus/AM

BRITO, C. A. A.; SOBREIRA, S.; CORDEIRO, M. T.; LUCENA-SILVA, N. Acute disseminated encephalomyelitis in classic dengue. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 236-238, 2007.

BROWN, J. L.; WILKINSON, R.; DAVIDSON, R. N.; WALL, R.; LLOYD, G.; HOWELLS, J.; PASVOL, G. Rapid diagnosis and determination of duration of viremia in dengue fever using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 140-143, 1996.

BRUCE, M. G.; SANDERS, E. J.; LEAKE, J. A. D.; ZAIDEL, O.; BRAGG, S. L.; AYE, T.; SHUTT, K. A.; DESEDA, C. C.; RIGAU-PEREZ, J. G.; TAPPERO, B. A.; SPIEGEL, R. A.; ASHFORD, D. A. Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. **Acta Tropical**, v. 95, p. 36-46, 2005.

CAM, B. V.; FONSMARK, L.; HUE, N. B.; PHUONG, N.T.; POULSEN, A.; HEEGAARD, D. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 848-851, 2001.

CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. R. C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais dinâmicas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 192-196, 2007.

CARLES, G.; TALARMIN, A.; PENEAU, C.; BERTSCH, M. Dengue fever and pregnancy. A study of 38 cases in French Guiana. **J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.**, v. 29, p. 758-762, 2000.

CAVALCANTI, L. P.; COELHO, I. C.; VILAR, D.C.; HOLANDA, S. G.; ESCÓSSIA, K. N.; SOUZA-SANTOS, R. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 355-358, 2010.

CEARÁ- SECRETARIA DE SAÚDE DO CEARÁ (SESA). **Informe Semanal de Dengue**. Fortaleza, 30 de dezembro de 2005.

CEARÁ- SECRETARIA DE SAÚDE DO CEARÁ (SESA). **Informe Semanal de Dengue**. Fortaleza, 31 de dezembro de 2008.

CEARÁ- SECRETARIA DE SAÚDE DO CEARÁ (SESA). **Informe Semanal de Dengue**. Fortaleza, 15 de julho de 2011(a).

CEARÁ- SECRETARIA DE SAÚDE DO CEARÁ (SESA). **Informe Epidemiológico- Leptospirose**. Fortaleza, 31 de janeiro de 2011(b)

CEARÁ- SECRETARIA DE SAÚDE DO CEARÁ (SESA). **Nota Técnica- Doença Meningocócica**. 2011(c)

Centers for Disease Control and Prevention. Dengue type 4 infections in United States travelers to the Caribbean. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 30, p. 249-250, 1981.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Rev. Microbiol.**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANG, G. J. Molecular biology of dengue viruses. In: GUBLER, D. J., KUNO, G.(eds) **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. CAB International London, 1997. p. 175-198.

CHATURVEDI, U. C.; DHAWAN, R.; KHANNA, M.; MATHUR, A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 859-866, 1991.

CHATURVEDI, U. C.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI, E. A.; MUSTAFA, A. S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FFMS Imm. Med. Microbiol.**, v. 28, p. 183-188, 2000.

CHEN, W. J.; HWANG, K. P.; FANG, A. H. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 22, p. 659-663, 1991.

CHEN, S. H.; LIN, Y. S. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **J. Med. Virol.**, v. 69, p. 82-90, 2003.

CHIMELLI, L.; HAHN, M. D.; BARRETO NETTO, M.; RAMOS, R. G.; DIAS, M.; GRAY, F. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. **Clin. Neuropathol.**, v. 9, p. 157-162, 1990.

CHUANSUMRIT, A.; CHAIYARATANA, W.; PONGTHANAPISITH, V.; TANGNARARATCHAKIT, K.; LENTWONGRATH, 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.**, v. 27, p. 43-48, 2008.

CHUNGUE, E.; MARCHÉ, G.; PLICHART, R.; BOUTIN, J. P.; ROUX, J. Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and haemagglutination inhibition (HI) test for the detection of dengue antibodies: Prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, p. 708-711, 1989.

CLARKE, D. H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination - inhibition with arthropode - borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 7, p. 561-573, 1958.

CORDEIRO, M. T. Dengue in the state of Pernambuco, Brazil; 1995-1997. Virological, clinical and epidemiological aspects. **Vir. Rev. Res.**, v. 2, p. 112-113, 1997.

CORDEIRO, M. T. SCHATZMAYR, H. G. NOGUEIRA, R. M. R. OLIVEIRA. V. F. MELO, W. T. CARVALHO, E. F. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 605-611, 2007.

CUNHA, R. V.; MIAGOSTOVICH, M. P.; PETROLA, Z.; ARAÚJO, E. S. M.; CORTEZ, D.; POMBO, V.; SOUZA, R. V.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Retrospective study on dengue in Fortaleza, State of Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 155-159, 1998.

CZEPIELEWSKI, M. A.; ROLLIN, G. A. F. S.; CASAGRANDE, A.; FERREIRA, M. P.; FERREIRA, N. P. Tumores não hipofisários da região selar. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 49, p. 674-690, 2005.

DAHER, E.; ZANETTA, D. M.; CAVALCANTE, M. B.; ABDULKADER, R. C. Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 630-634, 1999.

DATA, S.; WATTAL, C. Dengue NS1 antigen detection: A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection. **Ind. J. Med. Microbiol.**, v. 28, p. 107-110, 2010.

DE ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; SANTOS, F. B.; CARDOSO, M. A.; BRITTO, C.; COELHO, J. M. C. O.; NOGUEIRA, R. M. R. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **J. Virol. Methods.**, v. 155, p. 34-38, 2009.

DE PAULA, S. O.; PIRES NETO, R. J.; CORREA, J. A. C. T.; ASSUMPCÃO, S. R.; COSTA, M. L. S.; LIMA, D. M.; FONSECA, B. A. L. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, p. 266-269, 2002.

DESPRÉS, P.; FLAMAND, M.; CECCALDI, P. E.; DEUBEL, V. Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. **J. Virol.**, v. 70, n. 6, p. 4090-4096, 1996.

DIAS, M. **Manual de dengue**. Secr. Est. Saúde do Rio de Janeiro, 1988; Rio de Janeiro, 40.

DOMINGUES, R. B.; KUSTER, G. W.; ONUKI-CASTRO, F. L.; SOUZA, V.A.; LEVI, J. E.; PANNUTI, C. S. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **J. Neur. Scienc.**, v. 267, p. 36-40, 2008.

DOMINGUES, R. B.; TEIXEIRA, A. L. Management of Acute Viral Encephalitis in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 13, p. 433-439, 2009.

DUONG, V.; LY, S.; ONG, S.; CGROEUNG, N.; TRY, P. L.; DEUBEL, V.; VONG, S.; BUCHY P. Variation of dengue NS1 antigen measured by commercial ELISA kit in various forms of dengue infections and assessment of the association between NS1 level and disease severity. **BMC Proceedings**, v. 5, p. 47, 2011.

DUSSART, P.; LABEAU, B.; LAGATHU, G.; LOUIS, P.; NUNES, M. R. T.; RODRIGUES, S. G.; 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.**, v. 13, p. 1185-1189, 2006.

DUSSART, P.; PETIT, L.; LABEAU, B.; BREMAND, L.; LEDUC A.; MOUA, D.; MTHEUS, S.; BARIL, L. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2 (e280), p. 1-9, 2008.

EDELMAN, R. Review Dengue vaccines approach the finish line. **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, p. 56-60, 2007.

ESTEVAS, L.; VARGAS, C. Influence of vertical and mechanical transmission on the dynamics of dengue disease. **Mathematical Biosciences**, v. 167, p. 51-64, 2000.

FARRAR, J.; FOCKS, D.; GUBLER, D.; BARRERA, R.; GUZMAN, M. G.; SIMMONS, C.; KALARANOROOI, S.; LUM, L.; MCCALL, P. J.; LLOYD, L.; HORSIEG, O.; DAVAL-DRAGER, R.; NATHAN, M. B.; KROEGER, A. Towards a global dengue research agenda. **Trop. Med. Int. Health**, v. 12, p. 695-699, 2007.

FERREIRA, M. L. B.; CAVALCANTI, C. G.; COELHO, C. A.; MESQUITA, S. O. Manifestações Neurológicas de Dengue - Estudo de 41 casos. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 63, p. 488-493, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. **Virus Rev. e Res.**, v. 1, p. 9-16, 1996.

FIGUEIREDO, L. T. M.; BATISTA, W. C.; IGARASHI, A. Detection and identification of dengue virus isolates from Brazil by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 39, p. 79-83, 1997.

FIGUEIREDO, L. T. M. The brazilian flaviviruses. **Microbes infect.**, v. 2, p. 1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, R. M. P.; NAVECA, F. G.; BASTOS, M. S.; MELO, M. N.; VIANA, S. S.; MOURÃO, M. P. G.; COSTA, C. A.; FARIAS, I. P. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, p. 667-669, 2008.

FRANCO, O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. **Rev. Brasil. de Malariologia e Doenças Trop.**, v. 13, p. 43-48, 1961.

FRANCO, O. História da febre amarela no Brasil. **Ministério da Saúde, RG, Brasil**, 1969.

GEORGE, R.; LIAM, C. K.; CHUA, C. T.; LAM, S. K.; PONG, T.; GEETHAN, R.; FOO, L. S. Unusual clinical manifestations of dengue virus infection. **WHO Dengue Newsl.**, v. 14, p. 40-41, 1989.

GEORGE, R.; LAM, S. K. Dengue virus infection-the Malaysian experience. **Ann. Acad. Med. Sing.**, v. 26, p. 815-819, 1997.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **B.M.J.**, v. 324, p. 1563-1566, 2002.

GRAHAM, H. The dengue: a study of its pathology and mode of propagation. **J. Trop. Med.**, v. 6, p. 209, 1903.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 158-165, 1984.

GUBLER, D. J.; SATHER, G. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: A. Homma and J. F. Cunha (ed.), **Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue**, p. 291-322, 1988.

GUBLER, D. J. Dengue/Dengue hemorrhagic fever in the Americas: prospects for the year 2000. In: Halstead S. B., Gomez-Dantes H. Dengue: a worldwide problem, a common strategy. **Proceedings of the international conference on dengue and *Aedes aegypti* community-based control. Merida, México**, v. 16, p. 19-27, 1992.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas. In: World Health Organization, regional office for South-East Asia, New Deli. **Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever**. Regional Publication, 1993; SEARO 22: 9-22.

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

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ and Kuno G (eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. 1997; CAB international: New York USA. Chapter 1: 1-21.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J, MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Adv. Virus Res.**, v. 53, p. 35-70, 1999.

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

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flavivirus. In: Knipe, D. M., Howley, P. M. *Fields Virology 2007*. Lippincott Williams & Wilkins. 5th ed. USA. Chapter 34: 1152-1252.

GULATI, S.; MAHESHWARI, A. Atypical manifestations of dengue. **Trop. Med. Intern. Health.**, v. 12, p. 1087-1095, 2007.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G.; MORIER, L.; SOLER, M.; FERNÁNDEZ, A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. **PAHO Bull.**, v. 18, p. 213-220, 1984.

GUZMÁN, M. G.; ALVAREZ, M.; RODRIGUEZ, R.; ROSARIO, D.; VAZQUES, S.; VALDES, L.; CABRERA, M. V.; KOURI, G. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 3, p. 130-135, 1999.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet**, v. 2, p. 32-42, 2002.

GUZMÁN, M. G.; JAENISCH, T.; GACZKOWSKI, R.; HANG, V. T. T.; SEKARAN, S. D.; KROEGER, A.; VAZQUEZ, S.; RUIZ, D.; MARTINEZ, E.; MERCADO, J. C.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E.; DIMANO, E.; LEANO, P. S. A.; YOKSAN, S.; VILLEGAS, E.; BENDUZU, H.; VILLALOBOS, I.; FARRAR, J.; SIMMONS, C. P. Multi-Country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 4, e811, 2010.

GUY, B.; GUIRAKHOS, F.; BARBAN, V.; HIGGS, S.; MONATH, T. P.; LANG, J. Preclinical and clinical development of YFV 17D- based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. **Vaccine**, v. 28, p. 632-649, 2010.

GUY, B.; ALMOND, J.; LANG, J. Dengue vaccine prospects: a step forward. **Lancet**, v. 377, p. 381-382, 2011.

HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever - A public health problem and a field for research. **Bull. WHO.**, v. 58, p. 1-21, 1980.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to molecular Biology. **Science.**, v. 239, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S. B.; DEEN, J. The future of dengue vaccines. **Lancet**, v. 360, p. 1243-1245, 2002.

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

HALSTEAD, S.B. Antibodies determine virulence in dengue. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1171, p. E48-56, 2009.

HAMMON, W. M. C. D.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 31, p. 1102-1103, 1960.

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

HENDARTO, S. K.; HADINEGORO, S. R. Dengue encephalopathy. **Acta. Paediatr. Jpn.**, v. 34, p. 350-357, 1992.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, JR. The Dengue Viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 376-396, 1990.

HOMMEL, D.; TALARMIN, A.; DEUBEL, V.; REYNES, J. M.; DROUET, M. T.; SARTHOU, J. L.; HULIN, A. Dengue encephalitis in French Guiana. **Rev. Virology**, v. 149, p. 235-238, 1998.

HUERRE, M. R.; LAN, N. T.; MARINEAU, P.; HUE, K., HUNG, N. T.; KHEN, N. T.; DROUET, M. T.; HUONG, V. T. Q.; HA, D. Q.; BUISSON, Y.; DEUBEL, V. Liver histopathology and biological correlates in Five cases of fatal dengue in Vietnamese children. **Virchows Arch.**, v. 438, p. 107-115, 2001.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 40, p. 531-544, 1978.

INNIS, B. L.; ECKELS, K. H. Progress in development of a live-attenuated, tetravalent dengue virus vaccine by the United States army medical research and material command. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, p. 1-4, 2003.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2006.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>.

JACKSON, S. T.; MULLINGS, A.; BENNETT, F.; KHAN, C.; GORDON-STRACHAN, G.; RHODEN, T. Dengue infection in Patients Presenting with neurological manifestations in a dengue endemic population. **West Indian Med. J.**, v. 57, p. 373-376, 2008.

KAMATH, S. R.; RANJIT, S. Clinical Features, Complications and Atypical Manifestations of Children with Severe forms of Dengue Hemorrhagic Fever in South India. **Indian J. Pediatrics**, v. 73, p. 889-895, 2006.

KHANNA, A.; ATAM, V.; GUPTA, A. A Case of Dengue Encephalitis with Intracerebral Hemorrhage. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 3, p. 206-207, 2011.

KIDWAI, A. A.; JAMAL, Q.; MEHRUNNISA, S.; FAROOQI, F-R.; SALEEM-ULLAH. Serodiagnosis of dengue infection using rapid immunochromatography test in patients with probable dengue infection. **J. Paq. Med. Assoc.**, v. 60, p. 936-939, 2010.

KNIGHT, K. L.; STONE, A. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). **The Thomas Say Foundation**, v. VI, p. 611, 1977.

KO, A.; GALVÃO R. M.; RIBEIRO D. C. M., JOHNSON, W. D Jr.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v. 354, p. 820-825, 1999.

KOURI, G.; GUZMAN, M. G.; BRAVO, J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. **Bull. PAHO.**, v. 20, p. 24-30, 1986.

KOURI, G.; GUZMAN, M. G.; BRAVO, J. Why dengue hemorrhagic fever in Cuba? II. An integral analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 821-823, 1987.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. **Cell**, v. 108, p. 717-725, 2002.

KULARATNE, S. A. M.; PATHIRAGE, M. M. K.; GUNASENA, S. A case series of dengue fever with altered consciousness and electroencephalogram changes in Sri Lanka. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 1053-1054, 2008.

KUMAR, R.; TRIPATHI, S.; TAMBE, J. J.; ARORA, V.; SRIVASTAVA, A.; NAG, V. L. Dengue encephalopathy in children in Northern India: Clinical Features and Comparison with non dengue. **J. Neurol. Sciences**, v. 269, p. 41-48, 2008.

KUMAR, R.; PRAKASH, O.; SHARMA, B. S. Intracranial hemorrhage in dengue fever: management and outcome: A series of 5 cases and review of literature. **Surg. Neurol.**, v. 72, p. 429-433, 2009.

KUMARASAMY, V.; WALAB, A. H.; CHUA, S. K.; HASSAN, Z.; CHEM, Y. K.; MOHAMAD, M.; CHUA, K. B. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. **J. Virol. Methods.**, v. 140, p. 75-79, 2007(a).

KUMARASAMY, V.; CHUA, S. K.; HASSAN, Z.; WALAB, A. H.; CHEM, Y.K.; MOHAMAD, M.; CHUA, K. B. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. **Singapore Med. J.**, v. 48, p. 669-673, 2007 (b).

KUNO, G. Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grown in a serum free-medium. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, p. 851-855, 1982.

KUNO, G.; GÓMEZ, I.; GUBLER, D. J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme - linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 36, p. 153-159, 1987.

KUNO, G.; CROPP, C. B.; WONG-LEE, J.; GUBLER, D. J. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 757-762, 1998.

KUNO, G. Emergence of the Severe Syndrome and Mortality Associated with Dengue and Dengue-Like Illness: Historical Records (1890 to 1950) and Their Compatibility with Current Hypotheses on the Shift of Disease Manifestation. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, p. 186-201, 2009.

LAM, S. K.; CHEW, C. B.; POON, G. K.; RAMALINGAM, S.; SEOW, S. C.; PANG, T. Isolation of dengue viruses by intracerebral inoculation of mosquito larvae. **J Virol Methods**, v. 14, p. 133-140, 1986.

