

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICIA DE RIBEIRÃO PRETO

IGOR BARCELLOS PRECINOTI

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E SOROLÓGICOS DA DENGUE  
EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV: UM ESTUDO COORTE PROSPECTIVO NA CIDADE DE  
BIRIGUI, ESTADO DE SÃO PAULO**

Ribeirão Preto  
2022



IGOR BARCELLOS PRECINOTI

**Avaliação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e sorológicos da dengue em pacientes infectados pelo HIV: um estudo coorte prospectivo na cidade de Birigui, Estado de São Paulo.**

**Versão Original**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Medicina – Investigação Clínica

Orientador: Prof. Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Precinoti, Igor Barcellos

Avaliação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e sorológicos da dengue em pacientes infectados pelo HIV: um estudo coorte prospectivo na cidade de Birigui, Estado de São Paulo.

77f

Tese de doutorado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Clínica Médica.

Opção: Investigação Clínica

Orientação: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

1. Coinfecção Dengue/HIV, 2. Dengue, 3. HIV, 4. Imunoglobulinas, 5. Sorologias

Nome: Igor Barcellos Precinoti

**Título:** Avaliação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e sorológicos da dengue em pacientes infectados pelo HIV: um estudo coorte prospectivo na cidade de Birigui, Estado de São Paulo.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Medicina – Investigação Clínica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Professor: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Professor: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Professor: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedicatória

---

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, em especial minha esposa Vanessa que me apoiou durante todo este período.

Aos meus filhos Henrique e Lívia que me deram a alegria de ser chamado de Pai.

# Agradecimientos

---



## **Agradecimentos**

Agradeço inicialmente a Deus que permitiu que eu trilhasse os caminhos que culminaram neste trabalho

A Vanessa, minha esposa e parceira, que sempre esteve ao meu lado.

A minha mãe e irmãos que torceram e acompanharam minha trajetória

Agradeço ao professor Benedito Antônio Lopes da Fonseca que acreditou em mim e foi um exemplo desde meu primeiro dia como residente até a conclusão deste doutorado. E agradeço também a todos os docentes e contratados do Serviço de Infectologia do HC-FMRP que de alguma forma participaram de minha formação.

Agradeço também o amigo Fernando Henrique Alves Benedito que me ajudou neste projeto.

O Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

Resumo

---

## RESUMO

**PRECINOTI**, Igor Barcellos. Avaliação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e sorológicos da dengue em pacientes infectados pelo HIV: um estudo coorte prospectivo na cidade de Birigui, estado de São Paulo. 2022. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Com o advento da Terapia Antirretroviral ocorreu uma mudança na história natural da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que atualmente pode ser considerada uma doença crônica. Neste contexto foi possível observar um aumento da incidência de eventos não relacionados ao HIV nos pacientes soropositivos, dentre eles a coinfeção pelos vírus dengue. Este trabalho acompanhou, prospectivamente, 161 pacientes em seguimento no ambulatório de HIV/AIDS de Birigui-SP, pelo período de 4 anos, analisando o perfil epidemiológico destes pacientes e avaliando os aspectos clínicos e sorológicos daqueles que apresentaram sintomas ou foram diagnosticados com dengue durante o período do estudo. O estudo investigou as características da apresentação clínica e o desfecho da doença, além de analisar o perfil imunológico relacionados à dengue com a pesquisa das imunoglobulinas IgG, IgM anti-dengue. Finalmente, também foram realizados dois inquéritos sorológicos para a infecção pelos vírus dengue no início e ao final do estudo. Durante o período do estudo, o município de Birigui enfrentou duas grandes epidemias de Dengue. No inquérito sorológico inicial 5 pacientes apresentavam IgG positivo, 1 IgM positivo e 2 IgG e IgM positivos. No inquérito final 10 indivíduos apresentavam IgG positivo, 12 IgM positivo e 1 indivíduo apresentava presença tanto de IgM como IgG. Somente 2 pacientes positivos no inquérito inicial mantiveram sua positividade ao final do estudo. Nenhum paciente foi notificado ou apresentou quaisquer sintomas de dengue durante o seguimento, apesar da identificação de pacientes que passaram a apresentar anticorpos anti-dengue ao final do estudo. Estes dados evidenciam que pacientes soropositivos apresentam uma apresentação clínica mais branda para a infecção pelos vírus dengue e que pode haver uma perda dos anticorpos IgG anti-dengue nestes pacientes.

Palavras Chave: Coinfeção Dengue/HIV, Dengue, HIV, Imunoglobulinas, Sorologias

# Abstract

---

## ABSTRACT

**PRECINOTI, Igor Barcellos.** Evaluation of clinical, epidemiological and serological aspects of dengue in HIV-positive patients in Birigui-São Paulo: a prospective cohort study. Thesis (Doctorate), Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022

The natural history of the human immunodeficiency virus (HIV) infection changed after the advent of Antiretroviral Therapy. It is currently considered a chronic disease. The incidence of non-HIV-related events increased among seropositive patients, including Dengue virus coinfection. The authors prospectively followed, for four years, 161 patients under treatment at an HIV clinic in Birigui-SP. They performed an epidemiological characterization, evaluated the clinical and serological aspects of those symptomatic or diagnosed with Dengue, identification of the clinical presentation and its outcome, and their immunological profile through the analysis of IgG and IgM Dengue antibodies. Finally, two serological surveys were carried out for dengue virus infection at the beginning and at the end of the study. The city experienced two major dengue epidemics during the study period. In the initial serological inquiry, 5 presented IgG positive, 1 IgM positive, and 2 IgG and IgM positive. In final serológica inquiry, 10 presented IgG positive, 12 IgM positive, and 1 IgM and IgG positives. Only two patients kept their seropositivity at the end of the study. No patient reported the disease or Dengue symptoms in the period. Despite the identification of patients with anti-Dengue immunoglobulins at the end of the study

Those data spotlighted that seropositive patients may have mild clinical presentation for Dengue, and it possibly have a loss of Dengue IgG antibodies.

**Keywords:** Dengue/HIV Coinfection, Dengue, HIV, Immunoglobulins, Serology

# Lista de Tabelas

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Número de notificações, casos confirmados, casos descartados e óbitos por Dengue confirmados no município Birigui dos anos de 2015 a 2019. ....	49
<b>Tabela 2</b> –	Caracterização demográfica da população do estudo. ....	50
<b>Tabela 3</b> –	Quantificação da Carga Viral do HIV e dos Linfócitos T CD4++ (CD4) dos pacientes nos momentos da inclusão e ao final do estudo. ....	51
<b>Tabela 4</b> -	Quantitativo de pacientes utilizando antirretrovirais separados por classes dos medicamentos no momento da inclusão e ao final do estudo. ....	52
<b>Tabela 5</b> –	Quantitativo da detecção dos anticorpos anti-dengue IgG e IgM no momento da inclusão e ao final do estudo .....	53
<b>Tabela 6</b> –	Variáveis demográficas e relacionadas a infecção pelo HIV dos pacientes com resultado positivo para a pesquisa de anticorpos anti-Dengue (IgM e/ou IgG) na inclusão do estudo e sua relação com a pesquisa de anticorpos ao final do estudo. ....	54

# Lista de Figuras

---



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genoma do HIV-1 e sua relação com as principais proteínas .....	27
Figura 2 - História natural do HIV .....	28
Figura 3 - Entrada no vírus na célula.....	29
Figura 4 - Sítios de ação dos antirretrovirais.....	31
Figura 5 - Genoma do vírus Dengue e suas principais proteínas. ....	33
Figura 6 - Dinâmica das imunoglobulinas anti-Dengue.....	34

# Lista de Abreviaturas e Siglas

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AZT	Zidovudina
C	Capsídio
CCR5	CC-chemokine receptor 5 ou CC Receptor de quimiocina 5
CD4+	Presença do cluster of differentiation 4
CD8+	Presença do cluster of differentiation 8
CID	Código Internacional de Doenças
CXCR4	CXC-chemokine receptor 4 ou CXC receptor de quimiocina 4
DC	Dendritic cell ou célula dendrítica
ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
DENV	Virus Dengue
DNA	Deoxyribonucleic acid ou ácido desoxirribonucleico
E	Envelope
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EUA	Estados Unidos da América
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy ou Terapia Antirretroviral de Alta Eficácia
HIV	Human Immunodeficiency Virus ou Virus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus ou Virus T Linfotrófico Humano
IF	Inibidores de fusão
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INI	Inibidores de integrase
IP	Inibidores de Protease
ITN	Inibidores da Transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeos
ITNN	Inibidores da Transcriptase reversa não análogos nucleosídeos
LAV	Lymphadenopathy-Associated Virus

NK	Natural Killer
NS	Proteínas não estruturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHO	Pan American Health Organization ou Organização Pan Americana de Saude
prM	Membrana/Proteinas de membrana
PVHA	Pessoas Vivendo com HIV/AIDS
RNA	Ribonucleic acid ou ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
SAE	Serviço de Atendimento Especializado
SIV	Simian immunodeficiency virus ou Vírus da Imunodeficiência Símia
TARV	Terapia antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	Linfocitos T Helper
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV and AIDS ou Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV e AIDS
WHO	World Health Organization ou Organização Mundial da Saude

# Lista de Símbolos e Sinais

---

## LISTA DE SÍMBOLOS E SINAIS

<	Maior
>	Menor
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
cel/mm <sup>3</sup>	Células por milímetros cúbicos
Hab/Km <sup>2</sup>	Habitantes por metro quadrado
Nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
Rpm	Rotações por minuto
μL	Microlitros

