

# Infecção simultânea por Dengue 1 e 3 em Itapevi, SP, Brasil

## Concurrent infection by Dengue 1 and 3 in Itapevi, SP, Brazil

RIALA6/982

Iray Maria ROCCO<sup>1\*</sup>; Fabíola Maiumi OSHIRO<sup>1</sup>; Cecília Luiza Simões SANTOS<sup>2</sup>Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz -Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Biologia Molecular - Av. Dr. Arnaldo 355 - 1246-902, São Paulo, SP, Brasil

e-mail: imrocco@uol.com.br

Recebido: 18/11/2003 - Aceito para publicação: 04/03/2004

### RESUMO

Casos de infecções simultâneas por vírus dengue em um mesmo paciente podem ocorrer em epidemias em que circulam múltiplos sorotipos do vírus. No Brasil esse fato foi relatado pela primeira vez em Miranda, MS, em 1996 e em Barretos, SP, em 2001. Em ambos foram isolados dengue 1 e 2. Em 2003 foi observado mais um caso, em Itapevi, município da Grande São Paulo. O isolamento dos vírus foi obtido em cultura de células C6/36 e a identificação foi feita por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais para os quatro sorotipos. Foram isolados vírus dengue tipo 1 e tipo 3, resultado confirmado pela reação de RT/PCR, usando RNA extraído do sobrenadante da cultura de células infectada. Este caso demonstra mais uma vez a importância do isolamento viral na vigilância epidemiológica do dengue, pois ele pode ajudar a determinar a frequência das infecções com dois ou mais sorotipos, assim como verificar se essas infecções podem estar associadas a formas mais severas da doença.

**Palavras-Chave.** dengue, infecção simultânea, isolamento de vírus

### ABSTRACT

Simultaneous infection by dengue viruses in the same patient may occur during epidemics in which multiple dengue virus serotypes circulate. In 1996, this occurrence was reported for the first time in Brazil in Miranda, MS, and afterwards in Barretos, SP in 2001. In both instances the dengue viruses 1 and 2 were isolated. In 2003, in Itapevi - a town located in the Great São Paulo area, another evidence was reported. Viruses isolation was carried out in C6/36 cells culture, and identified by means of indirect immunofluorescence test, employing monoclonal antibodies produced for four Dengue serotypes. Dengue 1 and 3 were isolated, and they were confirmed by RT/PCR. For performing this technique, the RNA extracted from infected cells culture supernatant was employed. The data obtained from the present study corroborate the relevance of viral isolation for dengue epidemiological surveillance strategies, as it may give support in determining the frequency of infections with multiple serotypes, and also to investigate whether these infections might be associated with the severity degree of disease.

**Key Words.** dengue, concurrent infection, virus isolation

### INTRODUÇÃO

O dengue é, depois da malária, a segunda mais importante doença tropical no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde o dengue é endêmico em cerca de 100 países e metade da população mundial vive em áreas de risco<sup>2</sup>. A incidência de infecções por dengue nas Américas têm aumentado drasticamente desde os anos 60, com a ocorrência da forma hemorrágica em novas áreas<sup>14</sup>. Fatores demográficos e sociais têm permitido que centros urbanos se tornem hiperendêmicos, com ampla distribuição do mosquito vetor *Aedes aegypti* e a presença dos 4 sorotipos de dengue<sup>5</sup>.

No Brasil a tendência de aumento da incidência da doença tem sido observada nos últimos anos<sup>2</sup>. A introdução e rápida disseminação do dengue 3 mostrou a facilidade da circulação de novos sorotipos e cepas do vírus no país.

Em epidemias onde circulam múltiplos sorotipos é possível a ocorrência de infecções simultâneas por mais de um tipo de dengue em um mesmo indivíduo. O primeiro caso de dupla infecção foi documentado por Gubler e cols em 1982, em Porto Rico, com isolamento de dengue 1 e 4<sup>4</sup>. Outros casos de infecções simultâneas têm sido relatados<sup>8,9,13,17</sup>. Loroño-Pino et al. estudaram a frequência dessas infecções em amostras de epidemias ocorridas na Indonésia entre 1975 a 1978, em Porto

Rico em 1994 e no México em 1996, com achados de duplas e triplas infecções simultâneas<sup>12</sup>. No Brasil, esse fato já foi documentado por duas vezes; o primeiro em Miranda, MS<sup>15</sup>, em 1996 e o segundo, em Barretos, SP<sup>16</sup>, em 2001. Em ambos foram isolados dengue 1 e 2.