LAM, S. K.; DEVI, S.; PANG, T. Detection of specific IgM in dengue infections. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.**, v. 18, p. 532-538, 1987.

LAM, S. K. Dengue infections with central nervous system manifestations. **Neurol. J. Southeast Asia**, v. 1, p. 3-6, 1996.

LAM, S. K.; DEVINE, P. L. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. **Clin. Diag. Virol.**, v. 10, p. 75-81, 1998.

LAM, S. K.; EW, C. L.; MITCHELL, J. L.; CUZZUBBO, A. J.; DEVINE, P. L. Evaluation of a capture screening enzyme linked immunosorbent assay for combined determination of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 7, p. 850-852, 2000.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORNDAM, V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 545-551, 1992.

LANCIOTTI, R. S.; LEWIS, J. G.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and epidemiology of dengue 3 viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 65-75, 1994.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 2279-2286, 1997.

LANCIOTTI, R. S. Molecular amplification assays for the detection of flavivirus. **Adv. Virus Res.**, v. 61, p. 67-99, 2003.

LAPPHRA, K.; SANGCHARASWICHAI, A.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; TIEGRIM, S.; PIRIYAKARNSAKUL, W.; CHACON, P.; YOKSAN, S.; WATTANAMONGKOLSIL, L.; THAMLIKITKUL, V. Evaluation of an NS1 Antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diag. Microbiol. Inf. Dis.**, v. 60, p. 387-391, 2008.

LEÃO, R. N. Q.; OIKAWA, T.; ROSA, E. S. T.; YAMAKI, J. T.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, H. B.; SOUSA, M. R.S.; TSUKIMATA, J. K.; AZEVEDO, R. S. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Isolation of dengue 2 virus from a patient with central nervous system involvement (transverse myelitis). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 401-404, 2002.

LEE, I. K.; LIU, J. W.; YANG, K. D. Clinical characteristics and risk factors for concurrent bacteremia in adults with dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 221-226 2005.

LETSON, G. W., Dengue surveillance in preparation for field vaccine trials. **J. Clin. Virol.**, v. 46, p. 10-12, 2009.

LEWIS, J. G.; CHANG, G. J.; LANCIOTTI, R. S.; KINNEY, R. M.; MAYER, L. M.; TRENT, D. W. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology**, v. 197, p. 216-224, 1993.

LIBRATY, D. H.; YOUNG, P. R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the development of Dengue Hemorrhagic Fever. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1165-1168, 2002.

LIMA, J. T. F. Risco de urbanização da febre amarela no Brasil. **Cad. S. Púb. RJ**, v.1, p. 377-384, jul/set 1985.

LIMA, M. R. Q.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHTZMAYER, H. G.; SANTOS, F. B. Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p.e738, 2010.

LIMA, M. R. Q.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHTZMAYER, H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; LIMONTA, D.; SANTOS, F. B. A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e1147, 2011.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. **Virology**. 2001. 4^a edition. Philadelphia; Lippincott - Williams & Wilkins: 991-1041.

LUM, L. C. S.; LAM, S. K.; GEORGE, S.; DANI, S. Fulminant hepatitis in dengue infection. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 24, p. 467-470, 1993.

LUM, L. C. S.; LAM, S. K.; CHOY, Y. S.; GEORGE, R.; HARUN, F. Dengue encephalitis: a true entity? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 256-259, 1996.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, p. 232-240, 1996.

MALHOTRA, N.; CHANANA, C.; KUMAR, S. Dengue infection in pregnancy. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 94, p. 131-132, 2006.

MARIANO, F. A dengue: considerações a respeito de sua incursão no Rio Grande do Sul em 1916. **Arch. Bras. Med.**, v. 7, p. 272-277, 1917.

MARTÍNEZ, E. **Dengue**. 20^a ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. 344p.

MARZOCHI, K. B. F. Dengue in Brazil: Situation, transmission and control – A proposal for ecological control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 89, p. 235-245, 1994.

MASON, P. W.; MCADA, P. C.; MASON, T. L.; FOURNIER, M. J. Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. **Virology.** v. 161, p. 262-267, 1987.

MATLANI, M.; CHAKRAVARTI, A.; RAWAL, A.; KASHYAP, B.; GURTOO, A. Dengue encephalitis: an entity now common in dengue-prone regions. **Trop. Doct.**, v. 39, p. 115-116, 2009.

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

MCCLOUD, T. G.; CARDIFF, R. D.; BRANDT, W. E.; CHIEWSILP, D.; RUSSEL, P. K. Separation of dengue strains on the basis of a nonstructural antigen. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 20, p. 964-968, 1971.

MELO, F. L.; ROMANO, C. M.; ZANOTTO, P. M. A. Introduction of Dengue Virus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. e390, 2009.

MÉNDEZ, A.; GONZÁLEZ, G. Manifestaciones clínicas inusuales del dengue hemorrágico en niños. **Biomédica**, v. 26, p. 61-70, 2006.

MIAGOSTOVICH, M. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; CAVALCANTI, S. M. B.; MARZOCHI, K. B. F.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue epidemic in the State of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 35, p. 149-154, 1993.

MIAGOSTOVICH, M. P.; RAMOS, R. G.; NICOL, A. F.; NOGUEIRA, R. M. R.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V.; MARCHEVSKY, R. S.; MESQUITA, R. P.; SCHATZMAYR, H. G. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin. Neuropath.**, v. 16, p. 204-208, 1997.

MIAGOSTOVICH, M. P.; VORNDAM, V.; ARAÚJO, E. S. M.; SANTOS, F. B.; SCHATZMAYR, H. G.; ARAÚJO, E. S. M. Evaluation of IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **J. Clin. Virol.**, v. 14, p. 183-189, 1999.

MISRA, U. K.; KALITA, J. Spectrum of Neurological Manifestations of Dengue in India. **Dengue Bull.**, v. 30, p. 107-113, 2006.

MONATH, T. P.; HEINZ, F. X. Flavivirus. In Fields BN, knipe, DM, Howely PM. **Virology.** 1995; 31: 961-1054. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia-New York-USA.

MORITA, K.; TANAKA, M.; IGARASHI, A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2107-2110, 1991.

MOURA, P.; CORDEIRO, M. T.; BRITO, C.; LIMA FILHO, J. L.; ARRAES, L. C. Neurological aspects of the dengue infection in Brazilian patients during the DENV 3 epidemics. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.**, v. 49, p. 115-118, 2004.

MURTHY, J. M. K. Acute disseminated encephalomyelitis. **Neurol. India**, v. 50, p. 238-243, 2002.

MURTHY, J. M. K. Neurological complications of dengue infection. **Neurol. India**, v. 58, p. 581-584, 2010.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R. G.; RICE, C. M. Genetic analysis of yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature sensitive mutation with blocks RNA accumulation. **J. Virol.**, v. 71, p. 291-298, 1997.

MUZAFFAR, J.; VENKATA KRISHNAN, P.; GUPTA, N.; KAR, P. Dengue encephalitis: why we need to identify this entity in a dengue-prone region. **Singapore Med. J.**, v. 47, p. 975-977, 2006.

NGUYEN, T. L.; NGUYEN, T. H.; TIEU, N. T. The impact of dengue hemorrhagic fever on liver function. **Res. Virology.**, v. 148, p. 273-277, 1997.

NIMMANNITYA, S.; THISYAKORN, U.; HEMSRICHART, V. Dengue haemorrhagic fever with unusual manifestations. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 18, p. 398-406, 1987.

NOGUEIRA, R. M. R., SCHATZMAYR, H. G., MIAGOSTOVICH, M. P., FARIAS, M. F. D. B., FARIAS FILHO, J. C. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 219-225, 1988.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; SCHATZMAYR, H. G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 85, p. 253, 1990.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G.; MORAES, G. C.; CARDOSO, F. M. A.; FERREIRA, J.; CERQUEIRA, V.; PEREIRA, M. Dengue type 2 outbreak in the South of the State of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, p. 507-510, 1995.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; CUNHA, R. V.; ZAGNE, S. M. O.; GOMES, F. P.; NICOL, A. F.; COELHO, J. C. O.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue fatal cases in primary infections in Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 4, p. 418, 1999 (a).

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G.; ARAÚJO, E. S. M.; SANTOS, F. B.; FILIPPIS, A. M. B.; SOUZA, R. W.; ZAGNE, S. M. O.; NICOLAI, C.; BARAN, M.; TEIXEIRA FILHO, G. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 94, p. 297-304, 1999 (b).

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, p. 205-211, 2000.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M. B.; PEREIRA, M. A. S.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 96, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R.; FILIPPIS, A. M. B.; COELHO, J. M. O.; SEQUEIRA, P. C.; SCHATZMAYR, H. G.; PAIVA, F. G.; RAMOS, A. M. O.; MIAGOSTOVICH, M. P., Dengue virus infection of the central nervous systems (CNS): a case report from Brazil. **South. Asian J. Trop. Med. Public. Health**, v. 33, p. 68-71, 2002.

NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; SANTOS, F. B.; CUNHA, R. V.; COELHO, J. O.; SOUZA, L. J.; GUIMARÃES, F. R.; ARAÚJO, E. S. M.; DE SIMONE, T. S.; BARAN, M.; TEIXEIRA, JR., G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 9, p. 1376-1381, 2005.

NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue virus in Brazil, 1986-2006. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 22, p. 358-363, 2007.

NORONHA, M. C. C.; RIEDEL, O. O.; SOUZA NETO, B. A. S.; CHAVES, F. T. L.; SOUZA, B. T. Inquérito sorológico de leptospirose em Canindé, Ceará, Brasil. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 23, p. 21-24, 1991.

ONG, A.; SANDAR, M.; CHEN, M. I.; SIN, L. Y. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. **Intern. J. Infect. Dis.**, v. 11, p. 263-267, 2007.

OOI, E. E.; GOH, K. T.; GUBLER, D. J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 887-893, 2006.

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TANG, A. T.; AMARAL, R. S.; PASSOS, A. D. C.; TAUIL, P. L. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota Prévia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, p. 53-54, 1983.

PANCHAROEN, C.; THISYAKORN, U. Neurological manifestations in dengue patients. **Se. Asian J. Trop. Med.**, v. 32, p. 341-345, 2001.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Dengue in the Americas: 1980-87. **Epidemiol. Bull.**, v.10, p. 1-8, 1989.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Re-emergence of dengue in the Americas. **Epidemiol. Bull.** V. 18, p. 1-7, 1997.

PATEY, O. O. L.; BREUIL, J.; LAFAIX, C. Unusual neurological manifestations occurring during dengue fever infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** V. 48, p. 793-802, 1993.

PEDRO, A. O. Dengue em Nictheroy. **Brazil-Mexico**, v. 37, p. 173-177, 1923.

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

PINHEIRO, F. P.; CHUIT, R. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. **Infect. Med.**, v. 15, p. 244-251, 1998.

PONTE, H. J.; PUCCI, F. H.; MOREIRA FILHO, H. F.; TEÓFILO, C. R.; PIRES NETO, R.da J. Avaliação de manifestações dolorosas em pacientes internados em hospital de referência, com diagnóstico provisório de dengue. **Rev. Dor**; v. 12, p. 104-107, 2011.

PUCCIONE-SOHLER, M.; SOARES, C. N.; PAPAIZ-ALVARENGA, R.; CASTRO, M. J. C.; FARIA, L. C.; PERALTA, J. M. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. **Neurology**, v. 73, p. 1413-1417, 2009.

RAMIREZ, A. H.; MOROS, Z.; COMACH, G.; ZAMBRANO, J.; BRAVO, L.; PINTO, B.; VIELMA, S.; CARDIER, J.; LIPRANDI, F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. **Diag. Infect. Dis.**, v. 65, p. 247-253, 2009.

RAMOS, C.; SÁNCHEZ, G.; PANDO, R. H.; BAQUERA, J.; HERNÁNDEZ, D.; MOTTA, J.; RAMOS, J.; FLORES, A.; UAUSÁS, E. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. **J. Neurovirol.**, v. 4, p. 465-468, 1998.

RANDOLPH, V. B.; WINKLER, G.; STOLLAR, V. Acidotrophic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. **Virology**, v. 174, p. 450-458, 1990.

REIS, T. J. A febre dengue em Curityba. **Gaz. Med. Bahia**, v. 4, p. 263-266, 1896.

RICE, C. M.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Structure of the flavivirus genome. In: Schlesinger S and Schlesinger M. **Togaviruses and flaviviruses**. (eds) N. York: Plenum Publishing Corp. 1986. p. 279-326.

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

RICO-HESSE, R. Microevolution and Virulence of Dengue Viruses. **Adv. Virus Res.**; v. 59, p. 315-341, 2003.

RIGAU-PÉREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P.; SANDERS, E. J.; VORNDAM, A. V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, p. 971-977, 1998.

RIGAU-PÉREZ, J. G.; VORNDAM, A. V.; CLARK, G. G. The dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico, 1994-1995. **Am J Trop Med Hyg**, v. 64, p. 67-74, 2001.

RIGAU-PÉREZ, J. G.; LAUFER, M. K. Dengue-Related Deaths in Puerto Rico, 1992-1996: Diagnosis and Clinical Alarm Signals. **Clin. Infect. Dis.** V. 42, p. 1241-1246, 2006.

RIO DE JANEIRO. Secretaria de Estado da Saúde e Defesa Civil. **Relatório de casos de dengue 2008**; Rio de Janeiro.

ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, p. 55-57, 2001.

RODHAIN, F.; ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: Gubler DJ, Kuno G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever** (eds) CAB International, New York, 1997; cap.3, p. 45-60.

ROSEN, L.; ROZEBOOM, L. E.; SWEET, B. H.; SABIN, A. B. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, p. 878-882, 1954.

ROSEN, L.; GUBLER, D. J. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, p. 1153-1160, 1974.

ROSEN, L. The emeror's new clothes revisited or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, p. 337-343, 1977.

ROSEN, L.; DROWET, M.T.; DEUBEL, V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 720-724, 1999.

ROTHMAN, A. L. Viral pathogenesis of infection. In: Gubler D J. & Kuno G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. 1997; Wallingford. CAB International, p. 245-271.

ROW, D.; WEINSTEIN, P.; MURRAY-SMITH, S. Dengue fever with encephalopathy in Australia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 253-255, 1996.

RUSSELL, P. K.; MCCOWN, J. M. Comparison of dengue 2 and dengue 3 virus strains by neutralization tests and identification of a serotype of dengue 3. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, v. 21, p. 97-99, 1972.

SABIN, A. B.; SCHELINGER, R. W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v. 101, p. 640-642, 1945.

SANDERS, E. J.; RIGAU-PÉREZ, J. G.; SMITS, H. L.; DESEDA, C. C.; VORNDAM, V. A.; AYE, T.; SPIEGEL, R. A.; WEYANT, R. S.; BRAGG, S. L. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1966. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 399-404, 1999.

SALGADO, D. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; GARZ'PN, M.; CIFUENTES, G.; IBARRA, M.; VEGA, M. R.; CASTRO, D. Caracterización clínica y epidemiológica de dengue hemorrhagic fever in Neiva, Colombia, 2004. **Rev Salud Pública**, v. 9, p. 53-63, 2007.

SANG, C. T.; HOON, L. S.; CUZZUBBO, A.; DEVINE P. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of dengue virus infection. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 407-409, 1998.

SANGUASERMSRI, T.; PONEPRASERT, B.; PORNPHUTKUL, B. Acute encephalopathy associated with dengue infection. **Bankok: Searmeo Tropmed.**, p. 10-11, 1976.

SANTOS, N. Q.; AZOUBEL, A. C. B.; LOPES, A. A.; COSTA, G.; BACELLAR, A. Síndrome de Guillain-Barré no curso de dengue: relato de caso. **Arq. Neuro-Psiq.**, v. 62, p. 144-146, 2004.

SÃO PAULO, Informes Técnicos Institucionais. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, p. 748-750, 2006.

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

SERAKAN, S.D.; LAN, E.C.; MAHESAWARAPPA, B.K.; APPANNA, R.; SUBRAMANIAN, G. Evaluation of a Dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of Dengue. **J. Infect. Developing Countries**, v. 1, p. 182-188, 2007.

SILER, J. F.; HALL, M.; HITCHENS, A. P. Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philipp. J. Sci.**, v. 29, p. 1-302, 1926.

SINGHASIVANON, P.; JACOBSON, J. Dengue is a major global health problem. Foreword. **J. Clin. Virol.**, v. 46, p. 1-2. 2009.

SIONG, W. C.; CHING, T. H.; JANG, G. C., PANG, C. S.; VERNON, L. J. M.; SIN, L. Y. Dengue infection in HIV patients. **Se A J. Trop. Med.**, v. 39, p. 260-265, 2008.

SIQUEIRA-JR. J. B.; MARTELLI C. M. T.; COELHO, G. E.; SIMPLICIO, A. C. R.; HATCH, D. L. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 48-53, 2005.

SOARES, C. N.; FARIA, L. C.; PUCCIONI-SOHLER, M.; PERALTA, J. M.; FREITAS, M. R. G. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. **J Neurol Sci.**, v. 249, p. 19-24, 2006.

SOARES, C. N.; CABRAL-CASTRO, M. J.; OLIVEIRA, C.; FARIA, L. C.; PERALTA, J. M.; FREITAS, M. R. G.; PUCCIONI-SOHLER, M. Oligosymptomatic dengue infection: A potential cause of Guillain Barré syndrome. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 66, p. 234-237, 2008.