# Sumário

---

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	25
1.1.1. Aspectos históricos e epidemiológicos da Infecção pelo HIV.....	25
1.1.2. Estrutura do HIV .....	26
1.1.3. História Natural e Imunopatogênese .....	28
1.1.4. Terapia antirretroviral .....	30
1.2. Infecção pelos vírus dengue .....	32
1.2.1. Aspectos históricos e epidemiológicos da infecção pelo vírus dengue.....	32
1.1.1. A estrutura do Vírus Dengue .....	33
1.1.2. Imunopatogênese e história natural .....	34
1.1.3. Tratamento da infecção pelo DENV .....	35
1.2. A Coinfecção HIV e Dengue .....	36
2. JUSTIFICATIVA .....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivos Gerais .....	41
3.2. Objetivos Específicos .....	41
3.3. Objetivos Secundários.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
4.1. Desenho do estudo e considerações éticas.....	43
4.2. Pacientes.....	43
4.2.1. Critérios de inclusão .....	43
4.2.2. Critérios de exclusão .....	43
4.3. Caracterização epidemiológica dos pacientes.....	43
4.4. Avaliação clínica .....	44
4.4.1. Quantificação da Carga Viral do HIV.....	45
4.4.2. Quantificação dos Linfócitos T CD4+.....	45
4.5. Avaliação sorológica dos pacientes .....	45
4.5.1. ELISA de captura para detecção de IgM anti-dengue .....	46
4.5.2. ELISA indireto para detecção de IgG anti-dengue .....	46
4.6. Análise estatística .....	47
5. RESULTADOS.....	49
5.1. O Local de estudo.....	49
5.2. A População do estudo .....	49
5.3. Características demográficas da população do estudo.....	50
5.4. Características relacionadas a infecção e tratamento do HIV .....	51
5.5. Características relacionadas a infecção pelo vírus Dengue .....	53
6. DISCUSSÃO.....	57



7. CONCLUSÕES.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
REFERÊNCIAS .....	64
ANEXOS.....	711

# Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)

#### 1.1.1. Aspectos históricos e epidemiológicos da Infecção pelo HIV

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi primeiramente identificada nos Estados Unidos da América (EUA) em 1981 após relatos de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* e candidíase mucosa em homossexuais jovens do sexo masculino previamente saudáveis (GOTTLIEB *et al.*, 1981). Posteriormente, foram descritos quadros clínicos semelhantes em pacientes hemofílicos que receberam hemoderivados que previamente passaram por processos de filtração que retinham bactérias e fungos, este fato chamou atenção para uma possível etiologia viral para a doença que viria a ser conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (MONTAGNIER, 2010). Em 1983 foi identificado um novo retrovírus que foi denominado Lymphadenopathy-Associated Virus (LAV) por um grupo de pesquisadores do Instituto Pasteur (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983) e em 1984 Robert Gallo, nos EUA, descreveu um vírus isolado em linfonodos de pacientes com AIDS que foi nominado Human T-Lymphotropic Virus III (HTLV III), devido a diferenças entre os vírus já descritos HTLV I e HTLV II (GALLO *et al.*, 1984). Em 1985, análises das sequências de nucleotídeos demonstraram a semelhança destes vírus e que eles pertenceriam à mesma família e, em 1986, o International Committee on Taxonomy of Viruses renomeou estes agentes como Human Immunodeficiency Virus (HIV) (COFFIN *et al.*, 1986).

As formas de transmissão sexual e sanguínea foram propostas em 1983, considerando os grupos populacionais mais frequentemente acometidos (JAFFE *et al.*, 1983) e, neste mesmo ano, também foi identificado o meio de transmissão vertical (mãe-filho) (OLESKE *et al.*, 1983).

Durante a infecção pelo HIV ocorre um comprometimento gradual da função do sistema imunológico que, em suas fases finais, há uma profunda imunodepressão e a doença passa a ser denominada Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), levando o paciente a morte na ausência de tratamento (KAHN; WALKER, 1998).

A partir de 1993 ocorreu um evento marcante na história da infecção pelo HIV pois foi implementada uma estratégia de terapia antirretroviral combinada, conhecida como Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) resultando em uma drástica mudança na morbimortalidade relacionada a doença (BRODT *et al.*, 1997; EASTERBROOK; MEADWAY,

2001) sendo observada uma queda acentuada e progressiva na incidência de novos casos de AIDS e de diversas doenças definidoras de AIDS (IVES *et al.*, 2001).

Desde sua identificação em 1981 a epidemia pelo HIV representa um fenômeno global e dinâmico cuja ocorrência depende de características comportamentais individuais e coletivas, sendo também influenciada por características socioeconômicas da população (BRITO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2000), desta forma a epidemia se apresenta como um mosaico de subepidemias regionais com áreas ou zonas de alta transmissão decorrentes da heterogeneidade geográfica e social (TANSER *et al.*, 2014).

Atualmente, existem mais de 37,7 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA), destes 27,5 milhões estão em tratamento com esquema HAART. No ano de 2020 foram registrados 680.000 mortes com 1,5 milhões de casos novos. Em 2019 foi observado uma redução global de 23% nas novas infecções, porém em regiões como Europa Oriental, Ásia Central, Oriente Médio, Norte da África e América Latina um aumento dos casos novos está sendo identificado (UNAIDS, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Na América Latina estima-se que existam 2.1 milhões de PVHA, com 31 mil casos de óbitos por AIDS, afetando desproporcionalmente grupos populacionais chaves como Homens que fazem sexo com Homens e profissionais do sexo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil, em 2019, 41.900 casos novos de HIV foram diagnosticados e no mesmo período foram notificados 37.309 casos de AIDS. As regiões Sudeste e Sul apresentam as maiores incidências contabilizando respectivamente 44% e 20% dos casos notificados respectivamente. O sexo masculino predomina com 69,4% dos pacientes e 21% dos casos informaram possuir 2º grau completo (BRASIL, 2020).

### **1.1.2. Estrutura do HIV**

Pertencente ao gênero Lentivirus e a família *Retroviridae*, o HIV contém RNA em seu material genético e sua replicação ocorre através da transcrição de um DNA intermediário por uma enzima chamada Transcriptase Reversa (VAISHNAV; WONG-STAAAL, 1991).

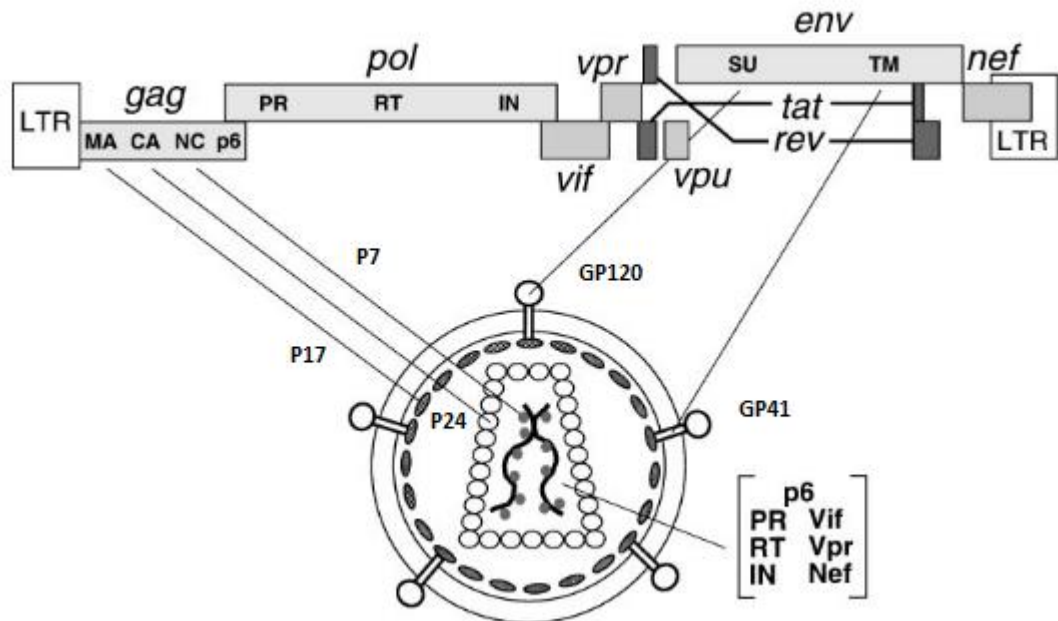
O genoma de RNA é composto por 9 genes, sendo que 3 deles são principais, GAG, POL e ENV que codificam proteínas estruturais comuns a todos os retrovírus (FRANKEL; YOUNG, 1998).

O gene GAG codifica as proteínas da membrana externa p17 (MA), do capsídeo p24 (CA), o nucleocapsídeo p7 (NC), o POL codifica as enzimas protease p12 (PR), transcriptase

reversa p66 (TR) e integrase p32 (IN) e a partir do ENV derivam o gp120 (proteína de superfície, SU) e gp41 (proteína transmembrana, TM).

Além das proteínas estruturais, o genoma do HIV possui outros 6 genes Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr, e Vpu que possuem papel na patogênese e replicação viral (SEITZ, 2016).

Figura 1 - Genoma do HIV-1 e sua relação com as principais proteínas



Fonte: Adaptado de FRANKEL e YOUNG (1998).

O estudo da filogenética dos lentivirus permitiu a classificação do HIV em dois tipos diferentes, o HIV-1 e o HIV-2, que apesar das semelhanças genômicas possuem variabilidade genética de até 25% entre as cepas (REEVES; DOMS, 2002).