Em 2003 foi observado mais um caso de dupla infecção, em Itapevi, município da Grande São Paulo, que em 2003 teve 2.573 casos de dengue notificados, dos quais 2.154 foram confirmados, com isolamento dos sorotipos 1 e 3 (Dados do Centro de Vigilância Epidemiológica, SES-SP).

O objetivo desse trabalho é enfatizar a importância do isolamento viral para a detecção de infecções simultâneas por vírus dengue, possibilitando investigar a associação dessas infecções com formas mais graves da doença e a caracterização de possíveis cepas recombinantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e identificação dos vírus

A paciente, dona de casa de 44 anos residente em Itapevi, apresentou febre por dois dias, seguida de cefaléia, náuseas, prostração e mialgia, evoluindo para a cura sem maiores complicações.

O isolamento dos vírus foi realizado em tubo com culturas de células de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36<sup>7</sup>, com 1 ml de meio Leibovitz (L-15), suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de triptose fostato e 10% de soro fetal bovino. No dia seguinte foi acrescentado 1 ml de meio L-15 sem soro, contendo 100UI/ml de penicilina e 100µl/ml de estreptomicina e foram inoculados 20µl de soro da paciente, colhido no segundo dia após o início dos sintomas. Após 9 dias à 28°C a cultura de células foi observada ao microscópio para verificar a presença de efeito citopático. As células foram desprendidas do tubo por agitação e sedimentadas por centrifugação por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi estocado a -70°C e com o "pellet" das células, ressuscitado com PBS, foram realizados testes de imunofluorescência indireta<sup>3</sup>. No primeiro, foi utilizado fluido ascítico de camundongo anti dengue e anti imunoglobulina total de camundongo conjugada a isotiocianato de fluoresceína. A identificação final foi feita por imunofluorescência indireta, empregando anticorpos monoclonais fornecidos pelo CDC de Atlanta, segundo a técnica de Gubler et al.<sup>3</sup>

### Diagnóstico molecular

O RNA viral foi extraído do sobrenadante da cultura de células, procedendo-se a síntese e amplificação do cDNA, segundo o protocolo descrito por Lanciotti et al<sup>11</sup>. Inicialmente foi realizada a amplificação dos vírus dengue por oligonucleotídeos deduzidos de uma região consensual aos quatro sorotipos, seguida de re-amplificação (*Nested RT/PCR*) com iniciadores internos a esta seqüência comum e específicos para cada sorotipo. Os fragmentos de DNA obtidos nas reações

de *Nested RT/PCR*, com tamanhos distintos, correspondentes aos sorotipos, foram visualizados por análise eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídeo, para a tipagem molecular.

## RESULTADOS

As culturas de células examinadas ao microscópio mostraram efeito citopático característico do vírus dengue, com a formação de sincícios e vacúolos. O teste de imunofluorescência apresentou reação positiva e a identificação com anticorpos monoclonais foi reagente para dengue tipo 1 e tipo 3. A reação de *Nested RT/PCR* detectou a presença de fragmentos de 482 pb e 290 pb, característicos de dengue tipos 1 e 3 respectivamente (Figura 1)

## DISCUSSÃO

Desde 1986 epidemias de dengue vem ocorrendo no Brasil. Após anos de transmissão, algumas áreas se tornaram endêmicas com a circulação de 2 ou 3 sorotipos<sup>2</sup>. A hiperendemicidade e a presença de vários sorotipos possibilitam a ocorrência de infecções simultâneas e oferecem a chance dos mosquitos *Aedes aegypti* se infectarem com 2 ou mais vírus. Experimentos em laboratório já demonstraram que o *A. aegypti* pode ser infectado por duplas combinações de diferentes vírus e que também pode transmitir-los simultaneamente<sup>1,10</sup>. Embora não seja conhecido se a transmissão ocorre por 2 diferentes mosquitos ou por 1, infectado com 2 vírus, casos de duplas infecções tem sido relatados na Ásia e nas Américas<sup>4,8,9,12,15,16,17</sup>.



**Figura 1.** Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos de *Nested RT/PCR*. Amostras de RNA, extraídas do fluido da cultura celular inoculada com: Soro da paciente com dupla infecção (2); Vírus dengue tipo 1, cepa Hawaii (3); Vírus dengue tipo 2, cepa NG2 (4); Vírus dengue tipo 3, cepa H87 (5); Vírus dengue tipo 4, cepa H241 (6). Controle negativo (7). O padrão de peso molecular está indicado à esquerda (1).