SOARES, C. N.; CABRAL-CASTRO, M. J.; PERALTA, J. M.; FREITAS, M. R. G.; PUCCIONI-SOHLER, M. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: Report of a case. **Intern. J. Infect. Dis.**, v. 14, p. e150-e152, 2010.

SOARES, C. N.; CABRAL-CASTRO, M. J.; PERALTA, J. M.; FREITAS, M. R. G.; PUCCIONI-SOHLER, M. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. **J. Neurol. Sci.**, v. 303, p. 75-79, 2011.

SOARES-MORENO, S. A; MATTA, A P. C.; CARDOSO DE ALMEIDA, A; ARTAL, F. J. C.; AGUILERA-DE FREITAS, V. Complicaciones neurológicas de la infección por el virus dengue. **Rev de Neurología**, v. 39, n. 3, p. 233-237, 2004.

SOLOMON, T.; DUNG, N. M.; VAUGHN D. W.; KNEEN, R.; THAO, L. T.; RAENGSAKULRACH, B.; LOAN, H. T.; DAY, N. P.; FARRAR, J.; MYINT, K. S.; WARRELL, M. J.; JAMES, W. S.; NISALAK, A.; WHITE, N. J. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, v. 355, p. 1053-1059, 2000.

SOUSA, A. M. **Manifestações neurológicas em surto de dengue no Estado de Rondônia.** 2006. Dissertação 23, (Mestrado em Neurologia)- UNIRIO, Rio de Janeiro, 2006.

SOUZA, L. J.; MARTINS, A. L. O.; PARAVIDINE, P. C. L.; NOGUEIRA, R. M. R.; GICOVATE NETO, C.; BASTOS, D. A.; SIQUEIRA, E. W. S.; CARNEIRO, R. C. Hemorrhagic Encephalopathy in Dengue Shock Syndrome: A Case Report. **Brazilian J. Infect. Dis.**, v. 9, p. 257-261, 2005.

SOUZA, R. V.; CUNHA, R. V.; MIAGOSTOVICH, M. P.; TIMBO, M. J.; ARAUJO, F. M. C.; PAULA PESSOA, T. F.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H.G. An outbreak of dengue in the state of Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 345-346, 1995.

SUHARTI, C.; VAN GORP, E. C.; SETIATI, T. E.; DOLMENS, W. M.; DJOKOMOELJINTO, R. J.; HACK, C. E.; TEM, C. H.; VAN DER MEER, J. W. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. **Thromb. Haemat.**, v. 87, n. 1, p. 42-46, 2002.

SUMARMO, WULUR, H.; JAHJA, E.; GUBLER, D. J.; SUHARYONO, W.; SORENSEN, K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. **Bulletin WHO**, v. 61, p. 693-701, 1983.

SUNDARAM, C.; UPPIN, S. G.; DAKSHINAMURTHY, K. V.; BORGAHAIN, R. Acute disseminated encephalomyelitis following dengue hemorrhagic fever. **Neurol. India**, v. 58, p. 599-601, 2010.

TAN, P.C.; RAJASIGAM, G.; DEVI S.; OMAR, S. Z. Dengue infection in pregnancy. Prevalence, vertical transmission and pregnancy outcome. **Obstet. Gynecol.**, v. 111, p. 1111-1117, 2008.

TEIXEIRA, G.M.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, M.L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saúde Pub. Rio de Janeiro**, v. 25, p. 517-518, 2009.

TEYSSOU, R. Dengue fever: from disease to vaccination. **Med Trop.** v. 69, p. 333-334, 2009.

THEIN, S.; AUNG, M. N.; SHWE, T. N.; AYE, M.; ZAW, A.; AYE, K. M.; AASKOV, J. Risk factors in dengue shock syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 56, p. 566-572, 1997.

THISYAKORN, U.; THISYAKORN, C. Dengue infection with unusual manifestations. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 77, p. 410-413, 1994.

THISYAKORN, U.; THISYAKORN, C.; LIMPITIKUL, W.; NISALAK, A. Dengue infection with central nervous system manifestations. **Se. A. J. Trop. Med.**, v. 30, p. 504-506, 1999.

TRENT, D. W.; GRANT, J. A.; ROSEN, L.; MONATH, T. P. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. **Virology**, v. 128, p. 271-284, 1983.

TRENT, D. W.; MANSKE, C. L.; FOX, G. E.; CHU, M. C.; KLIKS, S. C.; MONATH, T. P. The molecular epidemiology of dengue viruses: genetic variation and microevolution. In: Kurstak E, Marusky RG, Regenmortel MHV. **Virus variation and epidemiology**; Applied Virol. Res., New York: Plenum Press, 1990. Vol. 2.

UEHARA, P. M.; CUNHA, R. V.; PEREIRA, G. R. O L.; OLIVEIRA, P. A Envolvimento hepático em pacientes com dengue hemorrágico: manifestação rara? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 544-547, 2006.

VARMA, M. G. R.; PUDNEY, M.; LEAKE, C. J. Cell lines from larvae of *Aedes (Stegomyia) malyensis* Colless and *Aedes (S) pseudocutellaris* (Theobald) and their infection with some arboviroses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, p. 374-382, 1974.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; FREITAS, R. B. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaia, Tocantins, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 35, p. 141-148, 1993.

VASCONCELOS, P. F. C.; MENEZES, D. B.; MELO, L. P.; PESSOA, E. T. F.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TIMBO, M. J.; COELHO, I. C. B.; MONTENEGRO, F.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; ANDRADE, F. M. O.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State Brazil, 1994. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 37, p. 253-255, 1995.

VASCONCELOS, P. F. C.; LIMA, J. W. O.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. A.; TIMBO, M. J.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; LIMA, H. A.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. **Rev. Saúde Públ.**, v. 32, p. 447-454, 1998 (a).

VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, A. P. A. T.; COELHO, I. C. B.; MENEZES, D. B.; ROSA, E. S. T.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, J. F. S. T. Involvement of the central nervous system in dengue fever: three serologically confirmed cases from Fortaleza, Ceará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 40, p. 35-39, 1998 (b).

VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; SOLOMON, T.; KALAYANAROOJ, S.; DUNG, N. M.; KNEEM, R.; CUZZUBBO, A.; DEVINE, P. L. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, p. 693-698, 1999.

VAUGHN, D. W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T. P.; RAENGSAKUBIACK, B.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A.;

NISALAK, A., Dengue viremia titer, antibody response pattern and virus serotype correlate with disease severity. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 2-9, 2000.

VERMA, R., VARATHARAJ, A. Epilepsia partialis continua as a manifestation of dengue encephalitis. **Epilepsy & Behavior**, v. 20, n. 2, 395-397, 2011.

VORNDAM, V.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRENT, D. W. Restriction enzyme analysis of american region dengue viruses. **Arch. Virol.**, v. 136, p. 191-196, 1994.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G. (eds) **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. 1997; CAB International: Wallingford, USA.

XU, H.; DI, B.; PAN, Y. X.; QIU, L. W.; WANG, Y. D.; HAO, W.; HE, L. J.; YUEN, K. Y.; CHE, X. Y. 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.**, v. 44, p. 2872-2878, 2006.

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A.D.T.; WATOWICH, S. J.; GUBLER, D.J.; WEAVER, S. C. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J. Virol.**, v. 74, p. 3227-3234, 2000.

WASAY, M.; CHANNA, R.; JUMANI, M.; SHABBIR, G.; AZEEMUDDIN, M.; ZAFAR, AFIA. Encephalitis and myelitis associated with dengue viral infection – Clinical and neuroimaging features. **Clin. Neur. and Neurosurg.**, v. 110, p. 635-640, 2008.

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

WEBSTER, D. P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. **Lancet Infect. Dis.**, v. 9, p. 678-687, 2009.

WESTAWAY, E. G.; BRINTON, M. A.; GAIDAMOVICH, S. Y.; HORZINEK, M. C.; IGARASHI, A.; KAARIAINEN, L.; LVOV, D. K.; PORTERFIELD, J. E.; RUSSELL, P. K.; TRENT, D. W. Flaviviridae. **Intervirology**, v. 24, p. 183-192, 1985.

WILLS, B. A.; ORAGUI, E. E.; STEPHANS, A. C.; DARAMOLA, O. A.; DUNG, N. M.; LOAN, H. T.; CHAU, N. V.; CHAMBERS, M.; STEPNIWSKA, K.; FARRAR, J. J.; LEVIN, M. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: serial investigations in 187 Vietnamese children with dengue shock syndrome. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 277-285, 2002.

WIWANITKIT, V. Magnitude and pattern of neurological pathology in fatal dengue hemorrhagic fever: a summary of Thai cases. **Neuropathology**, v. 25, p. 398, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment and control. Geneva: **World Health Organization**, 1986.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. **World Health Organization**, 1997; Geneva: 2nd edition.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Break-borne fever. **Nature**, p. 416: 467, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – New edition. **World Health Organization** Press, Geneva Switzerland. 2009.

WU, S. J.; HANSON, B.; PAXTON, H.; NISALAK, A.; VAUGHN, D. W.; ROSSI, C.; HENCHAL, E. A.; PORTER, K. R.; WATTS, D. M.; HAYES, C. G. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue diagnosis. **Diag. Lab. Immunol.**, v. 4, p. 452-457, 1997.

YONG, Y. K.; CHONG, H. T.; WONG, K. T.; TAN, C. T.; DEVI, S. Aetiology of viral central nervous system infection, a Malaysian study. **Neurol. Asia**, v. 13, p. 65-71. 2008.

YOUNG, P. R.; HILDITCH, P. A.; 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.**, v. 38, p. 1053-1057, 2000.

ZAGNE, S. M. O.; ALVES, V. G. F.; NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; TAVARES, W. Dengue haemorrhagic fever in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 677-679, 1994.

ANEXOS

ANEXO I - ANÁLISE DE REGISTROS DE PRONTUÁRIOS DE DENGUE DE PACIENTES QUE EVOLUÍRAM PARA ÓBITO

Data: ____/____/____

Unidade de Saúde: _____

Atendimento SVO: _____

Dados pessoaisNome completo:

Nome da mãe/pai ou responsável: _____

Sexo: [1] Masculino [2] Feminino Data de nascimento: ____/____/____

Idade: ____

Endereço de residência: _____

Bairro: _____

Município de procedência: _____

Data de Admissão: ____/____/____

Data do Início da doença: ____/____/____

Evolução:

História prévia do caso (*Informar se os dados não constarem do prontuário*)

Houve atendimento prévio em serviço de emergência? () sim () não () não registrado

Caso referido de UBS/USF – Município /UF: Qual:
_____Caso foi transferido de outros hospitais – Município /UF:

Data do primeiro atendimento após início dos sinais e sintomas:

____/____/____

Foi referida hipótese diagnóstica para dengue? () sim () não () não registrado

Doença associada: () sim () não () não registrado

Se sim: Qual (is): () Cardiopatia () Asma () Diabetes Mellitus () DPOC*

() Outras: _____

() Febre

() Irritabilidade

() Cefaléia

() Exantema

() Dor retroorbitária

() Dor abdominal

() Mialgia

() Manifestações hemorrágicas. Qual (is)?

() Prostração

() Artralgia

() Manifestações neurológicas. Qual (is)?

() Diarréia

() Vômitos

() Outras manifestações. Qual (is)?

() Sonolência

Patologias prévias:

Cardiopatia ()sim () não ()

NR D. hematológica ()sim () não ()NR

Asma ()sim () não ()

Doença renal ()sim () não ()NR

NR

Hipertensão arterial ()sim () não ()NR

Dermatite atópica ()sim () não ()

Outras

NR

Epilepsia ()sim () não ()

—

NR

Diabetes mellitus ()sim () não ()

NR

ACHADOS DE NECRÓPSIA E / OU HISTOPATOLÓGICO

() Cérebro _____

() Fígado _____

() Coração _____

() Pulmão _____

() Baço _____

() Rins _____

() Estômago _____

() Intestino _____

IMUNO-HISTOQUÍMICO

Material: _____ **Material:** _____

Diagnóstico: _____ **Diagnóstico:** _____

ISOLAMENTO VIRAL

Material: _____ **Material:** _____

Diagnóstico: _____ **Diagnóstico:** _____

RT-PCR

Material: _____ **Material:** _____

Diagnóstico: _____ **Diagnóstico:** _____

SOROLOGIA IgM

Material: _____ **Material:** _____

Diagnóstico: _____ **Diagnóstico:** _____

ANEXO II - ANÁLISE DE REGISTRO DE PRONTUÁRIOS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE MENINGITES VIRAIS

Data: ____/____/____

Unidade de Saúde: _____

Dados pessoais

Nome completo: _____

Nome da mãe/pai ou responsável: _____

Sexo: [1] Masculino [2] Feminino Data de nascimento: ____/____/____ Idade: ____

Endereço de residência: _____

Bairro: _____

Município de procedência: _____

Data de Admissão: ____/____/____

Data do Início da doença: ____/____/____

Evolução:

História prévia do caso (*Informar se os dados não constarem do prontuário*)

Houve atendimento prévio em serviço de emergência? () sim () não () não registrado

Caso referido de UBS/USF – Município /UF: Qual:

Caso foi transferido de outros hospitais – Município /UF:

Data do primeiro atendimento após início dos sinais e sintomas: ____/____/____

Foi referida hipótese diagnóstica para dengue? () sim () não () não registrado

Doença associada: () sim () não () não registrado

Se sim: Qual (is): () Cardiopatia () Asma () Diabetes Mellitus () DPOC* () Outras

Dados clínicos:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Febre | <input type="checkbox"/> Irritabilidade |
| <input type="checkbox"/> Cefaléia | <input type="checkbox"/> Exantema |
| <input type="checkbox"/> Dor retroorbitária | <input type="checkbox"/> Dor abdominal |
| <input type="checkbox"/> Mialgia | <input type="checkbox"/> Manifestações hemorrágicas. Qual (is)? |
| <input type="checkbox"/> Prostração | _____ |
| <input type="checkbox"/> Artralgia | <input type="checkbox"/> Manifestações neurológicas. Qual (is)? |
| <input type="checkbox"/> Diarréia | _____ |
| <input type="checkbox"/> Vômitos | <input type="checkbox"/> Outras manifestações. Qual (is)? |
| <input type="checkbox"/> Sonolência | _____ |

Patologias prévias:

- | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Cardiopatia | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | <input type="checkbox"/> | Diabetes melittus | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | <input type="checkbox"/> |
| NR | | | | NR | | | |
| Asma | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | <input type="checkbox"/> | | | | |
| NR | | | | D. hematológica | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | <input type="checkbox"/> NR |
| Dermatite atópica | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | <input type="checkbox"/> | Doença renal | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | <input type="checkbox"/> NR |
| NR | | | | Hipertensão arterial | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | <input type="checkbox"/> NR |
| Epilepsia | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não | <input type="checkbox"/> | Outras | | | |
| NR | | | | _____ | | | |

RT-PCR**Material:** _____**Diagnóstico:** _____**Material:** _____**Diagnóstico:** _____**SOROLOGIA IgM****Material:** _____**Diagnóstico:** _____**Material:** _____**Diagnóstico:** _____

ESTUDO DO LCR**Contagem de células:** _____**Leucócitos:** _____**Neutrófilos:** _____**Linfócitos:** _____**Monócitos:** _____**Eosinófilos:** _____**Glicorraquia:** _____**Proteinorraquia:** _____

ANEXO III – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA SAÚDE

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)

Protocolo Nº 005/2009

CAAE:0005.0.042.000-09

Título do Projeto: " Detecção do Anticorpo 1gM e antígeno viral no líquido: Manifestações neurológicas em infecções causadas pelo vírus dengue no estado do Ceará"

Instituições envolvidas: Hospital São José de Doenças Infecciosas
Laboratório Central de Saúde Pública

Pesquisadora Responsável: Ms. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo

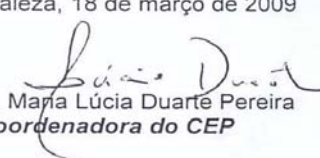
PARECER CONSUBSTANCIADO

Analizamos o projeto em apreço, para retirada de pendências, em 16 de março de 2009 e analisamos as respostas do pesquisador sobre as pendências elencadas no parecer anterior e entendemos que todas foram dirimidas.

Diante do exposto, consideramos o projeto **aprovado**.

Lembramos a necessidade de envio de relatório do andamento do projeto (primeiro para 18 de março de 2010) de relatório final quando de sua conclusão, além de que qualquer mudança na proposta do estudo, deverá passar por uma prévia avaliação deste comitê. Outrossim, comunicamos que, mensalmente, o CEP-HSJ está monitorando pesquisas em execução no Hospital São José de Doenças Infecciosas escolhidas aleatoriamente.

Fortaleza, 18 de março de 2009


Dra. Maria Lúcia Duarte Pereira
Coordenadora do CEP

ANEXO IV - INVESTIGAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL, ACHADOS DE NECRÓPSIA E HISTOPATOLÓGICO DOS CASOS DE ÓBITOS COM DENGUE CLASSIFICADOS COMO ENCEFALITES NO CEARÁ DE 2005 A 2008.