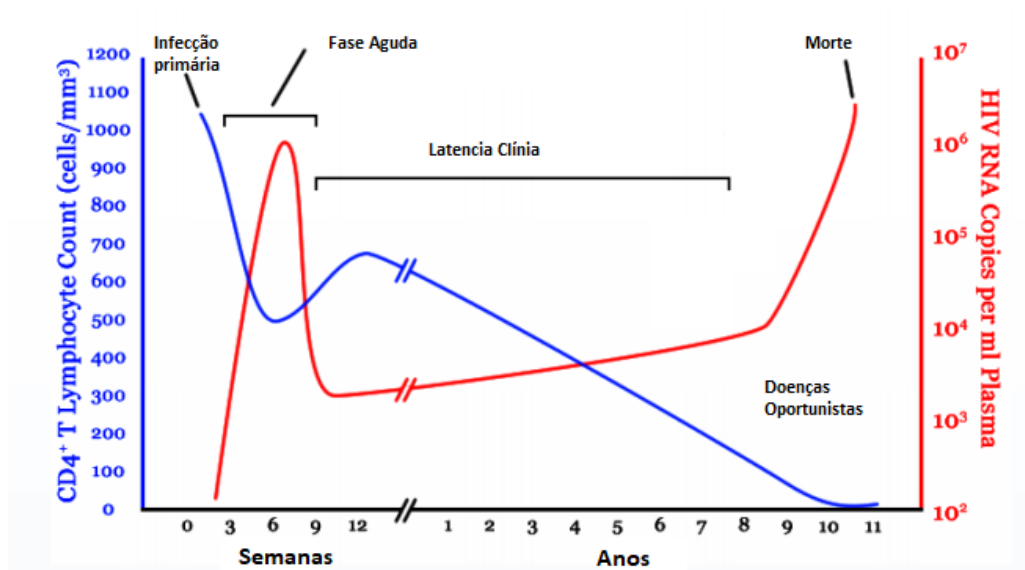
O HIV e suas linhagens são originários de múltiplas transmissões zoonóticas do vírus da imunodeficiência símia (SIV). As linhagens do Virus HIV-1 podem ser divididas em 4 grupos M, N, O e o P, sendo que o grupo M, principal responsável pela pandemia, ainda se subdivide em 9 subgrupos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) além de 68 formas recombinantes que são formados por híbridos resultantes da combinação do material genético de diferentes subtipos (HEMELAAR, 2012; LOS ALAMOS, 2020). No Brasil, em todas as regiões, predomina o HIV-1 subgrupo B, exceto na região Sul onde prevalece o subgrupo C (REIS *et al.*, 2019). Esta variabilidade genética se dá principalmente por erros da transcriptase reversa durante a replicação viral (BEBENEK *et al.*, 1989) e representa potenciais desafios para o diagnóstico, tratamento e elaboração de vacinas (OSMANOV *et al.*, 2002).

O HIV-2, restrito predominantemente na África ocidental, mas também presente na Europa e América (VISSEAUX *et al.*, 2016), tem como característica uma fase assintomática mais longa e uma evolução mais lenta (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011), é dividido em grupos (A até H) e somente 1 recombinante foi identificado em 2010 (HEMELAAR, 2012; IBE *et al.*, 2010; LOS ALAMOS, 2020).

### 1.1.3. História Natural e Imunopatogênese

A infecção causada pelo HIV-1 e HIV-2 cursa com um amplo espectro de apresentações clínicas, iniciando com uma fase aguda (BARRÉ-SINOUSI, 1996; PEDERSEN *et al.*, 1989) que se caracteriza por um conjunto de sinais e sintomas dentre eles febre, fadiga, rash maculopapular, cefaleia, faringite, linfadenopatia, com duração normalmente inferior a 14 dias (KAHN; WALKER, 1998). Posteriormente, acontece uma fase assintomática com duração variável, período em que a replicação viral resulta em destruição lenta e gradativa dos linfócitos T CD4+ (DEEKS; WALKER, 2007; FAUCI *et al.*, 1984). Quando o número de linfócitos T CD4++ atinge índices abaixo de 200 cel/mm<sup>3</sup> o indivíduo infectado desenvolve a AIDS (KARON *et al.*, 1992), entidade clínica caracterizada por uma profunda imunodeficiência em que os indivíduos passam a desenvolver complicações infecciosas e oncológicas (DEEKS, S.G. *et al.*, 2015). Esta história natural da infecção pelo HIV está representada na figura 2.

Figura 2 - História natural do HIV

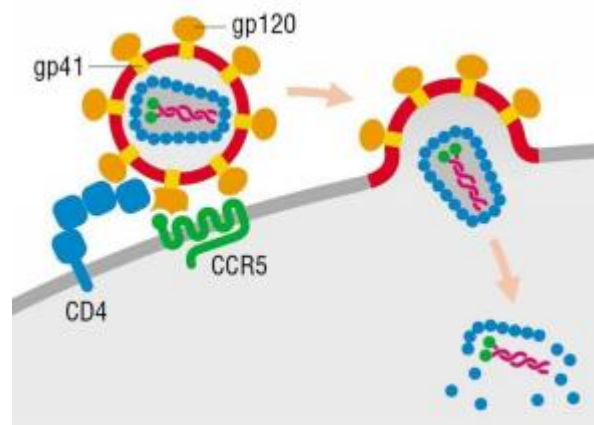


Fonte: Adaptado de MELHUIISH e LEWTHWAITE (2018)

A primeira linha de defesa do ser humano para a infecção pelo HIV são as células dendríticas (DC) (MCMICHAEL *et al.*, 2010). As DCs são células constituintes do sistema imune inato com a função de apresentar antígenos e ativar o sistema imune adaptativo e as células Natural Killer (NK) (FERLAZZO *et al.*, 2004; LIU, 2001).

A ligação do HIV nas DC, bem como nas outras células do sistema imune, ocorre através da ligação da proteína de superfície gp120 com os receptores CD4, mas esta ligação requer a presença dos co-receptores CC-chemokine receptor 5 (CCR5) ou CX-chemokine receptor 4 (CXCR4) (KAHN; WALKER, 1998; WU; KEWALRAMANI, 2006). A ligação do vírus com os receptores de membrana está representada na figura 3.

Figura 3 - Entrada no vírus na célula



Entrada do vírus na célula. A glicoproteína gp120 se liga ao receptor CD4 e o correceptor CCR5 ou CXCR4. Fonte: Adaptado de SANDERS (2012).

A ligação do vírus pela proteína gp120 nas DCs permite a internalização do vírus intacto em compartimentos endossômicos, permitindo a sua transferência aos linfócitos T CD4+ no interior dos linfonodos, o que promove a disseminação da infecção (ALTFELD *et al.*, 2011). A maioria das cepas naturais do HIV utilizam o co-receptor primário o CCR5, desta forma os Linfócitos T CD4+ portadoras deste marcador são alvos específicos do vírus (PICKER, 2006).

As DCs, ativadas por uma infecção viral, produzem Interferon tipo 1 que é um potente modulador das células NK (ROMAGNANI *et al.*, 2005) além de citocinas tais como a interleucina-12 (IL-12), IL-15, IL-18. A IL-12 é importante para a resposta das células T Helper 1 (Th1) que promovem a ação de Linfócitos T Citotóxicos responsáveis pelo clearance de células infectadas, e as IL-12 e IL-15 ativam as células NK (ALTFELD *et al.*, 2011; LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2001).

O HIV tem tropismo pelos linfócitos T CD4+ e tem ação citopática em suas células alvo (ROSENBERG; FAUCI, 1989) sendo este fato associado a formação de sincícios (células gigantes multinucleadas) e à destruição imunomediada de células infectadas. A incapacidade do sistema imunológico em regenerar o pool de linfócitos T CD4+ resulta na depleção de linfócitos T CD4+, característica principal da infecção pelo HIV (COFFIN *et al.*, 1997).

Além da ação sobre os Linfócitos T CD4+ é observado também anormalidade na função de outros componentes do sistema imune como os monócitos e macrófagos, que apresentam entre outras anormalidades a redução na quimiotaxia e na proliferação de células T dependentes de monócitos (COFFIN, J. M. *et al.*, 1997; ROSENBERG; FAUCI, 1989).

Em relação aos Linfócitos T CD8+, observa-se uma queda dos níveis desta linhagem celular na fase aguda da doença, seguida de um aumento para níveis mais elevados que o normal na fase clinicamente latente da doença. Uma das hipóteses para este aumento seria uma tentativa do sistema imunológico em manter um número normal de linfócitos a medida que o número de Linfócitos T CD4+ declina.

Nas fases finais da doença, quando os níveis de linfócitos T CD4+ estão muito baixos e ocorrem as doenças oportunistas, observa-se também um declínio significativo dos níveis de linfócitos T CD8+ (COFFIN, J. M. *et al.*, 1997).

#### **1.1.4. Terapia antirretroviral**

A conferência de Berlin de 1993 é um marco para o desenvolvimento das terapias antirretrovirais, já que na época havia apenas três drogas disponíveis, Zidovudina (AZT), Didanosina (ddI) e Zalcitabina (ddC) todas atuavam a nível da transcriptase reversa. (COHEN, 2002) A partir de 1996 a estratégia de combinar estas drogas com medicamentos de outras classes que estavam sendo liberadas (os inibidores de protease) melhorou radicalmente a eficácia da terapia (COOPER; MERIGAN, 1996). Esta combinação de drogas de classes diferentes passou a ser conhecida como HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) (EGGLETON; NAGALLI, 2021).