A detecção de mais um caso de dupla infecção por dengue no Brasil vem confirmar que técnicas simples como o isolamento de vírus e a imunofluorescência indireta são ferramentas tão precisas quanto a biologia molecular para identificação de infecções simultâneas. Atualmente, o diagnóstico de dengue, realizado por biologia molecular ainda é muito dispendioso para utilização em grande escala. Por isso a simplicidade e a alta especificidade da imunofluorescência são de grande importância na vigilância epidemiológica do dengue, pois possibilitam determinar a frequência das infecções com dois ou mais sorotipos e verificar se essas infecções estão associadas a formas mais severas da doença.

Embora no caso estudado esse fato não tenha sido observado, o aumento da frequência das epidemias e a ocorrência do dengue hemorrágico em áreas tropicais das Américas e da Ásia coincidem com a hiperendemicidade nessas regiões<sup>12</sup>.

A diversidade genética que os vírus dengue apresentam está evidenciada pela existência dos quatro sorotipos e genótipos distintos, associados a cada um deles<sup>19</sup>. Um dos fatores que contribui para essa diversidade é a taxa relativamente alta de mutações que ocorre na replicação do vírus cujo material genético é RNA. A dupla infecção levanta também a possibilidade da recombinação genética, um fato possível de ocorrer em áreas de hiperendemicidade<sup>6,17,20</sup>. Esse mecanismo é um processo raro em vírus RNA, demonstrado recentemente em vários membros da família Flaviviridae<sup>17</sup>. Salientamos que a condição essencial para a ocorrência da recombinação é a existência de co-infecção. Assim, consideramos ser importante a divulgação de casos de infecções simultâneas, como o aqui relatado, pois isso estimula pesquisas visando a caracterização de cepas recombinantes, para que se possa avaliar em que extensão este mecanismo pode estar ocorrendo em populações naturais dos vírus dengue.

## REFERÊNCIAS

1. Chamberlain, R.W.; Sudia, W.E. Dual infections of Eastern and Western encephalitis virus in *Culex tarsalis*. **J. Infect. Dis.**, 101: 233-236, 1957.
2. FUNASA, {<http://www.funasa.gov.br/epi/dengue>
3. Gubler, D.J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, 33: 158-165, 1984.
4. Gubler, D.J. et al. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, 34: 170-173, 1985.
5. Gubler, D.J. Epidemic dengue/Dengue haemorrhagic fever: a global health problem in the 21<sup>st</sup> century. **Dengue Bulletin, World Health Organization**, 21: 1-15, 1997.
6. Holmes, E.C.; Worobey, M.; Rambaut, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Mol. Biol. Evol.**, 16: 405-409, 1999.
7. Igarashi, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **J. Gen. Virol.**, 40: 531-544, 1978.
8. Kanesa-Thanan; N. et al. Molecular and epidemiologic analysis of dengue virus isolates from Somalia. **Emerg. Infect. Dis.**, 4: 299-303, 1998.
9. Laille, M.; Deubel, V.; Saint-Marie, F.F. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by polymerase chain reaction. **J. Med. Virol.**, 34: 51-54, 1991.
10. Lam, K.S.K.; Marshall, I. D. Dual infections of *Aedes aegypti* with arbovirus. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, 17: 625-636, 1968.
11. Lanciotti, R.S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 41-47, 1993.
12. Loroño-Pino, M.A. et al. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 61(5): 725-730, 1999.
13. Maneekarn, N. et al. Applications of polymerase chain reaction for identification of dengue virus isolated from patient sera. **Microbiol. Immunol.**, 37: 41-47, 1993.
14. Pinheiro, F.P.; Chuit, R.C. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. **Infect. Med.**, 244-251, 1998.
15. Rocco, I.M.; Barbosa, M.L.; Kanomata, E.H.N. Simultaneous infections with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 40(3): 151-154, 1998.
16. Santos, C.L.S. et al. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 45(1): 11-16, 2003.
17. Twiddy, S.S.; Holms, E.C. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. **J. Gen. Virol.**, 84: 429-440, 2003.
18. Wang, W.K. et al. Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, 36(2): 89-95, 2003.
19. Westaway, E.G.; Blok, J. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. In: **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, edited by D.J. Gubler and G. Kuno, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, p. 147-174, 1997.
20. Worobey, M.; Rambaut, A.; Holmes, E.C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96(13): 7352-7357, 1999.