Id S/I	Hip. Diagn. Clínica	Sinais e sintomas	Resultados de laboratório mais importantes	Achados de necropsia	Resultado histopatológico
F/49	Dengue	Febre, cefaléia, dor e edema de membros inferiores; irritação e confusão mental	Plaquetas <20.000. IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM e IgG positivos p/dengue. No sangue, IgG positivo p/dengue		No cérebro, edema e congestão acentuados com alterações neuronais de neuroniofagia e satelitose e vasos congestos contendo macrófagos, sugestivos de encefalite viral. No fígado: hepatite aguda com lesões panacinares; hemorragia, edema e vaso-congestão acentuados. No baço, congestão com hipertrofia folicular
M/43	AIDS	Cefaléia, depressão, diarreia, inapetência, dores e manchas no corpo	No LCR: AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue	Máculas em todo o tegumento; palidez cutâneo-mucosa e de órgãos internos, desidratação, fezes diarreicas esverdeadas.	No cérebro, edema acentuado e congestão vascular. No pulmão, acentuada congestão, edema discreto e áreas com enfisema. No fígado acentuada congestão e discreta esteatose. No baço, acentuada congestão e focos de hemorragia
F/57	Dengue, calazar, leptospirose	Febre, cefaléia, irritabilidade, icterícia e parestesia em membro inferior esquerdo	No LCR: AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue	Edema palpebral; icterícia;	No cérebro, edema e congestão acentuada e lesões neuronais anóxicas. No pulmão, edema e hemorragia. No fígado, hepatite necro-hemorrágica, esteatose e infiltrado linfocitário portal e sinusoidal. No baço, congestão e hemorragia
F/2	Dengue	Febre, cefaléia e dor abdominal	IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM e IgG positivos p/dengue. No soro, IgM e IgG positivos p/dengue	Derrame pleural à direita, ascite, edema cerebral, herniação das tonsilas cerebelares, bronquite leve.	No cérebro, edema e congestão cerebrais e cerebelares acentuada. No pulmão, pneumonite intersticial e congestão vascular. No fígado, hepatite aguda com necrose e apoptose, corpúsculos acidófilos, esteatose e acentuada congestão sinusoidal. No baço, hipertrofia folicular reacional
F/<1	Causa desconhecida	Tosse, desconforto respiratório, febre	No LCR, IgM e AgNS1 positivos, IgG		

		e fraqueza generalizada; vômito, agitação e adinamia	negativo p/dengue. No soro: IgM positivo e IgG negativo p/dengue		
M/<1	Sepsis	Febre, irritabilidade, choro freqüente, distensão abdominal por dois dias	No LCR: DENV-2 detectado por PCR ; IgM positivo, IgG negativo e AgNS1 positivo p/dengue; cultura bacteriana negativa	Hematomas; equimose; sangramento nos locais de punção venosa	
F/48	Dengue hemorrágica	Febre, cefaléia, vômitos e diarreia com muito sangue	IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM , IgG e AgNS1 positivos p/dengue		No cérebro, edema e focos de lesões neuronais degenerativas sem reação inflamatória. No pulmão, congestão passiva crônica e edema agudo. No fígado, esteatose hepática difusa, com infiltrado inflamatório mononuclear discreto. No baço, congestão acentuada. Nos rins, congestão e tumefação celular de túbulos proximais
M/49	Leptospirose, endocardite, hepatite	Febre, cefaléia, vômitos há quatro dias, sonolência evoluindo para coma	Plaquetas 15.600; IHQ positiva p/dengue. No LCR: AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue	.	No cérebro, acentuado edema do tecido cerebral, congestão e focos de hemorragia petequiral. No pulmão, acentuada vaso congestão No fígado, hepatite aguda com necrose, apoptose e hemorragia. No baço, congestão esplênica com hemorragia
M/24	Infecção bacteriana aguda a esclarecer	Febre, cefaléia, vômitos, evoluindo com choque séptico e insuficiência renal aguda	IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM, IgG e AgNS1 positivos p/dengue. No soro, IgM e IgG positivos p/dengue	Hepatoesplenomegalia, ascite (líquido amarelo citrino).	No cérebro, edema e congestão difusa. Nos pulmões, pneumonite intersticial e colapso alveolar. No fígado, necrose hemorrágica e esteatose macrovesicular. No baço, extensa hemorragia na polpa vermelha
M/39	AIDS e dengue hemorrágica	Alcoólatra; diarreia, febre, cefaléia, dispnéia intensa, cianose, desorientação, torpor e coma	Plaquetas 35.000. No LCR, DENV-3 e IgG positivo p/dengue. No soro DENV-3 e IgG positivo p/ dengue		
F/16	Dengue hemorrágica, calazar, leptospirose	Dispnéia severa, cianose, palidez, hipotensão, desorientação e agitação	No LCR, IgM e IgG positivos p/dengue		No cérebro, edema e congestão acentuada. No pulmão, hemorragia difusa acentuada, edema e congestão vascular nos alvéolos. No fígado, hepatite aguda. No baço, acentuada

					congestão
M/19	Dengue, broncopneumonia, doença metabólica	Dispneia progressiva por quatro dias	Plaquetas 20.000/mm ³ . No LCR: DENV-2 detectado por PCR; IgG e AgNS1 positivos p/dengue	Palidez acentuada; Cardiomegalia, hipertrofia acentuada, miocardite crônica	Edema cerebral. No pulmão, congestão vascular e hemorragia alveolar. No fígado, congestão vascular e esteatose microvacuolar centrolobular. No baço, congestão vascular e hemorragia
M/39	Dengue hemorrágica	Dor abdominal intensa precedida de libação alcoólica; tontura e desorientação	No LCR: Ag NS1 positivo e IgG negativo p/dengue	Intensa necrose e hemorragia das adrenais; hemoperitônio; hidrohemo-pericárdio; hidrotórax; numerosas sufusões hemorrágicas petequiais difusas no epicárdio; intensa pneumonite aguda exsudativa; discreta pancardite crônica e inespecífica; hipertrofia do coração	No encéfalo, edema intersticial e congestão das meninges e tecido nervoso
F/53	Dengue	Adinamia, mialgia, cefaléia, dispneia; hipotensão arterial, sudorese e instabilidade hemodinâmica	No LCR: IgM positivo e IgG negativo p/dengue. No soro, IgM positivo e IgG negativo p/dengue		No cérebro, edema e congestão. Nos pulmões, enfisema e discreta congestão. No fígado, esteatose difusa. No baço, congestão. Ausência de lesões citopáticas virais evidentes
F/24	Dengue	Gestante de 12 semanas de gestação; cefaléia, vômito.	No LCR, IgM e IgG positivos p/dengue. No soro, IgM e IgG positivos p/dengue		No cérebro, congestão e edema. Nos pulmões, edema agudo com vasocongestão acentuada. No fígado, alterações hepatocitárias discretas. No baço, congestão. Nos rins, congestão
M/<1	Sepsis e infecção respiratória, dengue	Dois dias com tosse evoluindo com dispneia, febre e insuficiência respiratória	IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM positiva e IgG negativo p/dengue	Derrame pleural bilateral, líquido citrino; consolidação pulmonar difusa; ausência de malformação congênita visível	
F/20	A esclarecer	Paciente com transplante hepático realizado há três anos; doença de Wilson;	Pancitopenia. No LCR, IgM, IgG e AgNS1 positivos p/dengue; no soro IgM e IgG positivos		

		esplenomegalia, picos febris diários	p/dengue		
F/84	Dengue hemorrágica	Febre, cefaléia, dores musculares e adinamia	No LCR: IgM e AgNS1 positivos e IgG negativo p/dengue		
F/51	Dengue	Antecedente de patologia renal há dois meses; mal estar súbito, hipoglicemia, taquicardia, evoluindo com óbito em 24 horas	IHQ positiva p/dengue. No LCR, AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue	Insuficiência cardíaca; cardiomiopatia hipertrófica	No encéfalo, congestão vascular no cérebro e cerebelo. Nos pulmões, congestão e edema com freqüentes mononucleares. No fígado, necrose hemorrágica tubular. No baço vaso-congestão e hipotrofia folicular; Pericardite crônica discretamente exudativa; rins com congestão e moderada necrose tubular aguda.

Legenda: Id (identificação); S (sexo); I (idade)

ANEXO V - INVESTIGAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL, ACHADOS DE NECRÓPSIA E HISTOPATOLÓGICO DOS CASOS DE ÓBITOS COM DENGUE CLASSIFICADOS COMO MENINGOENCEFALITES NO CEARÁ DE 2005 A 2008.

Id S/I	Hip. Diagn. Clínica	Sinais e sintomas	Resultados de laboratório mais importantes	Achados da necropsia	Resultados do histopatológico
M/15	Dengue	Febre, cefaléia, dor generalizada e fraqueza, tosse seca persistente, dispnéia, epigastralgia	IHQ positiva p/dengue. No LCR: AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue	Macroscopia: edema pulmonar, tromboembolia pulmonar; congestão hepática.	No cérebro e cerebelo, acentuado edema e vaso-congestão de meninge e do tecido encefálico. No pulmão, acentuada vaso-congestão e edema. No fígado, congestão acentuada. No baço, discreta congestão.
F/12	Dengue hemorrágica	Febre, tosse, e dispnéia; tontura, adinamia, náuseas e desidratação	No LCR: AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue	Edema e congestão no encéfalo; edema, hemorragia e condensação lobolar bilateral nos pulmões; congestão no fígado	No cérebro, congestão, acentuado edema e lesões neuronais anóxicas. No pulmão, broncopneumonia com vários focos de necrose de parede brônquica e infiltrado inflamatório agudo com fibrina nos alvéolos e freqüentes colônias bacterianas. No fígado, hepatite reacional. No baço, congestão esplênica.
F/6	Dengue	Febre, dor abdominal intensa, vômitos, tontura, fraqueza generalizada	IHQ positiva p/dengue. No LCR: IgM e IgG positivos p/dengue ; no soro IgG positiva p/dengue		No cérebro, edema intersticial e congestão nas meninges e tecido nervoso. Nos pulmões, hemorragia intra-alveolar acentuada. No fígado, necrose extensa no parênquima. No baço, hemorragia.
M/48	Meningoencefalite	Cefaléia holocraniana intensa, após 14 dias associou-se febre vespertina evoluindo com desorientação, diminuição do nível	No LCR: IgG e AgNS1 positivos p/dengue; cultura bacteriana negativa; pesquisa de BAAR negativa	Necrose do tronco cerebral e na face interna dos hemisférios cerebrais; discreta secreção purulenta recobrando parcialmente o	

		de consciência e afasia		hemisfério cerebral esquerdo	
M/45	AVC, Meningite	Hipertenso crônico; febre, sudorese, cefaléia, dor, edema e vermelhidão em MSD, ao nível do cotovelo; dor torácica, evoluiu com crises convulsivas e coma	No LCR: AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue; cultura bacteriana negativa	Hemorragia intraparenquimatosa cerebral; mínima opacificação da meninge; coronarioesclerose com obstrução menor que 50% do lúmen; área de condensação pulmonar bilateral em base	Edema e raros mononucleares em meninge; edema acentuado em tecido cerebral e congestão vascular. No pulmão exsudato inflamatório nos alvéolos. No fígado esteatose macro-vacuolar difusa em 75% do parênquima com áreas de necrose e infiltrado de neutrófilos; acentuada congestão sinusoidal. No baço, vasocongestão acentuada
F/47	Síndrome hemorrágica a esclarecer	Cefaléia, evoluindo com mialgia, febre e mal estar geral	Rx de tórax-infiltrado bilateral misto. Plaquetas 77.000; leucócitos 24.000. No LCR: IgM e IgG positivos p/dengue; cultura bacteriana negativa	Anasarca; hemorragia petequial plurivisceral; edema pulmonar; derrame pleural; ascite; intensa congestão do encéfalo; congestão no fígado; hemorragia petequial nas serosas.	No encéfalo, edema intersticial e acentuada congestão nas meninges e tecido nervoso. No fígado, hepatite aguda.
F/3	Dengue, febre tifóide	Irritabilidade, inquietação, choro fácil; enterite infecciosa; esplenomegalia	No LCR: IgM e IgG positivos p/dengue. No soro, IgM e IgG positivos p/dengue		No encéfalo, meningite serosa, congestão e edema cerebral acentuado. No pulmão, congestão acentuada. No fígado, acentuada congestão sinusoidal. No baço, congestão
F/72	Dengue, leptospirose	Febre, desmaio, hepatoesplenomegalia, queda de sensório, hipertensão refratária, acidose metabólica e arritmia	Plaquetas 68.000; pancitopenia; leucócitos 9.600; hipoglicemia TGP 75; TGO 105; IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM positiva e IgG negativa p/dengue	Icterícia; hematoma extenso na mama esquerda, nos braços, na coxa esquerda; pequenas hemorragias no tegumento	No encéfalo, edema e leve congestão nas meninges e tecido nervoso. Nos pulmões, congestão e hemorragias intra-alveolares. No fígado, esteatose macrovesicular e intensa congestão sinusoidal. Nos rins, necrose tubular aguda
M/42	Leptospirose, dengue	Cefaléia, tontura, sonolência, adinamia,	IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM e		No encéfalo, há edema acentuado com vasocongestão

		insuficiência respiratória, mialgia, dor nas panturrilhas, icterícia e toxemia	IgG positivos p/dengue. No soro, IgM e IgG positivos p/dengue		no tecido nervoso e meninge e focos de hemorragia perivascular. Nos pulmões, hemorragia, acentuada vasocongestão e edema. No fígado, cirrose hepática, acentuada reação inflamatória no espaço porta. No baço, acentuada vasocongestão
F/28	Dengue	Cefaléia, adinamia intensa, tosse seca; desorientação e insuficiência respiratória e sepsis	IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM e IgG positivos p/dengue. No soro, IgM e IgG positivos p/dengue	Edema em membros inferiores, vulva e parede abdominal	No encéfalo, edema e vasocongestão nas meninges e no tecido nervoso do cérebro e cerebelo. Nos pulmões, edema, congestão e broncopneumonia. No fígado, áreas de necrose e hemorragia, sinusóides contendo macrófagos e células de Kupffer hiperplásicas e hipertróficas. No baço, congestão.
F/76	Leptospirose	Febre, mialgia, inquietação e torpor	IHQ positiva p/dengue. No LCR, IgM positivo e IgG negativo p/ dengue. No soro, IgM positivo e IgG negativo p/dengue	Edema e intensa congestão pulmonar; esplenomegalia.	No encéfalo, edema e vasocongestão em leptomeninge e no tecido nervoso. Nos pulmões, edema acentuado, vasocongestão e extensa área com hemorragia alveolar. No fígado, esteatose, necrose e hemorragia; reação inflamatória mononuclear no espaço porta.
F/1	Dengue hemorrágica	Estado gripal, febre, vômito e dispnéia progressiva	No LCR: IgM e IgG positivos p/dengue; cultura bacteriana negativa	Discreto edema de membros inferiores	No encéfalo, meninges levemente espessadas com vasos muito congestos, edema e infiltração inflamatória mononuclear; tecido cerebral com acentuada congestão vascular e edema. Nos pulmões, pneumonia lobar. No fígado, esteatose hepática; congestão polivisceral.
F/32	Meningite	Febre, vômitos, crise convulsiva tônico	No LCR: glicose=108;	Hipertensão intracraniana, tendo	

		clônico; desorientação, sonolência, estrabismo convergente bilateral, fala arrastada com meningismo e paralisia do VI nervo bilateral	proteínas totais=102; bacterioscopia negativa; DENV-3 detectado por PCR; AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue	realizado neurocirurgia para implante de derivação ventrículo externa, ventilação mecânica.	
F/17	Encefalite, dengue, hepatite	Febre, vômitos, calafrios, adinamia e anorexia; desorientação, agitação, sonolência e coma	No LCR: IgM e IgG positivos p/dengue		No encéfalo, edema cerebral e congestão vascular das leptomeninges. Nos pulmões, broncopneumonia, hemorragia e congestão alveolares. No fígado, esteatose hepática difusa acentuada. No baço, congestão.

Legenda: Id (identificação); S (sexo); I (idade)

ANEXO VI - INVESTIGAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL, ACHADOS DE NECRÓPSIA E HISTOPATOLÓGICO DOS CASOS DE ÓBITOS COM DENGUE CLASSIFICADOS COMO MENINGITES NO CEARÁ DE 2005 A 2008.