Atualmente as classes de antirretrovirais disponíveis são os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeos (ITRN) e inibidores da Transcriptase reversa não análogos nucleosídeos (ITNN) que impedem a molécula de RNA do HIV ser convertida para DNA (KOHLSTAEDT *et al.*, 1992); os inibidores de Protease (IP) que impedem a produção de proteínas e enzimas do vírus através da inibição da protease (SHAFER *et al.*, 2001); os Inibidores de integrase (INI) que impedem a integração do DNA viral ao DNA

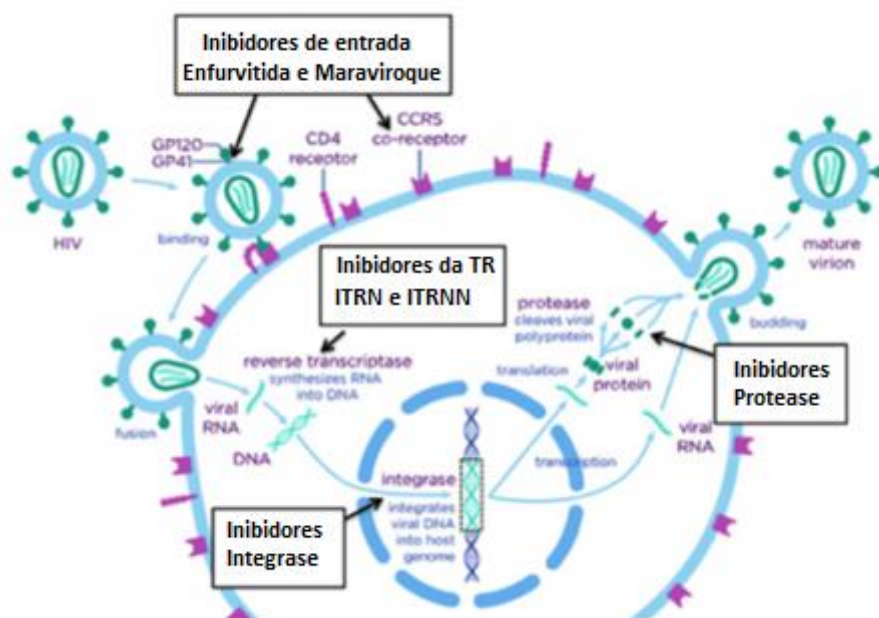


humano (ESPESETH *et al.*, 2000); e os inibidores de entrada (inibidores de fusão – IF e os antagonistas de CCR5) que impede a entrada do vírion na célula humana devido ao mimetismo da proteína GP41 por um peptídeo sintético (inibidor de fusão - Enfuvirtida) ou por antagonizar o receptor CCR5 (Maraviroque) (ARTS; HAZUDA, 2012; WILD *et al.*, 1993). Os sítios de atuação dos antirretrovirais estão ilustrados na figura 4.

Segundo o Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos, de 2018, do Ministério da Saúde, o início da terapia antirretroviral deve ocorrer independente do estágio clínico e imunológico de paciente e o mais precoce possível. Devendo sempre conter 3 antirretrovirais, sendo preferencialmente indicados 2 ITRNN e 1 INI (BRASIL, 2018).

O advento da HAART causou uma mudança na história natural da doença, reduzindo drasticamente a morbimortalidade da infecção pelo HIV (PALELLA *et al.*, 1998) e com os esquemas antivirais atuais é observado uma resposta terapêutica altamente eficaz, com aproximadamente 80% dos pacientes apresentando carga viral indetectável após 1 ano de TARV (BRASIL, 2018).

Figura 4 - Sítios de ação dos antirretrovirais



Inibidores de entrada (enfurvida e maravioque) impedem a entrada do virion na célula; inibidores da Transcriptase reversa (ITRN/ITRNN) impedem a síntese do DNA; inibidores de integrase impedem a integração do DNA viral com o DNA celular e os Inibidores de Integrase impedem a síntese de enzimas e proteínas virais. Fonte: Adaptado de FAROOQ *et al.* (2016).

Dessa forma, garantindo o acesso à terapia antirretroviral (TARV), a expectativa de vida de uma PVHA se assemelha muito à da população em geral, tornando a abordagem clínica da infecção pelo HIV semelhante a de uma doença crônica. Este aumento na expectativa de vida entre as PVHA permitiu a observação da incidência de eventos não relacionados ao HIV (HASSE *et al.*, 2011), dentre eles a infecção pelos vírus dengue.

## **1.2. Infecção pelos vírus dengue**

### **1.2.1. Aspectos históricos e epidemiológicos da infecção pelo vírus dengue**

A dengue é uma doença viral transmitida ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, presentes nas áreas urbanizadas tropicais e subtropicais (COX *et al.*, 2007). É a doença viral transmitida por vetores mais comum nos seres humanos, estando entre os vírus emergentes mais importantes, sendo uma ameaça para um terço da população mundial (HOLMES; TWIDDY, 2003).

Os primeiros relatos uma doença semelhante a dengue, referida como “veneno da água” são encontrados em uma enciclopédia chinesa na dinastia Chin (265 a 420 d.C.) e posteriormente epidemias semelhantes a dengue foram relatadas no Cairo, Filadélfia e Jakarta no ano de 1779 (GUBLER, 1998).

O vírus dengue-1 (DENV-1) foi isolado pela primeira vez somente em 1943, no Japão por Sussumo Hotta a partir do sangue de indivíduos acometidos por um surto de dengue que ocorreu entre 1942 e 1945 (HOTTA, 1952), posteriormente entre os anos 1953 e 1954, nas Filipinas, foram isolados os vírus DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (MESSINA *et al.*, 2014).

As principais regiões onde a dengue é endêmica são a África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental e Sudeste Asiático, principalmente devido as condições como temperatura, precipitações e urbanização (BHATT *et al.*, 2013). Esta distribuição geográfica está aumentando devido a fatores como a globalização, o aumento do número de viagens internacionais, o crescimento populacional, a urbanização nas regiões tropicais e consequente expansão e distribuição do vetor devido ao aquecimento global (*Aedes aegypti*) (MESSINA *et al.*, 2014).

Considerando esta extensa distribuição geográfica, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivam em países onde a dengue é endêmica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009) e estudos demonstram que o número de infecções por ano pode chegar a 390 milhões (BHATT *et al.*, 2013).

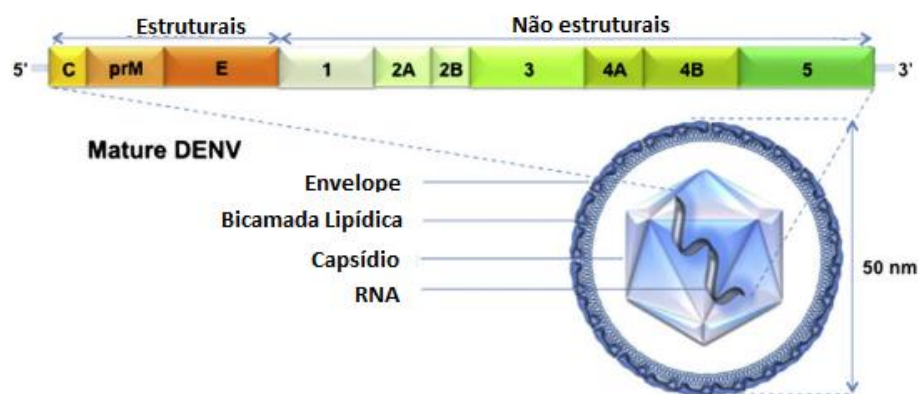
Segundo Organização Panamericana de Saúde (PAHO), em 2020 ocorreram 2.251.890 casos de Dengue nas Américas, destes 1.418.296 ocorreram no Brasil (PAHO/NA AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2021). Neste mesmo período foram registrados 492 óbitos por Dengue no Brasil (BRASIL, 2021).

### 1.1.1. A estrutura do Vírus Dengue

A dengue é uma doença infecciosa, causada pelos vírus dengue (DENV), arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (GUBLER; CLARK, 1995).

O vírion da dengue possui como material genético uma fita simples de RNA envolto por um nucleocapsídeo e envelope constituído por uma bicamada lipídica embutida em glicoproteína. O RNA genômico codifica 10 proteínas virais, sendo três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS) - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (HERRERO *et al.*, 2013).

Figura 5 - Genoma do vírus Dengue e suas principais proteínas.



Fonte: Adaptado de HERRERO *et al.* (2013).

As três proteínas estruturais formam o Capsídeo (C), o Envelope (E) e a Membrana (prM), as demais proteínas não estruturais (NS) desempenham papéis na replicação e montagem viral (GUZMAN *et al.*, 2010). Os quatro sorotipos virais cursam com apresentações clínicas semelhantes, porém existem publicações que indicam que o DENV-1 apresenta uma maior viremia em relação aos demais, e que o DENV-2 está relacionado a apresentações mais graves e complicações hemorrágicas (HERRERO *et al.*, 2013).

### 1.1.2. Imunopatogenese e história natural

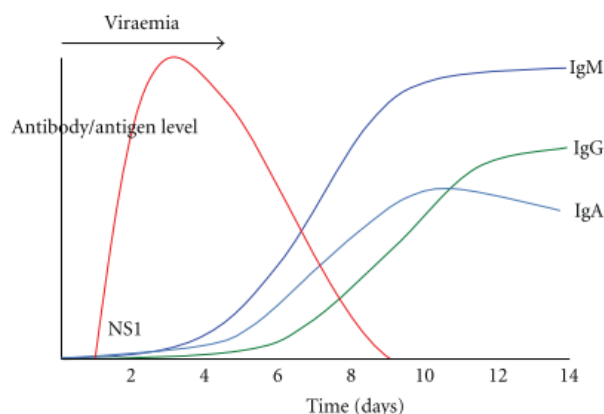
Após a passagem do vírus através da pele pela picada do mosquito o DENV invade e começa sua replicação nas DCs e macrófagos, então o DENV migra para os linfonodos regionais onde ocorre uma primeira replicação seguida pela disseminação pela corrente sanguínea (URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2010). A proteína E do envelope viral é a principal responsável pela ligação do vírus nas células hospedeiras (Células Dendríticas, Monócitos e Macrófagos, Linfócitos T e B, hepatócitos, basófilos) e é seguida pela internalização da partícula viral, liberação do nucleocapsídeo no citoplasma e finalmente, pela replicação viral e produção de novas partículas virais (ANDERSON, 2003).