Id S/I	Hip. Diagn. Clínica	Sinais e sintomas	Resultados de laboratório mais importantes	Achados da necropsia	Resultados do histopatológico
M/31	Meningite aguda	Febre, cefaléia, nível de consciência diminuído	No LCR: DENV-2, IgM positivo e IgG negativo p/dengue; cultura bacteriana positiva para <i>Streptococcus sp</i>	Macroscopia: edema cerebral; exudato purulento discreto na base do encéfalo e ponte; petéquias no pericárdio.	No encéfalo, leptomeninge com secreção purulenta, edema cerebral. Nos pulmões, broncopneumonia e edema pulmonar. No fígado, hepatite reacional. No baço, congestão
F/42	Meningite purulenta	Febre, cefaléia, mialgia e dor retro-orbitária; vômitos, desorientação, agitação	IHQ positiva p/dengue. No LCR: IgM positivo e IgG negativo p/dengue; cultura bacteriana negativa; bacterioscopia positiva p/diplococcus Gram negativos	Secreção purulenta recobrimdo leptomeninges. Nos pulmões, edema acentuado	
M/45	Dengue hemorrágica	Febre, rigidez de nuca e hemorragia intracraniana	Plaquetas 40.000; No LCR: IgM, IgG e AgNS1 positivos p/dengue; cultura bacteriana positiva para <i>Klebsiela pneumoniae</i>	Meningite purulenta.	Meninges espessadas com exsudato fibrino leucocitário, com neutrófilos e mononucleares, edema e vasos congestos; tecido cerebral com acentuado edema, hemorragia intracraniana e lesões neuronais anóxicas. Nos pulmões, pneumonite aguda com hemorragia. No fígado, congestão. No baço, congestão.
M/15	Meningite bacteriana, dengue hemorrágica	Febre, cefaléia, rigidez de nuca, mialgia e anorexia	No LCR: AgNS1 e IgG positivos p/dengue; cultura bacteriana positiva para <i>Streptococcus sp</i> ;	Secreção purulenta nas meninges.	Nos pulmões, hemorragia intra-alveolar difusa. No fígado, hiperplasia reacional. No baço, extensa hemorragia na polpa vermelha; leptomeningite purulenta

M/1	Meningite purulenta	Febre, tremor e rigidez de membros; otite externa purulenta esquerda e edema peri-orbitário esquerdo	No LCR: IgM e AgNS1 positivos e IgG negativo p/dengue; cultura bacteriana negativa no LCR	Insuficiência respiratória central; hipertensão intracraniana; meningite purulenta e otite purulenta esquerda	
M/16	Meningite purulenta	Cefaléia persistente, alteração de consciência, sonolência, alucinações e parestesias.	No LCR: IgM e AgNS1 positivos e IgG negativo p/dengue; cultura bacteriana contaminada; cocos Gram positivos; CIE negativa		
M/18	Meningite	Convulsões tônico-clônicas; seqüela por projétil de arma de fogo há um ano; confusão mental e torpor	No LCR: IgG, AgNS1 positivo p/dengue; cultura bacteriana positiva para <i>Streptococcus pneumoniae</i>		
M/27	Meningite	História de convulsões há um ano; há 24 horas quadro convulsivo com cianose	No LCR: AgNS1 positivo p/dengue; cultura bacteriana positiva para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Leve opacidade das meninges	
F/19	Meningite	Gestante de 28 semanas, internada com otalgia, cefaléia, vômitos, inquietação e desorientação	No LCR: IgG e AgNS1 + p/dengue; cultura bacteriana positiva para <i>Streptococcus pneumoniae</i> . No soro: IgG positiva p/dengue;		
F/48	Dengue hemorrágica	Febre, cefaléia e adinamia; dores abdominais e hipotensão	Trombocitopenia, hiponatremia. No LCR: DENV-3 detectado por PCR; IgM e AgNS1 positivos e IgG negativo p/dengue	Meninges congestionadas; fígado e rins congestionados; estômago, traquéia, brônquios com conteúdo hemorrágico; pulmões hemorrágicos; petéquias no pericárdio	

M/70	Dengue hemorrágica	Dor no tórax seguida de desmaio 24 horas após	No LCR: DENV-3 e AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue. No soro: positivo para DENV-3; IgG negativo p/dengue		
M/43	Encefalite, pneumonia	Alcoólatra, positivo para HIV; queda do sensório, desorientação	No LCR: AgNS1 positivo e IgG negativo p/dengue; cultura bacteriana negativa		
F/32	Dengue, leptospirose	Febre intermitente, vômitos, rigidez de nuca e mialgia generalizada; 24 horas antes do óbito teve dor epigástrica e na região dorsal intensas; adinamia e vômitos persistentes	No LCR: IgM , IgG e AgNS1 positivos; no sangue, IgM e IgG positivos p/dengue	Derrame pleural bilateral; edema e intensa congestão pulmonar; derrame pericárdio; edema mesentérico, ascite e congestão plurivisceral	

Legenda: Id (identificação); S (sexo); I (idade)

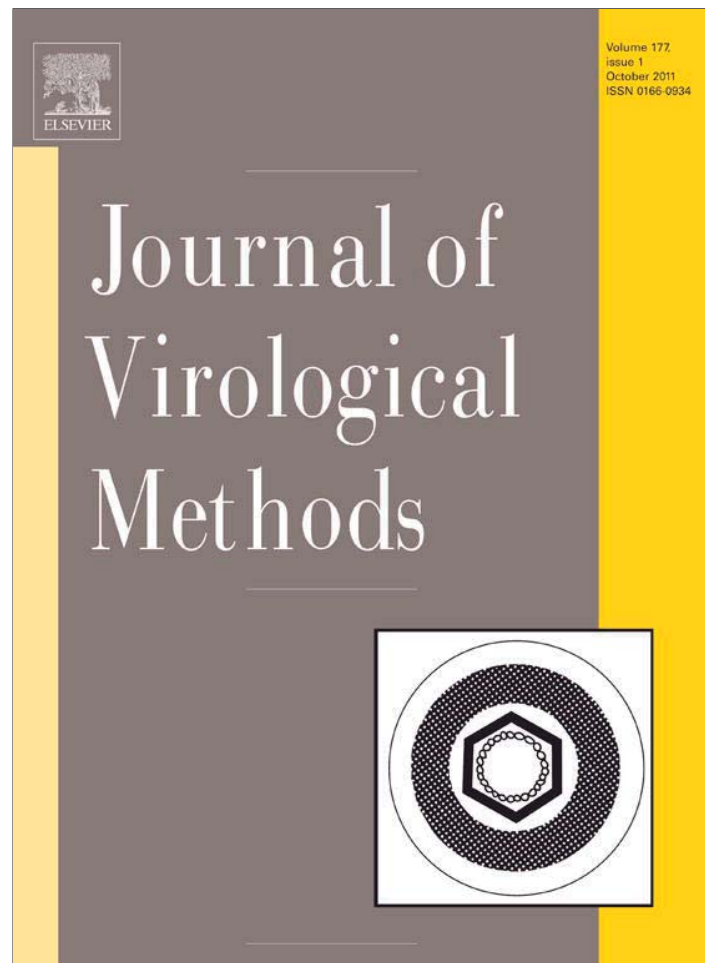
Anexo VII – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, RESULTADOS LABORATORIAIS E EVOLUÇÃO DOS PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS QUE FORAM POSITIVOS PARA DENV NO LCR DURANTE O ANO DE 2008.

Id S/I Data M/A	Hipótese Diagnóstica Clínica	Sinais e sintomas	Resultados de laboratório	Evolução
F/5 10/08	Meningite bacteriana	Febre, cefaléia, prostração, vômitos, sonolência, rigidez de nuca	No LCR; aspecto límpido, 133 cél/mm ³ ; linfócitos 42%, monócitos 2%, neutrófilos 53%, eosinófilos 3%; Proteínas=58; glicose=54; IgM positivo p/dengue; IgG positivo p/dengue; bacteriocopia, cultura p/ bactérias e fungos e contra imunoeletroforese negativos No soro: TGO=24; TGP=16	Hospitalizada por 9 dias. Cura
M/58 10/08	Meningite bacteriana	Cefaléia, acentuada adinamia, vômitos, rebaixamento de consciência, delirírio	No LCR: aspecto límpido, 300 cél/mm ³ ;linfócitos, 87%; monócitos 5%; neutrófilos 4%; eosinófilos 0%; proteínas=112; glicose=59; IgM positivo p/dengue; IgG positivo p/dengue. No soro: TGO=127; TGP=74 Tomografia do crânio mostrou a presença de processo expansivo medindo 4x2x2,3 cm	Tumor cerebral localizado na região selar com expansão supra selar; encaminhado para tratamento cirúrgico
F/5 01/08	Meningite	Febre, cefaléia, vômito, rigidez de nuca	No LCR: aspecto límpido, 490 cél/mm ³ ; 2% monócitos, 5% linfócitos, 93% de neutrófilos; proteínas=45; glicose=110 bacterioscopia, cultura p/bactérias, fungos e contaimunoeletroforese negativos; AgNS1 positivo p/dengue	Hospitalizada por 8 dias. Cura
M/15 07/08	Meningite	Febre, cefaléia, artralgia, adinamia intensa, tosse seca, dispnéia, epigastralgia	IHQ positiva p/dengue. No LCR: aspecto límpido, bacterioscopia, cultura para bactérias e fungos e CIE negativas; IgG negativo e AgNS1 positivo p/dengue	Hospitalizado por 5 dias. Óbito
M/24 10/08	Meningite	Febre, cefaléia, vômito e rigidez de nuca	No LCR: aspecto límpido, 426 cél/mm ³ ; bacterioscopia, cultura p/bactérias e fungos e contaimunoeletroforese negativos; proteínas= 136; glicose=55; IgM e IgG positivos p/dengue	Atendimento ambulatorial. Cura

Legenda: Id (identificação); S (sexo); I (idade); M (mês); A (ano).

PUBLICAÇÕES

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Short communication

Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay

F.M.C. Araújo^{a,b,c,*}, R.S.N. Brilhante^{c,d}, L.P.G. Cavalcanti^b, M.F.G. Rocha^d, R.A. Cordeiro^{c,d}, A.C.B. Perdigão^{a,e}, I.S. Miralles^{a,b}, L.C. Araújo^f, R.M.C. Araújo^f, E.G. Lima^{a,e}, J.J.C. Sidrim^{c,d}

^a Central Public Health Laboratory of Ceará, Brazil

^b State Health Secretariat of Ceará, Brazil

^c Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Brazil

^d Specialized Center of Medical Mycology, Ceará, Brazil

^e Northeast Biotechnology Network, State University of Ceará, Brazil

^f Federal University of Ceará, Brazil

A B S T R A C T

Article history:

Received 5 January 2011

Received in revised form 8 April 2011

Accepted 11 July 2011

Available online 20 July 2011

Keywords:

Dengue virus

Diagnosis

NS1 antigen

Cerebral spinal fluid

ELISA

The involvement of the central nervous system in dengue infections has been reported in countries where the disease is endemic. The purpose of this study was to determine whether an enzyme-linked immunosorbent assay kit designed to detect the dengue NS1 antigen in serum was able to detect this antigen in cerebral spinal fluid (CSF) samples from patients with fatal outcomes. To evaluate the sensitivity of the kit, 26 dengue-positive CSF samples were used. The Pan-E Dengue Early kit was able to detect the NS1 antigen in 13 of 26 dengue-positive CSF samples, resulting in a sensitivity of 50% (95% confidence interval, 29.9–70.1%) and specificity of 100% (95% confidence interval, 75.3–100%). The kit was able to detect the NS1 antigen in CSF of individuals who had died of dengue. When used in combination with IgM, the detection rate rose to 92.3%. This study reports a method for rapidly detecting the dengue virus in CSF, thereby increasing the diagnosis of dengue fever cases with unusual neurological manifestations.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Dengue fever is a mosquito-borne disease caused by one of four dengue viruses (DENV), DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4, which belong to the Flavivirus genus of the Flaviviridae family (Gubler, 2002; ICTV, 2006). Its prevalence has been increasing in recent decades. Currently it is endemic in over 100 countries in Africa, the Americas, Eastern Mediterranean, Southeast Asia and Western Pacific (WHO, 2009).

In Brazil, dengue epidemics have been described since 1986, initially with involvement of DENV-1, followed by DENV-2 in 1990, and DENV-3 after 2000 (Nogueira et al., 2007). In the state of Ceará in Northeast Brazil, the disease is endemic and is caused by serotypes 1, 2 and 3, with cases reported every year and periodic epidemics. The highest number of cases was observed in 1987, 1994, 2001 and 2008. In 2003, a severe DENV-3 epidemic occurred, and dengue hemorrhagic fever (DHF) incidence was high among adults (Cavalcanti et al., 2010).

Dengue's symptoms can vary from mild fever, the most common form, to potentially fatal forms, such as dengue DHF fever and dengue shock syndrome (DSS). Unusual manifesta-

tions, such as myocardopathy, hepatic insufficiency, fulminant hepatitis, encephalopathy and encephalitis, have also become common (Nogueira et al., 2007). These findings are due perhaps to the increase of dengue diagnosis. The involvement of the central nervous system (CNS) in dengue patients has been reported in countries where the disease is endemic. There is no antiviral therapy or vaccine approved for use against dengue, so patient management requires good laboratory and clinical support. Specific and rapid diagnosis can help directing the proper treatment to patients (WHO, 2009).

The DENV has three genes that encode for structural proteins: envelope (E), membrane (M) and capsid (C), and seven genes that encode for non-structural proteins: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5. The glycoprotein NS1 is highly conserved, secreted by cells infected with DENV in vitro and in vivo, but its biological activity is still not well understood. During in vitro infection, NS1 protein is expressed in a form associated with the intracellular membrane, which is essential for viral replication, or associated with the cell surface, which can be involved in signal transduction (Mackenzie et al., 1996). NS1 protein, in solution, circulates and accumulates in the plasma of patients infected with DENV throughout the clinical phase, and can be correlated with the development of more serious forms of the disease (Libraty et al., 2002).

* Corresponding author at: Av. Barão de Studart 2405, Postal Code: 60120-002, Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: +55 85 31011498; fax: +55 85 31011493.

E-mail address: fernanda.montenegro@lacen.ce.gov.br (F.M.C. Araújo).

Table 1

Detection rate for the methods used to diagnose dengue according to the available samples of patients with DENV infection.

Clinical sample	RT-PCR ^a P/S (%)	Virus Isolation P ^b /S ^c (%)	Serotype detected	IgM ^d P/S (%)	NS1 Ag ^e P/S (%)
CSF ^g	9/26 (34.6)	3/26 (11.5)	3 DENV-2 4 DENV-3 2 DENV-1	19/26 (73.1)	13/26 (50)
Blood or serum	2/20 (10.0)	2/26 (7.7)	2 DENV-3 1 DENV-1	4/11 (36.4)	– ^f
Total	11/46 (23.9)	5/52 (9.6)	3 DENV-2 6 DENV-3 3 DENV-1	23/37 (62.2)	13/26 (50)

^a Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).^b Positive (P).^c Studied (S).^d Immunoglobulin M (IgM).^e Non-structural antigen (NS1 Ag).^f Not done (–).^g Cerebral spinal fluid (CSF).

Several new commercial assays for detection of the NS1 antigen have been developed. The employment of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect NS1 protein from DENV in serum or plasma of patients with acute disease serves as a supplementary method for use in association with other diagnostic tests (Dussart et al., 2008; Blacksell et al., 2008). However, there are no reports of the use of these tests on the cerebro spinal fluid (CSF). This application would be very useful to diagnose cases of non-classical dengue.

The purpose of this study was to evaluate the performance of the immunosorbent assay Pan-E Dengue Early ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia) (NS1 Early), in detecting the presence of the NS1 antigen (NS1 Ag) in CSF samples obtained during autopsies.

Epidemiological and clinical data were obtained from a national database system that provides information on age and sex of each patient, CSF collection and the date when symptoms occurred. Clinical data and CSF samples were collected from patients who died of a dengue-like illness, and were autopsied at the municipal coroner's office in the context of the dengue surveillance activity of the Ceará State Health Secretariat. CSF specimens from people with other diagnosed diseases (HIV infection, leptospirosis, visceral leishmaniasis, pneumonia, fungal meningitis, meningococcal meningitis and other bacterial forms of meningitis) were used to evaluate the specificity of the assay kit. Contamination of CSF with blood was an exclusion criterion for the samples.

CSF samples were tested for the presence of DENV by viral isolation in C6/36 cells, as previously described (Gubler et al., 1984); genome detection was by RT-PCR (Lanciotti et al., 1992); and IgM detection was by IgM-capture with the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Panbio, Brisbane, Australia). All assays were conducted according to the manufacturers' instructions, using a 1:2 sample dilution (Soares et al., 2006). Cases were considered positive for DENV infection when CSF samples were positive according to one or more of these tests and patients presented dengue-like syndrome. Cases were considered negative when CSF samples were negative for all of these tests and were diagnosed as suffering from another disease.

The study was approved by the ethics and research committee of São José Infectious Disease Hospital (protocol 005/2009, number CAEE:0005.0.042.000-09).

The NS1 Early system is an antigen-capture ELISA that provides qualitative, non-serotype-specific detection of DENV NS1 Ag. All tests were performed in accordance with the manufacturers' instructions. Briefly, 100 µL of diluted (1:2) samples, positive control, negative control and calibrator were added to microwells that were pre-coated with a polyclonal capture anti-NS1 antibody and then incubated for 1 h, at 37 °C. Each plate was washed six times and incubated for 1 h at, 37 °C, following the addition of HRP-

conjugated anti-NS1 Mab. After six washes, antibody complexes were detected by adding TMB and incubating the plate for 10 min at room temperature. The reaction was stopped by adding a stop solution, and the plate was read at 450 nm, with a 630 nm reference filter. A sample ratio was determined for each sample by dividing the average optical density (OD) of the test sample by the average OD of the cutoff control. Sample ratios of <0.5, 0.5 to <1.0, and ≥1 were indicative of negative, inconclusive and positive results, respectively. Inconclusive samples were considered negative after the tests were repeated and remained inconclusive.

To evaluate the performance of the test statistical measures of sensitivity and specificity, a confidence interval (CI) of 95% was used.

CSF samples from 26 patients who presented fatal dengue infection and 60 negative for dengue were selected to assess the performance of the NS1 Early kit. All these 26 positive samples were positive for dengue in CSF previously by at least one other diagnostic method. The kit showed 73 negative and 13 positive results for the presence of NS1 Ag. The 13 positive samples were previously positive for DENV in CSF. The detection rate for the methods used to diagnose dengue, according to the samples of patients with DENV infection, is shown in Table 1.

The results of sensitivity and specificity in relation to the detection of NS1 Ag in CSF can be seen in Table 2. Two CSF samples that gave ambiguous results were retested and considered negative. The percentage of detection of the NS1 Early test in CSF of patients with laboratory diagnosis of dengue fever, according to the IgM detection methodology, is shown in Table 3. The detection rate of the combination of IgM antibodies and NS1 Ag was 92.3% (Table 4).

In patients with dengue, the average between the onset of symptoms to death was six days, ranging from 1 to 14 days. The signs and symptoms presented were: fever (77%); headache (42.3%); vomiting (30.7%); asthenia (26.9%); myalgia (26.9%); dyspnea (19.2%); mental confusion (19.2%); abdominal pain (15.4%); agitation (11.5%); hemorrhage (11.5%); somnolence (7.7%); splenomegaly (7.7%); chills (7.7%); cough (7.7%); diarrhea (7.7%); coma (7.7%); and, at a lower percentage (3.8%), anorexia, abdominal bloating,

Table 2

Diagnostic accuracy score for the NS1 detection by ELISA kit in CSF samples.

Diagnosis	Positive	Negative	Total
Dengue	13	13	26
Non dengue	0	60	60
Total	13	73	86
Sensitivity	50% (95% CI ^a -29.9–70.1)		
Specificity	100% (95% CI-94.0–100)		

^a Confidence interval (CI).

Table 3
Detection rate of NS1 Ag according to the presence of IgM in 26 CSF samples.

	Presence of IgM ^a	Absence of IgM	Total
NS1+ ^b	9	4	13
NS1- ^c	10	3	13
Total	19	7	26
Detection (%)	9/26 (34.6)	4/26 (15.4)	13/26 (50)

^a Immunoglobulin M (IgM).^b Non-structural 1 antigen positive (NS1+).^c Non-structural 1 antigen negative (NS1-).

limb stiffness, ear infection, cyanosis, nausea, chest pain, pancytopenia, hypotension, sweating, acute renal failure, septic shock, intra-orbital swelling, dizziness, paresthesia, hallucinations and convulsion.

Of the 26 dengue patients, 9 had co-morbidities: one had a respiratory infection, three had bacterial meningitis, one had Wilson's disease, one had infectious enteritis, one had pneumonia, one had an ear infection and one had a varicella-zoster virus infection. Six patients were classified as DHF, one as DSS and the other 19, who did not meet the World Health Organization criterion for DHF classification, were considered as having severe dengue.

The mean age of patients was 27 years, ranging from 2 months to 84 years, and 26.9% (7/24) of them were younger than 7 years old. Females accounted for 62.5% of the cases and males for the other 37.5%.

The increasing transmission of the dengue virus continues to be a global public health problem, especially in developing countries, where access to preventive and diagnostic resources is limited. Since the appearance of this virus in Brazil, specifically in the state of Ceará, in 1986, the number of serious cases of the disease has been increasing steadily in line with other tropical and subtropical regions of the world, where the disease has become endemic, with cyclical variation: years of substantial epidemics followed by non-epidemic years (WHO, 2009).

The severe forms of the disease have caused unusual manifestations of dengue, such as neurological signs. DENV virus, though not considered neurotropic, has been isolated or its viral antigens have been observed in human CNS (Miagostovich et al., 1997; Ramos et al., 1998). This also has been demonstrated by viral isolation and detection of viral RNA in CSF and demonstration of intrathecal synthesis of specific dengue antibodies (Chen et al., 1991; Nogueira et al., 2002; Puccioni-Sholer et al., 2009). However, Rosen et al. (1999), could not evidence virus replication in the brain in fatal human infections.

The results of this study show that NS1 Ag can be detected in CSF by using a commercially available kit: NS1 Early, even though this kit was not standardized for testing CSF. There is no kit available designed to detect IgM antibodies in CSF either. Instead, this detection is generally done using a kit with standardized serum. Soares et al. (2006) found this antibody functioning with CSF in a 1:2 dilution. However, to detect IgM the patient must have had the disease for more than five days, whereas viral antigens can be detected only during viremia, thus enabling diagnosis.

Table 4
Detection of IgM and NS1 Ag in CSF samples.

Test	Positive	Negative	Detection (%)
IgM ^a	19	7	73.1
NS1 ^b	13	13	50
IgM-NS1 (combined) ^c	24	2	92.3

^a Immunoglobulin M (IgM).^b Non-structural antigen (NS1 Ag).^c IgM and/or NS1 Ag positive (combined).

NS1 Ag was detected in 50% of the cases where CSF had been found positive by other methods. The sensitivity of serum NS1 Ag detection by this kit ranges from 60.4% (Dussart et al., 2008) to 91.6% (Serakan et al., 2007). It is known that the quantity of IgM in CSF is lower than in serum (Chen et al., 1991; Puccioni-Sholer et al., 2009). Maybe the same phenomenon occurs in the presence of NS1 Ag in CSF. Taking into account that there are no published parameters for comparing this finding of NS1 Ag in CSF, it should be considered one more method for the diagnosis of dengue in this type of material, thus opening the discussion on its applicability in this type of sample. However, the use of NS1 Ag combined with IgM detection increased dengue diagnosis in CSF to 92.3%, consistent with a recent assessment of these two kits in serum reported by Blacksell et al. (2008).

The specificity values of 100% for the NS1 Early kit found when testing CSF were similar to other reports in the literature with the use of serum (Blacksell et al., 2008; Dussart et al., 2008; Lima et al., 2010). However, Guzman et al. (2010) found 90% specificity when tested in healthy blood donors and patients with other confirmed diagnoses.

A study using the NS1 Early kit showed that when IgM was present in the serum, the sensitivity of NS1 Ag detection fell from 91.6% to 48.3% (Serakan et al., 2007). This also happened in the CSF samples studied here, but despite the average of six days between the onset of the disease and the sample collection, the detection rate decreased slightly in relation to the presence of IgM, from 57.1% to 47.4% for the NS1 Early kit. This fact is probably due to the type of patient, since all the samples were taken from patients with fatal outcomes. They could have had higher levels of the NS1 glycoprotein circulating in the plasma and higher levels of viral RNA, which could be one of the reasons for the development of serious forms of the disease, as suggested by Libraty et al. (2002), even though many patients with high levels of viremia never develop clinical complications. However, the severe syndrome has been observed in patients who present circulating heterotypic dengue antibodies at high concentrations (Halstead, 2009).

This evaluation shows that the NS1 Early kit for detection of NS1 Ag in serum can be used on CSF samples from patients diagnosed with dengue. Serological tests are simple, rapid and easy to perform, but the average lifespan of IgM antibodies, which can be up to two months, confuses the diagnosis in cases where the date of disease onset is unknown, leaving questions about whether the infection is acute or recent (Innis, 1997). The detection of the NS1 antigen combines the accuracy and speed of RT-PCR with the practicality of the ELISA technique, providing a reliable result that facilitates clinical management of patients with neurological manifestations.

The use of tests to detect the NS1 Ag allows studying the involvement of the CNS in patients suspected of being infected with DENV, enabling better support for patients with severe forms of the disease. Therefore, the results of this study suggest the use of the Pan-E Dengue Early ELISA assay to detect viral NS1 Ag in CSF, to diagnose severe forms of dengue that present neurological manifestations in endemic regions for dengue. However, it should be used in association with DENV IgM antibody detection in CSF, in order to increase the sensitivity of the diagnosis. Besides this, more studies, including during non-epidemic periods and prospective studies, are needed to assess better the accuracy of the kit on CSF samples.

Acknowledgements

This work was financed by the Central Public Health Laboratory of Ceará, the Brazilian National Research Council (CNPq), process MCT/CNPq 14/2009, and by the Ceará State Scientific Development Foundation (FUNCAP), process 09100097-1.

References

- Blacksell, S.D., Mammen Jr., M.P., Thongpaseuth, S., Gibbons, R.V., Jarman, R.G., Jen-jaroen, K., Nisalak, A., Phetsouvanh, R., Newton, P.N., Day, N.P., 2008. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 43–49.
- Cavalcanti, L.P., Coelho, I.C., Vilar, D.C., Holanda, S.G., Escóssia, K.N., Souza-Santos, R., 2010. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43, 355–358.
- Chen, W.J., Hwang, K.P., Fang, A.H., 1991. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 22, 659–663.
- Dussart, P., Petit, L., Labeau, B., Leduc, A., Moua, D., Matheus, S., Baril, L., 2008. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *Plos Negl. Trop. Dis.* 2, e280.
- 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.
- Gubler, D.J., 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 10, 100–103.
- Guzman, M.G., Jaenisch, T., Gaczkowski, R., Hang, V.T.T., Sekaran, S.D., Kroeger, A., Vazquez, S., Ruiz, D., Martinez, E., Mercado, J.C., Balmaseda, A., Harris, E., Dimano, E., Leano, P.S.A., Yoksan, S., Villegas, E., Benduzu, H., Villalobos, I., Farrar, J., Simmons, C.P., 2010. Multi-Country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *Plos Negl. Trop. Dis.* 4, e811.
- Halstead, S.B., 2009. Antibodies determine virulence in dengue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171, E48–E56.
- Innis, B.L., 1997. Antibody responses to dengue virus infection. In: Gubler, D.J., Kuno, G. (Eds.), *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International, Cambridge, MA, pp. 221–243.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>.
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Vorndam, A.V., 1992. Rapid detection and typing of dengue virus from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 545–551.
- Libraty, D.H., Young, P.R., Pickering, D., Endy, T.P., Kalayanarooj, S., Green, S., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Ennis, F.A., Rothman, A.L., 2002. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 186, 1165–1168.
- Lima, M.R.Q., Nogueira, R.M.R., Schatzmayer, H.G., Santos, I.B., 2010. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *Plos Negl. Trop. Dis.* 4, e738.
- Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Young, P.R., 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220, 232–240.
- Miagostovich, M.P., Ramos, R.G., Nicol, A.F., Nogueira, R.M.R., Cuzzi-maya, T., Oliveira, A.V., Marchevsky, R.S., Mesquita, R.P., Schatzmayr, H.G., 1997. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin. Neuropathol.* 16, 204–208.
- Nogueira, R.M.R., Araújo, J.M.G., Schatzmayr, H.G., 2007. Dengue virus in Brazil, 1986–2006. *Rev. Panam. Salud Publica.* 22, 358–363.
- Nogueira, R.M.R., Filippis, A.M.B., Coelho, J.M.O., Sequeira, P.C., Schatzmayr, H.G., Paiva, F.G., Ramos, A.M.O., Miagostovich, M.P., 2002. Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 33, 68–77.
- Puccioni-Sholer, M., Soares, C.N., Papaiz-Alvarenga, R., Castro, M.J.C., Faria, L.C., Peralta, J.M., 2009. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. *Neurology* 73, 1413–1417.
- Ramos, C., Sanchez, G., Pando, R.H., Baquera, J., Hernández, D., Mota, J., Ramos, J., Flores, A., Llausás, E., 1998. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J. Neurovirol.* 4, 465–468.
- Rosen, L., Drowet, M.T., Deubel, V., 1999. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 720–724.
- Serakan, S.D., Lan, E.C., Maheswarappa, B.K., Appanna, R., Subramaniam, G., 2007. Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. *J. Infect. Dev. Ctries.* 1, 182–188.
- Soares, C.N., Faria, L.C., Puccioni-Sohler, M., Peralta, J.M., Freitas, M.R.G., 2006. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. *J. Neurol. Sci.* 249, 19–24.
- World Health Organization, 2009. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control – New Edition*. World Health Organization Press, Geneva Switzerland.

Central nervous system involvement in dengue

A study in fatal cases from a dengue endemic area

F.M.C. Araújo, PhD
M.S. Araújo, MD
R.M.R. Nogueira, MD,
PhD
R.S.N. Brillhante, PhD
D.N. Oliveira, MD
M.F.G. Rocha, PhD
R.A. Cordeiro, PhD
R.M.C. Araújo, MD
J.J.C. Sidrim, MD, PhD

Correspondence & reprint requests to Dr. Montenegro de Carvalho Araújo:
fernanda.montenegro@lacen.ce.gov.br
or fernandamcaraujo@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: This study aimed to determine the frequency of CNS infection by dengue virus (DENV) in individuals with fatal outcomes.

Methods: Samples of 150 individuals suspect of an infection disease and with fatal outcomes were investigated for evidence of the presence of DENV. The sampling was made up of 150 CSF, 120 tissue samples, and 109 blood specimens. The tests used were viral isolation, reverse transcriptase PCR, immunohistochemistry, nonstructural 1 antigen, and immunoglobulin M detection.

Results: Out of 150 studied patients, 84 were dengue positive. Evidence of the presence of DENV was found in 41 CSF, showing the following neurologic diagnosis: 46.3% encephalitis, 34.1% meningoencephalitis, and 19.5% meningitis, giving a frequency of 48.8% of the 84 dengue-positive cases. The major clinical manifestations observed on these individuals were fever, headache, mental irritability, breathless, vomiting, muscle pain, tiredness, abdominal pain, somnolence, restlessness, dizziness, cough, seizure, coma, and neck stiffness.

Conclusion: Clinical manifestations and laboratory-positive results in CSF that may indicate the presence of DENV led to consider the invasion of CNS by DENV in these fatal cases studied, and showed that neurologic pathology was an important fatal complication in dengue cases. *Neurology*® 2012;78: 736-742

GLOSSARY

DENV = dengue virus; **DF** = dengue fever; **DHF** = dengue hemorrhagic fever; **DSS** = dengue shock syndrome; **IgG** = immunoglobulin G; **IgM** = immunoglobulin M; **IHC** = immunohistochemistry; **NS1Ag** = nonstructural 1 antigen; **RT-PCR** = reverse transcriptase PCR.

Estimates of the annual number of dengue fever (DF) cases in the world vary widely, ranging from 70 to 500 million, including 24,000 deaths.¹ Brazil is responsible for approximately 60% of dengue cases in the Americas.² In the State of Ceará, in northeastern Brazil, the disease has been endemic since 1986, presenting periodic epidemics, with the circulation of DENV-1, DENV-2, and DENV-3.^{3,4} The last epidemic period was from 2005 to 2008, with 2 predominant serotypes: DENV-2 and DENV-3.⁴

Dengue infection presents classically as DF, dengue hemorrhagic fever (DHF), and dengue shock syndrome (DSS), which can be fatal. Unusual manifestations are becoming more common. The involvement of the CNS in patients with dengue has been reported in countries where the disease is endemic.² The capacity of DENV to infect the CNS has been demonstrated by the detection of viral RNA in cerebral tissue and CSF, virus isolation in CSF, and demonstration of intrathecal synthesis of dengue-specific antibodies.⁵⁻⁸

This study aimed at determining the frequency of CNS infection by DENV in dengue cases with fatal outcomes during a dengue epidemic period in the State of Ceará, northeastern Brazil.

From the Central Public Health Laboratory, Virology Section (F.M.C.A.), and Coroner Office Dr. Rocha Furtado (D.N.O.), State Health Secretariat of Ceará, Ceará; Neurology Service of Dr. José Frota Institute (M.S.A.), Ceará; Flavivirus Laboratory (R.M.R.N.), Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro; Postgraduate Program in Medical Sciences (F.M.C.A., R.S.N.B., M.F.G.R., R.A.C., J.J.C.S.) and Specialized Center of Medical Mycology (R.S.N.B., M.F.G.R., R.A.C., J.J.C.S.), Federal University of Ceará, Ceará; and São Francisco Hospital of Canindé (R.M.C.A.), Ceará, Brazil.

Study funding: Supported by the Brazilian National Research Council, process MCT/CNPq 14/2009, and the Ceará State Scientific Development Foundation, process FUNCAP 09100097-1.

Disclosure: The authors report no disclosures.

Table 1 Dengue laboratory confirmation according to the diagnosis hypothesis at the moment of necropsy

Patients	DENV+, n (%)	DENV-, n (%)	Total, n (%)
Suspected of dengue	65 (43.3)	30 (20.0)	95 (63.3)
Not suspected of dengue	19 (12.7)	36 (24.0)	55 (36.7)
Total	84 (56.0)	66 (44.0)	150 (100)

Abbreviation: DENV = dengue virus.

METHODS Study population. Samples from the 150 individuals included in this study came from the Dr. Rocha Furtado Coroner's Office of the State Health Secretariat of Ceará, where the corpses had been autopsied to establish the cause of death, between 2005 and 2008. The specimens analyzed were 150 CSF, 120 tissue, and 109 blood samples that were collected up to 12 hours postmortem. Importantly, all CSF samples were not contaminated with blood. Of 109 blood specimens, it was possible to obtain 29 sera. All samples were received at room temperature. The samples maintained in formalin were sent to a reference unit to perform histopathologic and immunohistochemistry (IHC) analyses for the presence of the dengue antigen. CSF, blood, and serum were stored at -80°C until tested at the Central Public Health Laboratory of Ceará.

All subjects were suspected of dying of an infectious disease. They were tested for bacteria and fungi and presented negative results. The CSF from these patients was obtained by lumbar puncture. Each sample was accompanied by a form containing demographic and clinical data.

Case definition. A patient was confirmed as having had dengue if the clinical data showed signs or symptoms of dengue and one or more specimens tested positive for dengue by viral isolation, reverse transcriptase PCR (RT-PCR), IHC, detection of nonstructural 1 antigen (NS1Ag), or immunoglobulin M (IgM) detection. Patients with neurologic manifestation and viral isolation or RT-PCR or NS1Ag or IgM-positive for dengue in CSF were considered to have a CNS infection by DENV. Patients with immunoglobulin G (IgG)-positive serum samples for DENV were considered to have a secondary dengue infection. The frequencies and means were calculated using the Epi-info software and the data were qualitatively analyzed through the construction of tables.

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents. The study was conducted after approval by the ethics committee of São José Infectious Diseases Hospital (protocol

005/2009; CAAR: 0005.0.042.000-09), State Department of Health, Ceará, Brazil.

Virus isolation. A total of 150 CSF, 80 blood, and 29 serum samples were inoculated into a monolayer of a C6/36 *Aedes albopictus* cell line.⁹ Dengue viruses isolated were identified by an indirect fluorescent antibody test, with serotype-specific monoclonal antibodies, as described previously.¹⁰

RNA extraction. Viral RNA for the nested RT-PCR assay was extracted from 140 μL of 150 CSF specimens and 29 serum specimens by the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QUIAGEN, Valencia, CA), following the manufacturer's protocol. RNA was eluted in 60 μL of elution buffer and stored at -80°C until tested.