A patogênese da dengue pode ser explicada pela liberação de citocinas pelos monócitos e macrófagos infectados, sendo observadas uma redução da contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+, além de aumento nas concentrações de TNF-alfa, IFN-gama, Interleucina10 (AZEREDO *et al.*, 2001)

Uma das marcas da infecção pelo DENV é a queda de plaquetas, causada tanto pela supressão medular quanto pela sua destruição, associada a anormalidade na função plaquetária (HOTTZ *et al.*, 2011).

A imunoglobulina primeiramente detectada é a imunoglobulina M (IgM), que surge entre o 3º e 5º dia de doença e atinge o seu pico em aproximadamente 2 semanas e permanece presente por pelo menos 3 meses (GUZMAN *et al.*, 2010). A próxima imunoglobulina detectada é a imunoglobulina A (IgA), surge entre o 4º e 6º dia (TALARMIN *et al.*, 1998) e a imunoglobulina G é detectável somente após a primeira semana da doença, permanecendo detectável indefinidamente, sendo um marcador de infecção prévia (GUZMAN *et al.*, 2010).

Figura 6 - Dinâmica das imunoglobulinas anti-Dengue.



Fonte: Adaptado de BLACKSELL (2012).

Clinicamente a dengue pode apresentar-se nas formas assintomática ou sintomática, quando sintomática ela se apresenta com uma grande variedade de apresentações (GUBLER; CLARK, 1995).

Após um curto período de incubação de aproximadamente 4 a 10 dias, segue-se três fases (febril, crítica e recuperação). A fase febril tem duração de aproximadamente 7 dias e é caracterizada por febre, eritema generalizado, mialgia, artralgia, dor retroocular e cefaleia.

A partir do 3º dia de doença, o paciente entra na fase crítica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), onde podem ocorrer complicações decorrentes do aumento da permeabilidade vascular que induz o extravasamento de plasma, resultando em hemoconcentração e choque, além de queda acentuada de plaquetas, podendo o paciente apresentar as formas graves da doença, como miocardites, meningoencefalites e hepatites, sendo a mais estudada, a Febre Hemorrágica da Dengue (GUBLER, 1998). Posteriormente, caso as complicações não levem o paciente ao óbito, há a fase de recuperação.

Os quatro sorotipos do DENV podem causar formas graves da doença, inclusive a febre hemorrágica da dengue (VAUGHN *et al.*, 1997), durante a primeira infecção, porém é mais comum nos casos de infecções secundárias (quando um indivíduo já infectado por um sorotipo é exposto a um sorotipo diferente) devido a uma exacerbação da resposta humoral e de células T a proteínas virais antigênicamente com alto grau de semelhança (células menos eficazes na eliminação de células infectadas), além de altas concentrações de interleucina-2, interferon-gama e fator necrose tumoral circulantes no sangue (HALSTEAD, 2007). Vale ressaltar que a infecção por um sorotipo viral confere resistência ao longo da vida e uma resistência cruzada por um período variável, podendo chegar a 9 meses (SNOW *et al.*, 2014).

O diagnóstico da dengue é feito com base em dados clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais. Os métodos laboratoriais para confirmação da infecção por dengue são os testes imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-dengue (IgM e IgG), do antígeno NS1, além do isolamento viral e da transcrição reversa seguida da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) (GUZMAN *et al.*, 2010).

### **1.1.3. Tratamento da infecção pelo DENV**

O tratamento dos pacientes com dengue está baseado na reposição volêmica, no uso de sintomáticos e na rápida identificação de sinais de gravidade, conhecidos como sinais de alerta, que são dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, hipotensão postural,

hepatomegalia dolorosa, sangramento de mucosa ou hemorragias importantes, sonolência e/ou irritabilidade, diminuição da diurese, diminuição repentina da temperatura corpórea ou hipotermia, aumento repentino do hematócrito, queda abrupta de plaquetas, desconforto respiratório (BRASIL, 2013).

Apesar de ainda não existir tratamento específico para a infecção pelo DENV, a descoberta de inibidores de proteases que inibem a replicação do DENV mostram-se promissoras para o desenvolvimento de futuros medicamentos para esta doença (RAUT *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015).

## **1.2. A coinfeção HIV e Dengue**

O avanço e o acesso a terapia HAART resultou na compreensão de que a infecção pelo HIV se tornou uma doença crônica (DEEKS *et al.*, 2013), pessoas vivendo com AIDS já apresentam uma expectativa de vida semelhante àquela dos pacientes soronegativos (NAKAGAWA *et al.*, 2013) e isto é evidenciado pelos 37,7 milhões de pessoas vivendo com AIDS no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), porém mesmo um paciente em tratamento efetivo e com carga viral suprimida ainda permanece doente (DEEKS *et al.*, 2013) e muitas patologias evidenciam apresentações e desfechos clínicos diferentes quando acometidas em PVHA (HIRSCHHORN *et al.*, 2012)

A associação entre a infecção pelo HIV e doenças endêmicas está sendo frequentemente descrita, principalmente em regiões de clima tropical (MORGADO *et al.*, 2000), e em muitos casos, esta coinfeção causa a modificação na história natural destas doenças tropicais, frequentemente com o agravamento das formas clínicas (MENDES *et al.*, 2006), porém ainda há poucos e controversos dados na literatura sobre a coinfeção pelo HIV e o vírus dengue, sua apresentação clínica e desfechos (SIONG *et al.*, 2008).

Foi observado que durante a infecção aguda pelos vírus dengue ocorre a redução da carga viral do HIV (WATT *et al.*, 2003) e este fato pode ser explicado pela expressão da proteína NS5 no linfócito T CD4+, promovendo “downregulation” da proteína de membrana CXCR4 e inibindo a replicação viral (MCLINDEN *et al.*, 2008).

Na coinfeção também é observada uma redução na relação CD4/CD8, causado por um aumento da porcentagem de CD8, porém as repercussões clínicas desta variação não estão claras. Também foi demonstrado uma queda significativa no número de linfócitos justificada por uma suprarregulação de proteínas com funções apoptóticas (TORRENTES-CARVALHO *et al.*, 2020). Um aumento da expressão da proteína CCR5 em linfócitos T CD4+ e do CD107a

(um marcador funcional de atividade de células NK) em ambos os tipos de linfócitos T também foi observado (TORRENTES-CARVALHO *et al.*, 2016).

A queda de plaquetas, característica da infecção pelo DENV (HOTTZ *et al.*, 2011), também é observada em pacientes infectados pelo HIV com carga viral detectável (O'BRYAN *et al.*, 2015). Em ambas as patologias as plaquetas tem participação na amplificação da resposta inflamatória nos indivíduos infectados (HOTTZ *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2014), porém na coinfeção dengue/HIV foi observado que os níveis plasmáticos das quimiocinas derivadas de plaquetas (RANTES/CCL5 e PF4/CXL4) estavam reduzidos e este fato poderia estar relacionado a uma apresentação clínica mais branda da infecção pelo DENV (HOTTZ *et al.*, 2019).

Também foi observado um incremento das quimiocinas IP-10 e IL-8 (TORRENTES-CARVALHO *et al.*, 2016) e uma queda nas concentrações das citocinas pró inflamatórias IFN-gama e IL-1Beta nos pacientes coinfectados (HOTTZ *et al.*, 2019)

No caso da apresentação clínica na coinfeção pelos DENV os estudos ainda são controversos, ora afirmando que ocorre agravamento dos sintomas (PANG *et al.*, 2015), devido a observação do aumento da frequência cardíaca, do tempo de hospitalização, ora indicando uma redução das apresentações graves (SIONG *et al.*, 2008; TORRENTES-CARVALHO *et al.*, 2016), e ora indicando que não há alteração da história natural da doença (JOOB; WIWANITKIT, 2014).

**Justificativa**

---



## 2. JUSTIFICATIVA

As infecções pelos vírus dengue e pelo HIV resultam em duas doenças de ampla distribuição mundial com grande importância para a saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Estes dois agravos merecem especial atenção no Brasil pelas suas características ambientais e socioeconômicas que favorecem as altas incidências e prevalências destas infecções (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Com amplo acesso a Terapia Antirretroviral e a consequente mudança na história natural da infecção pelo HIV, que atualmente pode ser considerada uma doença crônica, foi possível observar um aumento da incidência de eventos não relacionados ao HIV nos pacientes soropositivos (DEEKS *et al.*, 2013), dentre eles a coinfeção pelos vírus dengue (SIONG *et al.*, 2008).

Sendo a dengue uma doença de alta incidência e com potencial para letalidade, e considerando a escassa literatura que versa sobre a coinfeção entre HIV e dengue (TORRENTES-CARVALHO *et al.*, 2016), fez-se necessário um estudo que avaliasse os aspectos clínicos da infecção pelo DENV em pacientes soropositivos avaliando suas características clínicas e desfecho, além de avaliar o comportamento das imunoglobulinas anti-dengue IgG e IgM, exames importantes para o diagnóstico sorológico desta patologia nos PVHA.

# Objetivos

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

O objetivo deste estudo, realizado na cidade de Birigui-SP, foi avaliar as características clínico-epidemiológicas e sorológicas, de pacientes coinfectados com o HIV e o vírus dengue, analisando a apresentação e desfecho da infecção por esta arbovirose nestes pacientes. Além disso investigar a presença dos anticorpos (IgG e IgM) específicos para a dengue nesta população.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar os pacientes do estudo que apresentarem síndrome febril aguda e sintomas de dengue e coletar informações sobre a apresentação clínica e o desfecho da doença.
- Realizar um inquérito sorológico para Dengue em amostra de sangue de todos os pacientes do estudo no momento da avaliação inicial.
- Avaliar presença e duração dos anticorpos IgM e IgG anti Dengue naqueles pacientes que apresentarem sintomas de Dengue durante o estudo.

#### **3.3. Objetivos Secundários**

- Fazer um levantamento epidemiológico de todos os pacientes infectados pelo HIV que são seguidos no Ambulatório de DST/AIDS de Birigui, que aceitaram participar do estudo e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (TCLE).

## Materiais e Métodos

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Desenho do estudo e considerações éticas**

O presente estudo intitulado “Avaliação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e sorológicos da dengue em pacientes infectados pelo HIV: um estudo coorte prospectivo na cidade de Birigui, estado de São Paulo.” trata-se de um estudo coorte prospectivo com duração de 4 anos, que avaliou aspectos clínicos e sorológicos de pacientes soropositivos que eventualmente foram infectados pelo DENV.

Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o número do parecer 1.897.133. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) cujo teor também foi aprovado no referido parecer.

### **4.2. Pacientes**

A população do presente estudo foi composta por todos os pacientes infectados pelo HIV, em seguimento no Ambulatório de DST/AIDS do Serviço de Atendimento Especializado (SAE) do Município de Birigui-SP, no período de Julho de 2015 a Junho de 2019, que aceitaram fazer parte do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### **4.2.1. Critérios de inclusão**

- Diagnóstico confirmado pelo HIV
- Ter mais de 18 anos e estar de acordo com o TCLE

#### **4.2.2. Critérios de exclusão**

- Diagnóstico pelo HIV não confirmado
- Ter menos de 18 anos ou não concordar com o TCLE

### **4.3. Caracterização epidemiológica dos pacientes**

A caracterização epidemiológica da amostra ocorreu no momento da inclusão do paciente no estudo, a partir de entrevista médica e mediante revisão dos prontuários médicos. Os dados coletados foram:

- Idade,
- Sexo,
- Quantificação dos Linfócitos T CD4+,
- Quantificação da Carga Viral do HIV,
- Uso de terapia antirretroviral, e eventuais trocas de esquemas terapêuticos e
- Coinfecção pelo vírus da Hepatite B e/ou C.

#### **4.4. Avaliação clínica**

A periodicidade das consultas de acompanhamento no Ambulatório em pacientes com Carga Viral indetectável ou menor que 100 cópias era semestral, porém após a inclusão no estudo passou a ser trimestral (sendo essa a única intervenção deste estudo na população avaliada). Para os casos em que a contagem de carga viral estava maior que 100 cópias as consultas ambulatoriais passavam a ser realizadas mensalmente.

Todos os pacientes foram submetidos a coleta de exames para análise da quantificação de linfócitos T CD4+ e Carga Viral do HIV semestralmente, porém a partir de 2016 houve uma mudança na orientação do Ministério da Saúde sobre o seguimento destes pacientes e a quantificação de linfócitos T CD4+ deixou de ser coletada periodicamente em pacientes que apresentavam contagem de Linfócitos T CD4+ > 350 e carga viral > 100 cópias (BRASIL, Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde., 2018).

Na eventual suspeita de infecção aguda da infecção pelo vírus dengue, os pacientes eram avaliados em consulta médica e dados sobre a apresentação clínica da doença eram levantados avaliando também o desfecho com consultas subsequentes semanais. Os pacientes também eram orientados a procurar o ambulatório do SAE caso fosse diagnosticado como dengue (suspeita ou confirmada) em outro serviço.

Os dados avaliados foram:

- Caracterização e intensidade dos sintomas,
- Tempo de início e duração dos sintomas e
- Desfecho da doença.

As fichas de notificação encaminhadas ao Departamento de Vigilância Epidemiológica do Município também eram uma fonte para a identificação de casos suspeitos ou confirmados na eventualidade de algum paciente incluído no estudo fosse notificado em outro serviço sem, no entanto, procurar o Ambulatório do SAE.

#### **4.4.1. Quantificação da Carga Viral do HIV**

As amostras para quantificação de carga viral foram coletadas na ocasião do diagnóstico da infecção pelo HIV e após 8 semanas da introdução ou troca de TARV. Em pacientes com Carga Viral indetectável a coleta era semestral, conforme orientação do Protocolo de Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos.

As coletas foram realizadas no Ambulatório de DST/AIDS e encaminhadas para execução no laboratório de referência do Município (Laboratório Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto).

#### **4.4.2. Quantificação dos Linfócitos T CD4+**

As amostras para Quantificação de Linfócitos T CD4+ foram coletadas na ocasião do diagnóstico da infecção pelo HIV e a cada 6 meses, em todos os pacientes com carga viral detectável ou com CD4 < 350 cópias. Pacientes aderentes ao tratamento e com quantificação de Linfócitos T CD4+ superior a 350 cópias, a rotina de coleta deste exame era interrompida conforme orientação do Protocolo de Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos.

As coletas eram realizadas no Ambulatório de DST/AIDS e encaminhadas para execução no laboratório de referência do Município (Laboratório Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto).

#### **4.5. Avaliação sorológica dos pacientes**

Foram coletadas amostras de sangue de todos os pacientes no momento da inclusão no estudo, com o intuito de realizar um inquérito sorológico, identificando a presença de anticorpos para a Arbovirose estudada.

O sangue coletado foi submetido a uma centrifugação de 2600 rpm por 6 minutos para obtenção do soro, que foi alíquotado e mantido a -70°C até o momento do uso. Em todas as amostras foi realizada o teste ELISA de Captura para a determinação da presença de Anticorpos IgG e IgM anti-dengue.

Foi programada a coleta de uma segunda amostra naqueles casos em que os pacientes apresentassem síndrome febril ou diagnóstico de dengue, sendo proposto a realização da determinação da presença de anticorpos IgM, pois se positivo, indica estarmos frente a uma fase aguda da doença. Nestes casos seriam coletadas, amostras mensais para a determinação da duração dos anticorpos IgM e IgG contra Dengue.

Para os pacientes que não apresentaram o diagnóstico de Dengue no decorrer do período estudado, uma segunda amostra foi coletada ao final do estudo (junho de 2019), nos quais também foram realizados o teste ELISA para a determinação da presença dos anticorpos IgG e IgM anti-dengue. O objetivo desta segunda análise é encontrar as formas assintomáticas da doença.

#### **4.5.1 ELISA de captura para detecção de IgM anti-dengue**

O ELISA indireto para detecção de IgM anti-dengue (PanBio, Austrália) foi realizado para se determinar a presença de níveis elevados de IgM anti-dengue nas amostras de sangue dos pacientes.

Os exames foram realizados no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) e para a realização foram observadas as especificações do fornecedor, descritas abaixo.

Foi utilizada uma placa de teste comercializada pela PanBio (Austrália). Os soros, o controle positivo, o negativo e o calibrador foram diluídos 1/100 em diluente de soro. O antígeno foi diluído 1/2500 e incubado com um volume igual de anticorpo monoclonal (MAb) secundário marcado com peroxidase por cerca de 60 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados então 100µL de soro diluído na placa e após 60 minutos de incubação a 37°C, a placa foi lavada e a solução de antígenos com os anticorpos secundários foi adicionada e incubada por 1 hora a 37°C. Após incubação e lavagem, foi adicionado o substrato TMB (tetrametilbenzidina) que evidencia os soros positivos pelo desenvolvimento de uma cor azul resultante da ação da peroxidase no substrato. A reação foi parada adicionando-se 100 µL de solução de parada (Ácido fosfórico 1M) e analisada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450nm e filtro de referência 620nm. Todo soro com um valor índice maior que 1,1 foi considerado positivo, entre 0,9 e 1,1 indeterminado e menores que 0,9 negativo.

#### **4.5.2. ELISA indireto para detecção de IgG anti-dengue**



O ELISA indireto para detecção de IgG anti-dengue (PanBio, Austrália) foi realizado para se determinar a presença de níveis elevados de IgG anti-dengue nas amostras de sangue dos pacientes.

Os exames foram realizados no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) e para a realização dos mesmos foram observadas as especificações do fornecedor, descritas abaixo.

Foi utilizada uma placa de teste comercializada pela PanBio (Austrália). Os soros, o controle positivo, o negativo e o calibrador foram diluídos 1/100 em diluente de soro. O antígeno foi diluído 1/2500 e incubado com um volume igual de anticorpo monoclonal (MAb) secundário marcado com peroxidase por cerca de 60 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados então 100µL de soro diluído na placa e após 60 minutos de incubação a 37°C, a placa foi lavada e a solução de antígenos com os anticorpos secundários foi adicionada e incubada por 1 hora a 37°C. Após incubação e lavagem, foi adicionado o substrato TMB (tetrametilbenzidina) que evidencia os soros positivos pelo desenvolvimento de uma cor azul resultante da ação da peroxidase no substrato. A reação foi parada adicionando-se 100 µL de solução de parada (Ácido fosfórico 1M) e analisada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450nm e filtro de referência 620nm. Todo soro com um valor índice maior que 2,2 foi considerado positivo, entre 1,8 e 2,2 indeterminado e menores que 1,8 negativo.

#### **4.6. Análise estatística**

Inicialmente foi realizado uma análise estatística descritiva das variáveis do estudo, esta análise tem como objetivo sintetizar valores de mesma natureza com o intuito de conhecer a população estudada. Posteriormente foram realizadas análises em busca de associação entre as variáveis relacionadas a infecção pelo HIV em relação a presença e comportamento dos anticorpos anti-dengue.