RT-PCR. The RT-PCR protocol for DENV detection and typing was carried out in 150 CSF samples and 29 available serum samples, as described previously.¹¹

NS1Ag detection. The NS1Ag Pan-E Dengue Early ELISA kit (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia) was used to detect the dengue NS1Ag in 150 CSF specimens, according to the manufacturer's recommendations.¹²

IgM antibody detection. The dengue IgM-capture ELISA (Panbio, Brisbane, Australia) was performed on 150 CSF samples, according to the manufacturer's instructions, except for the dilution, which was 1:2, similar to a test previously used to detect IgM in CSF.⁷

IgG antibody detection. The Panbio Dengue Duo Cassette was performed, according to the manufacturer's instructions, on CSF and serum samples that were positive for DENV in any of the tests previously used to characterize dengue infection. In this assay, the IgM and IgG are determined simultaneously, using a single sample. According to the manual, the sensitivity of this assay was calibrated so that for individuals with primary dengue, the IgM is positive while the IgG is negative. For secondary infections, either both the IgG and IgM are positive or just the IgG is positive.

RESULTS Epidemiology. A total of 150 patients with fatal outcomes, suspected of having infectious diseases, were studied for dengue diagnosis (table 1). Of 84 individuals found to have been infected with DENV, 47 (56.0%) were male and 37 (44.0%) female. The average age was 33 years, varying from 2 months to 86 years. The patients came from 27 municipalities in the state of Ceará, mainly from the capital, Fortaleza (45 cases, or 53.6%). The average

Table 2 Results of 84 fatal dengue cases according to available specimens and methodologies

Clinical sample	RT-PCR, P/T (%)	Virus isolation, P/T (%)	Serotype detected	IgM, P/T (%)	IgG, P/T (%)	NS1Ag, P/T (%)	IHC, P/T (%)
CSF	7/84 (8.3)	1/84 (1.2)	3 DENV-2; 5 DENV-3	27/84 (32.1)	34/84 (40.5)	22/84 (26.2)	ND
Sera	2/29 (6.9)	0/29 (0.0)	2 DENV-3	13/29 (44.8)	13/29 (44.8)	ND	ND
Blood	ND	1/80 (1.2)	1 DENV-3	ND	ND	ND	ND
Liver tissues	ND	ND	ND	ND	ND	ND	57/84 (67.9)
Total	9/113 (8.0)	2/193 (1.0)	3 DENV 2; 8 DENV 3	40/113 (35.4)	47/113 (41.6)	22/84 (26.2)	57/84 (67.9)

Abbreviations: IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; IHC = immunohistochemistry; ND = not done; NS1 Ag = nonstructural 1 antigen; P = positive; RT-PCR = reverse transcriptase PCR; T = tested.

Table 3 Dengue laboratory confirmation in 41 cases presenting neurologic manifestation according to specimens and methodologies in necropsy cases

NM	Age ^a /sex	Viral isolation		RT/PCR		IgM		IgG		NS1Ag	IHC
		CSF	blood/serum	CSF	serum	CSF	serum	CSF	serum	CSF	liver
E	39/M	-	DENV-3	DENV-3	DENV-3	-	-	+	+	-	-
E	24/M	-	-	-	ND	+	+	+	+	+	+
E	84/F	-	ND	-	ND	+	ND	-	ND	+	ND
E	39/M	-	-	-	ND	-	ND	-	ND	+	-
E	19/M	-	-	DENV - 2	ND	-	ND	+	ND	-	-
E	<1/M	-	-	DENV - 2	ND	+	ND	-	ND	+	ND
E	<1/M	-	-	-	ND	+	ND	-	ND	-	+
E	49/M	-	-	-	ND	-	ND	-	ND	+	+
E	16/F	-	-	-	ND	+	ND	+	ND	-	-
E	53/F	-	-	-	ND	+	+	-	-	-	-
E	2/F	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
E	57/F	-	-	-	ND	-	-	-	-	+	-
E	20/F	-	-	-	ND	+	+	+	+	+	-
E	24/F	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
E	43/M	-	-	-	ND	-	ND	-	ND	+	-
E	48/F	-	-	-	-	+	ND	+	ND	+	+
E	<1/F	-	ND	-	ND	+	+	-	-	+	ND
E	49/F	-	-	-	ND	+	-	+	+	-	+
E	51/F	-	-	-	ND	-	-	-	-	+	+
M	70/M	DENV-3	-	DENV-3	DENV-3	-	-	-	-	+	-
M	48/F	-	ND	DENV-3	ND	+	ND	-	ND	+	ND
M	31/M	-	-	DENV - 2	ND	+	ND	-	ND	-	-
M	42/F	-	-	-	ND	+	ND	-	ND	-	+
M	16/M	-	-	-	ND	+	ND	-	ND	+	ND
M	32/F	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
M	43/M	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	+	ND
M	1/M	-	ND	-	ND	+	ND	ND	ND	+	ND
ME	32/F	-	-	DENV-3	-	-	-	-	-	+	ND
ME	1/F	-	-	-	ND	+	ND	+	ND	-	-
ME	72/F	-	-	-	ND	+	ND	-	ND	-	+
ME	45/M	-	-	-	ND	-	ND	-	ND	+	-
ME	48/M	-	-	-	ND	-	ND	+	ND	+	ND
ME	17/F	-	-	-	ND	+	ND	+	ND	-	-
ME	47/F	-	ND	-	ND	+	ND	+	ND	-	-
ME	6/F	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
ME	12/F	-	-	-	-	-	ND	-	ND	+	-
ME	3/F	-	-	-	ND	+	+	+	+	-	-
ME	42/M	-	-	-	ND	+	+	+	+	-	+
ME	15/M	-	-	-	ND	-	-	-	-	+	+
ME	28/F	-	-	-	ND	+	+	+	+	-	+
ME	76/F	-	-	-	ND	+	+	-	-	-	+
Total	41	1	1	7	2	27	11	18	11	22	14

Abbreviations: E = encephalitis; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; IHC = immunohistochemistry; M = meningitis; ME = meningoencephalitis; ND = not done; NM = neurologic manifestation; NS1 Ag = nonstructural 1 antigen; RT-PCR = reverse transcriptase PCR.

^a Age in years.

Table 4 Histopathologic findings in necropsy cases on different available tissues

	Congestion, P/S (%)	Edema, P/S (%)	Hemorrhage, P/S (%)	Necrosis, P/S (%)	Meningitis, P/S (%)	Encephalitis, P/S (%)	Hepatitis, P/S (%)	Myocarditis, P/S (%)	Pneumonitis, P/S (%)
Brain (n = 75)	65/75 (86.7)	66/75 (88.0)	10/75 (13.3)	4/75 (5.3)	9/75 (12.0)	3/75 (4.0)	ND	ND	ND
Lung (n = 73)	47/73 (64.4)	40/73 (54.8)	41/73 (56.2)	0/73 (0.0)	ND	ND	ND	ND	8/73 (11.0)
Liver (n = 72)	23/72 (31.9)	8/72 (11.1)	18/72 (25.0)	28/72 (38.9)	ND	ND	18/72 (25.0)	ND	ND
Spleen (n = 68)	47/68 (69.1)	1/68 (1.5)	29/68 (42.6)	34/68 (50.0)	ND	ND	ND	ND	ND
Kidney (n = 13)	8/13 (61.5)	3/13 (23.0)	0/13 (0.0)	2/13 (15.4)	ND	ND	ND	ND	ND
Heart (n = 9)	0/9 (0.0)	6/9 (66.7)	3/9 (33.3)	0/9 (0.0)	ND	ND	ND	2/9 (22.2)	ND
Total	190/310 (61.3)	124/310 (40.0)	101/310 (32.6)	68/310 (21.9)	9/75 (12.0)	3/75 (4.0)	18/72 (25.0)	2/9 (22.2)	8/73 (11.0)

Abbreviations: ND = not done; P = presence; S = studied.

time between the onset of symptoms and death was 5 days, varying from 1 to 14 days.

Laboratory findings. Out of 150 patients studied, 84 were dengue positive on at least one of the following tests: RT-PCR, viral isolation, IgM, IgG, NS1Ag, and IHC. The diagnostic results yielded by the 6 distinct approaches are shown in table 2. There were 13 (44.8%) secondary and 16 (55.3%) primary infections.

Out of 84 dengue-positive individuals, 41 (48.8%) had some evidence of CSF infection by dengue viruses (table 3). All CSF specimens were investigated for the presence of bacterial or fungal pathogen and were negative.

The necropsy and histopathologic findings of tissues from dengue patients can be seen in table 4. The most frequent findings were congestion (61.3%), edema (40.0%), hemorrhage (32.6%), and necrosis (21.9%).

Clinical findings. Of 84 patients with dengue infection, 20 fulfilled the WHO criteria for DHF and in 9 patients neurologic manifestations coincided with clinical features of DHF. All others were classified as severe dengue.

Considering the clinical manifestations and necropsy, histopathologic and laboratory findings that characterize CNS involvement in patients with CSF positive for DENV, which represented 48.8% (41/84) of the positive fatal outcomes studied, the following neurologic diagnoses were made: 19/41 (46.3%) encephalitis, 14/41 (34.1%) meningoencephalitis, and 8/41 (19.5%) meningitis (tables 3 and 5).

DISCUSSION In the Northeastern Brazilian State of Ceará, deaths have occurred during outbreaks of dengue and sometimes the rapid evolution of symptoms until death makes it difficult to confirm the diagnosis during life.^{12,13}

It has been noted that in the cases not suspected of dengue infection, 12.7% (table 1) were positive for dengue, which shows the difficulty of clinical hy-

pothesis in those cases even after necropsy. The mean age of the subjects was 33 years. In Brazil, DHF and DHF have been characterized by a higher incidence in the adult population,¹³⁻¹⁵ although this pattern has been changing, with a significant increase in recent years in the proportion of DHF in individuals younger than 15 years.¹⁶

Neurologic involvement in dengue infections has been referred to as encephalopathy and attributed to fluid extravasations, cerebral edema, hyponatremia, liver or renal failure, and not to encephalitis due to localized invasion of the CNS. More recently, reports have demonstrated the presence of DENV in the brain and CSF by PCR, viral isolation, NS1Ag, and IgM detection, providing strong evidence that DENV has neurovirulent properties.^{7,8,12,17,18} The detection of DENV-2 and DENV-3 confirmed the serotypes that were circulating during the dengue epidemic period studied and are known to cause neurologic alterations.^{4,17,18}

As the presence of DENV antigens was previously demonstrated in CNS by IHC and ELISA,^{19,20} the feasibility of finding dengue NS1Ag in CSF by ELISA has been considered to be a new tool that can be used in patients with neurologic manifestations associated with dengue infection.¹² This antigen has been related to virus replication and viremia titer with risk to develop DHF. It has been found in the plasma of acute dengue-infected patients,²¹ so it is plausible to find it in the CSF of patients who have acute dengue infection with neurologic signs or symptoms.

IgM antibodies were found in CSF samples, which may indicate the neurovirulence of dengue viruses and their capacity to cause encephalitis.²² The detection of specific IgM antibodies in CSF had a high specificity (97%) for the neurologic diagnosis associated with dengue.⁷ In this study, the average number of days of the disease was 5, so when a positive IgM in CSF was found, it was considered an acute or recent dengue infection.

Table 5 Clinical manifestations and necropsy findings in 41 dengue confirmed cases in which CSF tested positive to dengue

Clinical and necropsy findings	Encephalitis	Meningo-encephalitis	Meningitis	Total (%)
Fever	14	11	5	30 (73.2)
Headache	13	6	4	23 (56.1)
Mental irritability	4	1	0	5 (12.2)
Breathlessness	9	7	0	16 (39.0)
Vomiting	5	4	2	11 (26.8)
Muscle pain	3	5	2	10 (24.4)
Tiredness	5	7	2	14 (34.1)
Abdominal pain	3	2	2	7 (17.1)
Somnolence	1	3	1	5 (12.2)
Restlessness	2	2	1	5 (12.2)
Dizziness	1	3	0	4 (9.8)
Diarrhea	2	0	0	2 (4.9)
Cough	3	3	0	6 (14.6)
Seizure	0	2	0	2 (4.9)
Coma	2	2	0	4 (9.8)
Hypotension	2	0	1	3 (7.3)
Splenomegaly	0	1	0	1 (2.4)
Paresis	1	0	1	2 (4.9)
Jaundice	1	1	0	2 (4.9)
Thorax pain	0	2	0	2 (4.9)
Legs edema	1	1	1	3 (7.3)
Neck stiffness	0	1	2	3 (7.3)
Altered sensorium	1	4	4	9 (21.9)
Comorbidities ^a	2	1	2	5 (12.2)
Cerebral edema	12	10	1	23 (56.1)
Cerebral congestion	10	3	0	13 (31.7)
Cerebral hemorrhage	1	0	0	1 (2.4)
Brain necrosis	1	1	0	2 (4.9)
Cerebellum edema	1	1	0	2 (4.9)
Cerebellum congestion	2	0	0	2 (4.9)
Herniation of the cerebellar tonsils	1	0	0	1 (2.4)
Meninges congestion	1	6	0	7 (17.1)
Meninges edema	0	4	0	4 (9.75)
Meninges hemorrhage	0	1	0	1 (2.4)
Mononuclear in meninges	0	2	1	2 (4.9)
Meninges secretion	0	3	3	6 (14.6)
Neuronal alterations	1	0	0	1 (2.4)
Intracranial hypertension	0	1	1	2 (4.9)
Acute renal failure	1	0	0	1 (2.4)
Disorientation	3	4	2	9 (21.9)
Sixth nerve palsy	0	1	0	1 (2.4)
Aphasia	0	1	0	1 (2.4)
Hepatomegaly	0	1	0	1 (2.4)

^a Comorbidities or special physiologic condition (hypertension; Wilson disease; pregnancy; HIV positive; kidney injury).

The most common CNS manifestations that can be found in dengue infections are headache, dizziness, sleeplessness, somnolence, restlessness, irritability, depression, and altered sensory such as lethargy, confusion, and coma.²² All of these manifestations were observed in this study, beside others considered less frequent, such as seizures, neck stiffness, and paresis.²²

Concerning the neurologic alteration found, the major diagnoses were encephalitis and meningoencephalitis. Evaluations of the contribution of neurologic dengue in suspected CNS infection in Jamaica and Vietnam showed encephalitis as the major neurologic diagnosis.^{18,23} Conversely, the opposite was found in Thailand, where a study with 80 children with dengue and neurologic manifestations reported only 1 case of encephalitis.²⁴ In Brazil, encephalitis and meningoencephalitis were responsible for 31.2% of neurologic manifestations in patients with DF.¹³ In Ceará, dengue with neurologic manifestations was reported in an epidemic in 1994, and, more recently, 2 cases were reported of bilateral optic neuritis after dengue infection in patients who recovered their visual acuity without treatment.^{25,26}

Involvement of the CNS in patients with acute dengue infection has been described previously. In a study in Thailand, neurologic manifestations were found in 5.4% of children with dengue.²⁴ In Vietnam, dengue infection was present in 4% of all cases of CNS infection.¹⁸ A study in Brazil reported 21.2% CNS involvement in patients with dengue.²⁷ The prevalence among the studies seems to vary with the severity of the disease.²⁷ The present study showed a high frequency of fatal dengue cases with neurologic infection by DENV. In a review of the magnitude and pattern of neurologic alteration among fatal DHF in Thai cases, a prevalence rate of 41.2% was found, considered to be an important fatal complication.²⁸

In this study, the most frequent alteration was cerebral edema, described previously as the predominant necropsy finding in dengue encephalopathy.²⁹ Intracranial hemorrhage was found in 13.3% of the brains analyzed. This was previously seen in a female patient with dengue shock syndrome in Brazil³⁰ and 5 other cases were treated in a neurosurgery unit in India, where 2 patients with deep-seated bleeding had very rapid deterioration and died.³¹ The meningeal injuries and neuronal damage found here could be compatible with CNS infection. A recent retrospective survey of fatal dengue cases in Brazil reported detection of viral antigens or RNA in brain tissue of 8 patients.¹⁷ Previously, the breakdown of the blood–brain barrier has been shown in fatal dengue cases.¹⁹

Clinical features of encephalitis, meningoencephalitis, and meningitis, necropsy, histopathologic

findings of the brain, and laboratory positive results in CSF, which can indicate the presence of DENV, led together to consider the invasion of CNS by DENV. In all cases studied, neurologic alteration was an important complication in fatal dengue cases. The improvement of diagnosis leading to a proper treatment will prevent fatal outcomes in patients with dengue infection of the CNS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. F.M.C. Araújo: participated in the study design, laboratory techniques, analysis and interpretation of data, and drafting, and revised the manuscript. Dr. M.S. Araújo: participated in drafting the manuscript, the discussion of clinical cases, and the analysis and interpretation of data. Dr. Nogueira: participated in laboratory techniques, analysis and interpretation of data, and revised the manuscript. Dr. Brilhante: participated in drafting the manuscript and discussion of laboratory diagnosis. Dr. Nunes: participated in conducting the autopsy, the histopathologic findings in the discussion and analysis, and interpretation of data. Dr. Rocha: participated in drafting the manuscript and discussion of laboratory diagnosis. Dr. Cordeiro: participated in drafting the manuscript and discussion of laboratory diagnosis. Dr. R.M.C. Araújo: participated in drafting the manuscript, the discussion of clinical cases, and the analysis and interpretation of data. Dr. Sidrim: participated in the study design, the preparation of the manuscript, analysis and interpretation of data, and revised the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Ricardo Carvalho de Azevedo e Sá from the Central Public Health Laboratory of Ceará for logistical support and Vera Lúcia R.S. Barros from the Evandro Chagas Institute for performing the immunohistochemistry tests.

Received July 21, 2011. Accepted in final form October 26, 2011.

REFERENCES

- World Health Organization. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment Prevention and Control, 2nd ed. Geneva: WHO; 1997.
- Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr HG. Dengue virus in Brazil, 1986–2006. *Rev Panam Salud Publica* 2007;22:358–363.
- Vasconcelos PFC, Menezes DB, Melo LP, et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1995;37:253–255.
- Cavalcanti LP, Vilar D, Souza-Santos R, Teixeira MG. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis* 2011;17:132–134.
- Chen WJ, Hwang KP, Fang AH. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1991;22:659–663.
- Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard D. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:848–851.
- Soares CN, Faria LC, Peralta JM, Freitas MRG, Puccioni-Sohler M. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. *J Neurol Sci* 2006;249:19–24.
- Puccione-Sohler M, Soares CN, Papaiz-Alvarenga R, Castro MJC, Faria LC, Peralta JM. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. *Neurology* 2009;73:1413–1417.
- Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978;40:531–544.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984;33:158–165.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vordam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:545–551.
- Araújo FMC, Brilhante RSN, Cavalcanti LPG, et al. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* 2011;177:128–131.
- Vasconcelos PFC, Menezes DB, Melo LP, et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1995;37:253–255.
- Cordeiro MT, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Oliveira VF, Melo WT, Carvalho EF. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995–2006. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40:605–611.
- Siqueira JB, Martelli CT, Coelho GE, Simplicio ACR, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. *Emerg Infect Dis* 2005;11:48–53.
- Teixeira MG, Costa MCN, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil: CAD. *Saúde Pub Rio de Janeiro* 2009;25(suppl 1):517–518.
- De Araújo JMG, Schatzmayr HG, Filippis AMB, et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods* 2009;155:34–38.
- Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* 2000;355:1053–1059.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* 1997;16:204–208.
- Lima MRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Limonta D, Santos FBA. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1147.
- Libraty DH, Young PR, Pickering D, et al. High circulation levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002;186:1165–1168.
- Lam SK. Dengue infections with central nervous system manifestations. *Neurol J Southeast Asia* 1996;1:3–6.
- Jackson ST, Mullings A, Bennett F, Khan C, Gordon-Strachan G, Rhoden T. Dengue infection in patients presenting with neurological manifestations in a dengue endemic population. *West Indian Med J* 2008;57:373–376.
- Pancharoen C, Thisyakorn U. Neurological manifestations in dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:341–345.
- Vasconcelos PFC, Rosa APAT, Coelho ICB, et al. Involvement of the central nervous system in dengue fever: three serologically confirmed cases from Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1998;40:35–39.
- Aragão REM, Barreira IMA, Lima LNC, Rabelo LP, Pereira FBA. Bilateral optic neuritis after dengue viral

- infection: case report. *Arq Bras Oftalmol* 2010;73:175–178.
27. Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci* 2008;267:36–40.
 28. Wiwanitkit V. Magnitude and pattern of neurological pathology in fatal dengue hemorrhagic fever: a summary of Thai cases. *Neuropathology* 2005;25:398.
 29. Hommel D, Talarmin A, Deubel V, et al. Dengue encephalitis in French Guiana. *Rev Virol* 1998;149:235–238.
 30. Ferreira MLB, Cavalcanti CG, Coelho CA, Mesquita SO. Manifestações neurológicas de dengue: estudo de 41 casos. *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63:488–493.
 31. Kumar R, Prakash O, Sharma BS. Intracranial hemorrhage in dengue fever: management and outcome: a series of 5 cases and review of literature. *Surg Neurol* 2009;72:429–433.

Dengue in Patients with Central Nervous System Manifestations, Brazil

**Fernanda Araújo, Rita Nogueira,
Maurício de Sousa Araújo, Anne Perdigão,
Luciano Cavalcanti, Raimunda Brilhante,
Marcos Rocha, Dina Feitosa Vilar,
Suzana Silveira Holanda,
Deborah de Melo Braga, and José Sidrim**

We investigated the prevalence of dengue in patients with suspected viral meningitis/meningoencephalitis in a dengue-endemic area. Cerebrospinal fluid analysis showed positive results and a 6.74× greater likelihood of identifying positive fluid in patients who died. Our findings support testing patients with neurologic manifestations for the virus in dengue-endemic areas.

Dengue is the most prevalent arboviral infection in humans (1). Since the reintroduction of dengue virus (DENV) into Brazil in the 1980s, >60% of the reported dengue cases in this region of the Western Hemisphere have occurred there (2). As the disease has become more common, unusual clinical signs, some of which involve the central nervous system, have been observed in dengue patients (2–4). We therefore assessed prevalence of dengue neurologic cases from Ceará State, Brazil, a region where dengue is endemic.

The Study

We enrolled 183 patients with suspected viral meningitis/meningoencephalitis admitted to São José Hospital of Infectious Disease and 26 deceased patients with suspected fatal meningitis who had been sent to the city of Fortaleza Coroner's Office. Cerebrospinal fluid (CSF)

was collected from all 209 patients. Study inclusion criteria were suspicion of viral meningitis/meningoencephalitis, a CSF cell count <500 cells/mm³, and negative results of culture and microscopic examination for bacteria and fungi. The CSF samples were not contaminated with blood. The study was performed retrospectively and used samples from patients who had been treated for meningitis during 2005–2008, a period during which a dengue epidemic may have occurred in Ceará. This study was approved by the Ethics Committee of São José Hospital of Infectious Disease (protocol no. 005/2009; Certificado de Apresentação para Apreciação Ética [Proof of Application for Ethical Review] 0005.0.042.000–09).

Dengue meningitis was suspected when a patient had fever and symptoms of irritation of the meninges, such as headache and neck stiffness; a diagnosis of dengue meningoencephalitis was established when the patient showed signs of focal involvement of the central nervous system (CNS). A diagnosis of dengue was confirmed with a DENV-positive CSF result by reverse transcription PCR (RT-PCR), nonstructural protein (NS) 1, or IgM against DENV (3,4).

Samples were analyzed by using RT-PCR, ELISA for NS1, and IgM monoclonal antibody and a rapid immunochromatography test for IgG (3–5). Viral RNA for the nested RT-PCR was extracted from 140 µL of the CSF samples by using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), following the manufacturer's protocol, and stored at –80°C until tested. The RT-PCR for DENV was performed on 209 CSF samples, as described (5).

The NS1Ag Pan-E Dengue Early ELISA kit (Panbio Diagnostics, Brisbane, Queensland, Australia) was used to detect the dengue NS1 in 209 CSF specimens in accordance with the manufacturers' instructions (4). The Dengue IgM Capture ELISA (Panbio Diagnostics) was performed on 209 CSF samples, according to the manufacturer's instructions. The Panbio Dengue Duo Cassette rapid test was performed, according to the manufacturer's instructions, with CSF specimens that were positive for DENV in any of the other tests used.

Of 209 CSF samples studied, 8 (3.8%) showed positive results in ≥1 test: 5 from the group admitted to São José Hospital of Infectious Disease and 3 deceased patients examined at the Fortaleza Coroner's Office (Table 1). Reviewed literature showed that the etiologic agents of most cases of viral meningitis in Brazil are enterovirus and herpesvirus; cytomegalovirus and dengue viruses are each responsible for 10% (2/20) (6).

Conclusions

DENV as a causal agent for meningitis has been rarely reported, although some cases have been described in the

Author affiliations: State Health Secretariat of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil (F.M.C. Araújo, A.C.B. Perdigão, D.C.L. Feitosa Vilar, S.G. Silveira Holanda and D.N. de Melo Braga); Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (R.M.R. Nogueira); Dr. José Frota Institute, Fortaleza (M. de Sousa Araújo); Federal University of Ceará, Fortaleza (L.P.G., Cavalcanti, F.M. de Carvalho Araújo, J.J. da Costa Sidrim, R.S.N. Brilhante, M.F.G. Rocha); State University of Ceará, Fortaleza (A.C.B. Perdigão); College Christus, Fortaleza (L.P.G. Cavalcanti)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1804.111522>

DISPATCHES

Table 1. Clinical features and virologic findings for 8 patients with meningitis/meningoencephalitis and confirmed cases of dengue, Brazil, 2005–2008*

Patient no.	Age, y/sex	Initial symptoms and signs	Progress and outcome	RT-PCR	NS1Ag	IgM	IgG	ND
1	45/M	Fever, headache, sweating, thorax pain, seizure, coma, chronic hypertension.	Cerebral edema and congestion; mononuclear cells in meninges; death after 6 d	–	+	–	–	ME
2	32/F	Fever, vomiting, neck stiffness, myalgia, abdominal pain, asthenia, somnolence, confusion	Meningitis, sixth nerve palsy; death after 14 d	DENV-3	+	–	–	ME
3	1/M	Fever, tremors, rigidity of limbs, otitis	Intracranial hypertension, meningitis; death after 24 h	–	+	+	–	M
4	6/F	Fever, headache, malaise, vomiting, drowsiness, neck stiffness	CSF: clear, 133 cells/mm ³ , 42% lymphocytes, 2% monocytes, 53% neutrophils, 3% eosinophils; protein 58 g/L, glucose 54 g/L; recovery after 9 d	–	–	+	+	M
5	58/M	Fever, headache, severe malaise, vomiting, lowering of consciousness, delirium	CSF: 300 cells/mm ³ ; lymphocytes, 87%, monocytes 5%, neutrophils 4%, protein 112 g/L, glucose 59 g/L; serum: AST 127 U/L, ALT 74 U/L; CT scan: expansible lesion measuring 4 × 2 × 2.3 cm; referred for surgical treatment	–	–	+	+	Brain tumor; M
6	5/F	Fever, headache, vomiting, neck stiffness	CSF: 490 cells/mm ³ , 2% monocytes, 5% lymphocytes, 93% neutrophils, protein 45 g/L, glucose 110 g/L; recovery after 8 d	–	–	+	–	M
7	15/M	Fever, headache, arthralgia, severe malaise, dry cough, dyspnea, epigastric pain	IHC result positive for dengue. CSF: clear; cerebrum and cerebellum with marked edema and vasocongestion of meninges and nerve tissue; death after 5 d	–	+	–	–	ME
8	24/M	Fever, headache, vomiting, and neck stiffness	CSF: 426 cells/mm ³ ; protein 136 g/L, glucose 55 g/L; recovery	–	–	+	+	M

*RT-PCR, reverse transcription PCR; NS1Ag, nonstructural protein 1 antigen; ND, neurologic diagnosis; –, negative; +, positive; ME, meningoencephalitis; DENV, dengue virus; M, meningitis; CSF, cerebrospinal fluid; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; CT, computed tomography; IHC, immunohistochemical test.

literature. In Jamaica, a study of 401 patients with suspected cases of viral infection of the CNS showed that 54 (13.5%) were positive for dengue; 18 (33.3%) of those patients showed clinical signs of meningitis (7). However, when we included patients in the cohort who were initially suspected of having CNS infection, the frequency of meningitis in this study was 18/401 (4.5%).

An investigation of dengue patients with suspected CNS infection conducted in Vietnam found 4.2% (16/378) of persons positive for DENV; 1 (0.3%) patient had meningitis (3). The frequency of finding dengue virus in patients with suspected cases of meningitis found in this study corroborated what was hypothesized in the literature: neurologic manifestations in patients with DENV have been reported in Ceará, but previous studies based laboratory diagnosis on serum, not on CSF as in our study, which indicated a relationship between dengue and CNS manifestations (8).

Of 5 patients treated at São José Hospital of Infectious Disease (Table 1), 3 recovered, 1 was given a diagnosis of a brain tumor, and 1 died. The patient who died was the only person of 5 with dengue fever who had signs and

symptoms of fatal dengue hemorrhagic fever (DHF) (such as intense malaise, dry cough with dyspnea, and abdominal pain) (9). Of the 3 deceased patients (Table 1), only 1 had signs of severe dengue, including myalgia, abdominal pain, asthenia, somnolence, and confusion. Suspected cases of meningitis with other pathologic changes might also be confused with dengue cases with CNS involvement (10). Of 8 dengue patients, 2 had signs and symptoms of dengue infection. In Brazil, meningitis was confirmed for patients with oligosymptomatic dengue infection in the cities of Vitória and Rio de Janeiro (10,11).

The presence of DENV NS1 antigen (NS1Ag) has been associated with virus replication and viremia with the risk for development of DHF (12). The NS1Ag was detected in 4 of the fatal cases reported here, but because none fulfilled the World Health Organization criteria for DHF, they were considered to have been cases of severe dengue because the patients died (1) (Table 1). Detection of dengue IgM in CSF has shown a high specificity (97%) for diagnosing neurologic dengue and might be associated with the neurovirulence of DENV and its ability to cause encephalitis (13). Prior to the 1996 publication of findings

Table 2. Risk for death among patients with meningitis/meningoencephalitis with DENV+ versus DENV- cerebrospinal fluid test results, Brazil, 2005–2008*

Outcome	DENV+	DENV-	Total
Death	4 (14.8)	23 (85.2)	27 (100)
Recovery	4 (2.2)	178 (97.8)	182 (100)

*Values are no. (%) patients. Relative risk 6.74 (95% CI 1.79–25.38); $p < 0.0109$. DENV, dengue virus; –, negative; +, positive.

by Lum et al., involvement of the CNS in dengue infection had been thought to be secondary to vasculitis only; direct involvement of the brain by DENV was thought to be unlikely (14). The literature has reported detection of DENV in the brain and CSF by PCR and virus isolation and detection of NS1 and dengue IgM, providing strong evidence that DENV has neurovirulent properties (3,4,11,13–15). Meningeal lesions, neuronal damage, and evidence of DENV in CSF by RT-PCR and ELISA (NS1/IgM) found in this study are consistent with CNS infection (Table 1).

The prevalence of CNS involvement in patients with dengue infection seems to vary with severity of dengue cases (11). Mortality rates also vary among studies; the reported rate of neurologic dengue was found to be 3.7% (2/54) in a study in Jamaica (7). In another study conducted in Vietnam, no patients with the neurologic form of dengue died (3); our study found a mortality rate of 1.9% (4/209). However, the proportional positivity was higher for the group of patients who died (4/27, 14.8%) than for those who recovered (4/182, 2.2%) (Table 2). The relative risk for identifying DENV-positive CSF in patients who died was 6.74× greater than that for patients who recovered (95% CI 1.79×–25.38×; $p < 0.0109$). No patients had DHF or a concurrent condition to predict deterioration to death, thus suggesting that patients with meningitis/meningoencephalitis and DENV-positive CSF may have higher risk for development of severe forms of dengue infection.

The high risk for death among patients with dengue meningitis/meningoencephalitis in this study supports the need for increased surveillance. Dengue should be suspected in patients with neurologic manifestations in dengue-endemic areas, and appropriate treatment should be given to prevent death.

This study was supported by the Brazilian National Research Council, process MCT/CNPq 14/2009, and by the Ceará State Scientific Development Foundation, process FUNCAP 09100097-1.

Dr Araújo is a researcher in the dengue reference laboratory in the State Health Secretariat in Ceara. Her research interest and work for the past 23 years is in dengue viruses in Brazil.

References

- World Health Organization. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: The Organization; 1997.
- Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr HG. Dengue virus in Brazil, 1986–2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007;22:358–63. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892007001000009>
- Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet*. 2000;355:1053–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02036-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02036-5)
- Araújo FMC, Brilhante RSN, Cavalcanti LPG, Rocha MFG, Cordeiro RA, Perdigão ACB, et al. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods*. 2011;177:128–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.07.003>
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30:545–51.
- Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, Freitas MRG, Puccioni-Sohler M. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. *J Neurol Sci*. 2011;303:75–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.01.012>
- Jackson ST, Mullings A, Bennett F, Khan C, Gordon-Strachan G, Rhoden T. Dengue infection in patients presenting with neurological manifestations in a dengue endemic population. *West Indian Med J*. 2008;57:373–6.
- Vasconcelos PFC, Travassos Da Rosa APA, Coelho ICB, Menezes DB, Travassos Da Rosa ES, Rodrigues SG, et al. Involvement of the central nervous system in dengue fever: three serologically confirmed cases from Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40:35–9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651998000100008>
- Guzmán MG, Kouri G, Morier L, Soler M, Fernández A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. *Bull Pan Am Health Organ*. 1984;18:213–20.
- Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, Freitas MRG, Puccioni-Sohler M. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: report of a case. *Int J Infect Dis*. 2010;14:e150–2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.03.016>
- Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci*. 2008;267:36–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2007.09.040>
- Duong V, Ly S, Ong S, Cgroeng N, Try PL, Deubel V, et al. Variation of dengue NS1 antigen measured by commercial ELISA kit in various forms of dengue infections and assessment of the association between NS1 level and disease severity. *BMC Proceedings*. 2011;5:47. <http://dx.doi.org/10.1186/1753-6561-5-s1-p47>
- Soares CN, Faria LC, Puccioni-Sohler M, Peralta JM, Freitas MRG. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. *J Neurol Sci*. 2006;249:19–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2006.05.068>
- Lum LCS, Lam SK, Choy YS, George R, Harun F. Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54:256–9.
- Araújo JMG, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FB, Cardoso MA, Britto C, et al. Retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods*. 2009;155:34–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.023>

Address for correspondence: Fernanda Araújo, Av. Barão de Studart, 2405, 60120-002, Fortaleza, CE, Brazil; email: fernanda.montenegro@lacen.ce.gov.br