Para a verificação de associação entre variáveis de interesse foi proposto o teste de Qui-Quadrado e o teste exato de Fisher estas análises foram feitas com o auxílio do software JAMOVÍ®.

O nível de significância utilizado nos testes foi  $\leq 0,05$ .

# Resultados

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. O Local de estudo

O Município de Birigui está localizado no noroeste paulista e possui uma população estimada de 124.883 habitantes, com uma densidade demográfica de 204,79 Hab/Km<sup>2</sup>. (IBGE, 2021) Durante o ano de 2019 passou pela maior epidemia de Dengue dos últimos 10 anos com 10593 casos notificados, seguida pelo ano de 2016 com 8114 casos notificados.

**Tabela 1** – Número de notificações, casos confirmados, casos descartados e óbitos por Dengue confirmados no município Birigui dos anos de 2015 a 2019.

<b>Eventos relacionados a infecção pelo vírus no município de Birigui entre 2015 e 2019</b>					
	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
<b>Notificações</b>	7986	8114	663	644	10593
<b>Confirmados</b>	4574	4770	85	32	7882
<b>Descartados</b>	3207	3311	578	612	2711
<b>Inconclusivos</b>	05	33	0	0	0
<b>Óbitos</b>	7	2	0	0	8

Fonte: SINAN (2021) – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

### 5.2. A População do estudo

Foram convidados a participar do estudo todos os 256 pacientes infectados pelo HIV que estavam em seguimento no SAE/Birigui, destes 189 pacientes aceitaram fazer parte do estudo e cumpriam os critérios de inclusão, no período do seguimento 28 pacientes foram excluídos do estudo, restando 161 pacientes que foram acompanhados pelo período de 4 anos.

Os motivos para a exclusão dos 28 pacientes foram:

- Transferência ao sistema prisional: 2 pacientes,
- Transferência a outro serviço por mudança de município de residência: 15 pacientes,
- Abandono de seguimento clínico: 2 pacientes (estes ou se negaram a continuar o tratamento ou não foram encontrados pela equipe de assistência social do SAE) e
- Óbito por causas não relacionadas a arboviroses: 9 pacientes.

Na investigação da causa de óbito destes pacientes e análise das Declarações de Óbito destes pacientes informava os seguintes CIDs (Código Internacional de Doenças):

- I64 (acidente vascular cerebral): 2 pacientes,
- I46 (parada cardiorrespiratória): 1 paciente,
- A41 (Septicemia) e J18 (Pneumonia): 1 paciente,
- B24 (infecção pelo HIV) e R64 (Caquexia): 1 paciente,
- B24 (infecção pelo HIV) e B55 (Leishmaniose): 1 paciente,
- C76 (Neoplasia de localização não definida): 1 paciente,
- C61 (Neoplasia de próstata): 1 paciente e
- Acidente por arma de fogo: 1 paciente.

Após inclusão os pacientes eram acompanhados trimestralmente e realizado coleta de exames para análise da quantificação de linfócitos T CD4+ e carga viral do HIV a cada seis meses, exceto nos casos que a contagem de Carga Viral estava maior que 100 cópias, neste caso o acompanhamento era mensal.

Os pacientes foram orientados a procurar o ambulatório do SAE caso fosse diagnosticado como dengue em outro serviço, ou apresentasse febre associado a algum sintoma como eritema generalizado, mialgia, artralgia, dor retroocular e cefaleia.

### 5.3. Características demográficas da população do estudo

Os dados demográficos da população do estudo estão representados na tabela 2.

**Tabela 2** – Caracterização demográfica da população do estudo.

<b>Variável</b>	<b>n = 161</b>
<b>Masculino</b>	97 (60,2%)
<b>Feminino</b>	64 (39,8%)
<b>Idade Mediana</b>	51
<b>Idade Média</b>	49 ( $\pm$ 9,89)
<b>Entre 18 e 59 anos</b>	128 (80%)
<b>Acima de 59 anos</b>	33 (20%)
<b>Coinfecção</b>	
Hepatite B	1
Hepatite C	19

Valores expressos em números absolutos e entre parênteses porcentagem dentro da mesma variável.  
Desvio padrão entre parênteses representados pelo sinal  $\pm$

A população do estudo foi predominantemente masculina com 97 (60,2%) pacientes e 64 (39,8%) mulheres. A média de idade foi de 49 anos, destes 128 (80%) pacientes tinham idade entre 18 e 60 anos. Destes pacientes, 19 eram coinfectados pelo vírus da Hepatite C e 1 pelo vírus da hepatite B.

#### 5.4. Características relacionadas a infecção e tratamento do HIV

Os dados apresentados neste item se referem às características do tratamento e condições laboratoriais relacionadas a infecção pelo HIV no momento da inclusão e no final do estudo. As variáveis avaliadas foram a quantificação da carga viral do HIV de cada paciente, o número do pacientes com valores de carga viral menor que 100 cópias, a quantificação de Linfócitos T CD4+ e número de pacientes com contagem de CD4 maior e igual a 200 células, além da TARV que os pacientes estavam em uso no início do tratamento e suas eventuais substituições. Estas variáveis permitem avaliar a qualidade do serviço e tratamento oferecido aos pacientes além de indicar o status imunológico dos mesmos.

A quantificação de Linfócitos T CD4+ e carga viral do HIV dos pacientes do estudo estão representadas na Tabela 3.

**Tabela 3** – Quantificação da Carga Viral do HIV e dos Linfócitos T CD4+ (CD4) dos pacientes nos momentos da inclusão e ao final do estudo.

Variável	Inclusão	Final	<i>p</i> valor*	OR (IC 95%)
<b>Carga Viral &lt;100</b>	112 (70%)	149 (93%)	0,0001	5,43 [2,76-10,69]
<b>Carga Viral Média</b>	71769 (±546857)	1375 (±9050)		
<b>CD4 ≥ 200</b>	145 (90%)	155 (96%)	0,0468	2,86 [1,08-7,48]
<b>Média de CD4</b>	631 (±357)	715 (±345)		

\* *p* valor obtido por meio do teste Qui-Quadrado, utilizando nível de significância <0,05

A análise da carga viral do HIV dos pacientes evidenciou que 112 pacientes (70%) estavam com Carga Viral menor que 100 cópias no início do estudo, destes 104 estavam com carga viral indetectável. Todos os demais pacientes com carga viral detectável, foram orientados a melhorar adesão sendo substituída a TARV quando necessário. No final do seguimento deste estudo 149 pacientes (93%) apresentam carga viral menor que 100 cópias, destes 145 estavam

com carga viral indetectável. A análise do Qui-Quadrado evidenciou significância estatística entre o número de pacientes com CV < 100 cópias no início e final do estudo com  $p = 0,01$

Em relação a contagem de Linfócitos T CD4+ (CD4), no momento da inclusão no estudo 16 indivíduos (10%) apresentavam contagem menor que 200 células e o valor médio de CD4 era 631,02 com desvio padrão de 357. Ao final do estudo havia 6 indivíduos (4%) com CD4 menor que 200 células e o valor médio de CD4 é 715 com desvio padrão de 345.

A análise do Qui-Quadrado também evidenciou significância estatística entre o número de pacientes com CD4  $\geq 200$  células na inclusão e no término do estudo com  $p = 0,04$ .

No momento da inclusão 2 pacientes não estavam em uso de TARV, pois tinham sido diagnosticados pelo HIV recentemente, e logo após coleta de exames foi iniciada a TARV que foi prescrita conforme orientações do Ministério da Saúde vigentes na época. As informações referentes aos tratamentos e classes de medicamentos estão na TABELA 4.

**Tabela 4** - Quantitativo de pacientes utilizando antirretrovirais separados por classes dos medicamentos no momento da inclusão e ao final do estudo.

	<b>Inclusão</b>	<b>Final</b>
<b>ITRN</b>	161 (100%)	161 (100%)
<b>ITRNN</b>	86 (53%)	79 (49%)
<b>Inibidores de Integrase (INI)</b>	10 (6%)	17 (11%)
<b>Inibidores de Protease (IP)</b>	73 (45%)	76 (47%)
<b>Inibidores de Entrada</b>	1 (0,6%)	1 (0,6%)
<b>Sem TARV*</b>	2 (1,2%)	0

A TARV consiste na combinação de classes de Antirretrovirais justificando a somatória dos valores ultrapassar o número total de pacientes do estudo.

\* Pacientes não estavam em uso da terapia antirretroviral (TARV) na inclusão por infecção recente.

Todos os pacientes estavam em uso de dois Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo/Nucleotídeo (ITRN), destes 62 estavam em uso de Zidovudina (AZT), 99 com Tenofovir (TDF), 1 com Didanosina (DDI), todos associados a Lamivudina (3TC). Estes fármacos sempre estavam associados a outra classe de antirretroviral como os Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeo (ITRNN), Inibidor de Integrase, Inibidor de Protease (IP) ou ainda Inibidores de Entrada.

Em uso de ITRNN havia 86 pacientes, destes 7 estavam em uso de Nevirapina e os demais em uso de Efavirenz (EFZ). Em uso de Inibidores de Protease (IP) 73 pacientes e 10 pacientes estavam em uso de Inibidores de Integrase, somente 1 paciente estava em uso de Inibidor de entrada (Maraviroque).

Durante o estudo 62 pacientes tiveram sua TARV substituída durante o seguimento, os motivos para as trocas foram falha terapêutica, intolerância, efeitos colaterais das medicações ou ainda por orientação do Ministério da Saúde devido a mudanças nas diretrizes terapêuticas.

### 5.5. Características relacionadas a infecção pelo vírus Dengue

No período de Julho de 2015 a março de 2016, foi realizado um inquérito sorológico (anticorpos Anti-Dengue IgG e IgM) na admissão dos pacientes no estudo para avaliar o status sorológico dos mesmos, encontrando um total de 8 pacientes com resultado positivo. Foi observado a presença de anticorpos IgM isoladamente em 1 paciente e 7 pacientes apresentavam presença de anticorpos IgG, destes 2 também apresentavam IgM. Nenhum paciente apresentava sintomas febris ou suspeita de dengue no momento da admissão e coleta de exames. O resultado deste inquérito sorológico está representado na tabela 5.

**Tabela 5** – Quantitativo da detecção dos anticorpos anti-dengue IgG e IgM no momento da inclusão e ao final do estudo

<b>Variável</b>	<b>Início</b>	<b>Final</b>
<b>Total Positivos</b>	8 (4,9%)	23 (14%)
IgG	5	10
IgM	1	12
IgG e IgM	2	1

Durante o decorrer do estudo, nenhum paciente procurou o serviço de saúde do município com sintomas de Dengue ou foi notificado para Dengue.

Ao final do estudo, no período de julho a dezembro de 2019, outro inquérito sorológico foi realizado, e foi observado que 10 indivíduos apresentavam positividade para IgG isoladamente, 12 indivíduos apresentavam IgM isoladamente, 1 indivíduo apresentava presença tanto de IgM como IgG. Neste caso também não foi observado ou relatado quaisquer sinais e

sintomas nos pacientes durante avaliação e coleta de exames. O resultado deste inquérito sorológico está representado na tabela 5.

A comparação entre os casos positivos no início do estudo e seu status sorológico ao final evidenciou que somente 2 pacientes que apresentavam imunoglobulinas anti-dengue no início do estudo permaneceram com presença de IgG ao final do estudo.

Foram realizadas análises em busca de associação entre as variáveis demográficas e relacionadas à infecção pelo HIV em associação ao comportamento dos anticorpos anti-dengue detectadas no início do estudo, se os mesmos permaneciam detectáveis ou não ao final do estudo. A análise da significância desta comparação está representada na tabela 6.

**Tabela 6** – Variáveis demográficas e relacionadas a infecção pelo HIV dos pacientes com resultado positivo para a pesquisa de anticorpos anti-Dengue (IgM e/ou IgG) na inclusão do estudo e sua relação com a pesquisa de anticorpos ao final do estudo.

Variável	Resultado da pesquisa de Anticorpos (n=8)		p valor*
	Negativo	Positivo	
<b>Sexo</b>			
Masculino	2	2	0,429
Feminino	4	0	
<b>Idade</b>			
18-60	4	2	1
>60	2	0	
<b>CD4</b>			
<200	0	0	0,223
200-500	1	0	
>500	5	2	
<b>Carga Viral</b>			
<100	5	2	1
>100	1	0	

\* p valor obtido por meio do teste Qui-Quadrado, utilizando nível de significância <0,05



Foram avaliadas as variáveis sexo, idade, quantificação de carga viral, quantificação de Linfócitos T CD4+ dos pacientes com anticorpos detectáveis no início do estudo e os resultados deste teste ao final, porém nenhuma análise identificou significância estatística.

Os 2 pacientes que apresentavam IgG e IgM positivos, não apresentaram presença das imunoglobulinas testadas ao final, os 5 pacientes que apresentavam IgG somente 1 permaneceu com IgG positivo, e no paciente que apresentava IgM isoladamente, ao final do estudo foi observado a presença de IgM e IgG. Apesar de somente 2 dos 8 pacientes que apresentaram resultado positivo no início do seguimento apresentaram IgG positivo ao final do estudo, não foi observado relevância estatística entre estes dois grupos.

## Discussão

---

## 6. DISCUSSÃO

Apesar da ampla distribuição mundial das infecções pelos vírus dengue e pelo HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), ainda são poucos os estudos que apresentam dados sobre a coinfeção destes dois agravos (SIONG *et al.*, 2008) fato especialmente importante para o Brasil devido as suas características socioambientais e pela alta prevalência destas duas infecções (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020)

Os estudos que versam sobre a coinfeção são controversos, ora afirmando agravamento dos sintomas, ora observando redução das apresentações graves e ora indicando que não há alteração da história natural (JOOB; WIWANITKIT, 2014; PANG *et al.*, 2015; TORRENTES-CARVALHO *et al.*, 2016). Este estudo acompanhou os pacientes soropositivos por 4 anos, apesar do tamanho da amostra não ser grande, evidenciou que apesar dos pacientes terem sido expostos ao vírus, os mesmos não apresentaram nenhum sinal ou sintoma para síndrome febril, concordando com a teoria de que as infecções pelos vírus dengue em PVHA resultam em infecções mais leves do que as habituais.

A população estudada contou com 161 pacientes, teve predomínio do sexo masculino 97 (60,2%), a maior concentração (80%) apresentavam idade entre 18 e 60 anos, e a média de idade foi de 49 anos. A análise epidemiológica nacional descrita no Boletim Epidemiológico HIV/AIDS também apresenta o sexo masculino como predominante com maior concentração de casos entre indivíduos de 25 a 39 anos de idade (Brasil, 2020) e estes achados epidemiológicos permitem determinar que existe um paralelo entre as características epidemiológicas da população estudada e da população geral.

Vale ressaltar que todos os pacientes maiores de 18 anos que eram atendidos no SAE/ Birigui foram convidados a participar do estudo, porém apesar das explicações a respeito da confidencialidade do estudo, alguns pacientes se negaram a participar com receio da exposição de sua condição de soropositividade. Este fato foi o que pesou para a não inclusão de um grupo controle de indivíduos soronegativos, pois os pacientes em seguimento não aceitaram a inclusão no estudo indivíduos soronegativos cuja residência estava na mesma área geográfica (comunicantes domiciliares ou moradores próximos a residência) do paciente, condições consideradas necessárias para assegurar que ambos os grupos estivessem expostos as mesmas variáveis geoeconômicas (ELLIOTT; WARTENBERG, 2004). A recusa foi justificada pelo medo da divulgação de sua condição de soropositividade. Este posicionamento e preocupação

dos pacientes reflete o estigma e preconceito que as PVHA sofreram desde o início da epidemia e ainda estão sujeitos (KING, 1989; MAHAJAN *et al.*, 2008)

Outro dado relevante a respeito da população estudada, é a exclusão de 28 pacientes, destes 15 mudaram de cidade, 2 foram transferidos ao sistema prisional, 1 foi a óbito devido a acidente por arma de fogo e 2 simplesmente abandonaram o serviço, demonstrando que apesar dos avanços no tratamento e prevenção da epidemia de AIDS no país, observamos que a população de soropositivos no Brasil ainda vivem uma condição de vulnerabilidade social e (ZACHEK *et al.*, 2019) estas condições de vulnerabilidade afetam diretamente na adesão e tratamento do paciente (MIYADA *et al.*, 2017). Além do paciente que foi a óbito devido a acidente por arma de fogo nenhum dos demais casos de óbito (8) que aconteceram no decorrer do estudo tiveram relação com infecção por arboviroses.

Apesar deste estudo ser observacional, para sua realização houve uma mudança na rotina de atendimentos dos pacientes. O PCDT para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos, recomenda que pacientes com quadro clínico estável realizem consultas medicas e exames de rotina semestralmente (BRASIL, 2018), neste estudo a periodicidade das consultas, que era semestral para todos os pacientes com estabilidade clínica e carga viral indetectável, passou a ser trimestral; e para aqueles pacientes com carga viral detectável ou contagem de Linfócitos CD4+ inferior a 200 cel/mm<sup>3</sup> a frequência das consultas foi mensal. Esta única intervenção resultou em uma redução do número de pacientes com carga viral detectável (superior a 100 copias) e aumento do número de pacientes com contagem de Linfócitos CD4+ superior a 200 cel/mm<sup>3</sup>, a variação identificada nestes indicadores foi estatisticamente significativa podendo ser considerado um ganho secundário do estudo. A melhora dos indicadores do ambulatório (SAE/Birigui) resultou no recebimento da Menção Honrosa Brenda Lee em reconhecimento aos trabalhos realizados no enfrentamento a epidemia de HIV/AIDS no município (BIRIGUI..., 2018)

Somente 2 pacientes estavam sem uso de TARV no início do estudo devido ao diagnostico recente sendo prescrita logo após coleta dos exames admissionais. Todos os pacientes fizeram uso de antirretrovirais conforme protocolo clinico vigente na época e tiveram suas terapias substituídas nos casos de falha terapêutica ou mudança no protocolo nacional.(BRASIL, 2018). Não houve nenhuma relação estatística entre as classes de Antirretrovirais utilizadas e as demais variáveis analisadas

Além do fato do município de Birigui ser endêmico para dengue, durante o período do estudo aconteceram as duas maiores epidemias de dengue já registradas no município com 4770 casos em 2016 e 7882 casos confirmados em 2019. O número de mortos também foi o maior já

registrado no período com 9 óbitos confirmados em 2019, este dado é importante pois demonstra que os pacientes do estudo foram expostos a arbovirose estudada.

Na avaliação inicial dos pacientes foram identificados 8 pacientes com sorologia positiva, nos quais a presença do IgM foi detectada em 3 casos, o que sugere que os referidos pacientes estavam na fase aguda ou nas semanas seguintes a doença aguda, porém surpreendentemente nenhum paciente referiu quaisquer sintomas. Também foram identificados 5 pacientes com presença do IgG isolado o que sugere contato prévio com o DENV, na consulta de admissão estes pacientes negaram histórico prévio de Dengue.

Os pacientes, acompanhados trimestralmente, eram sempre questionados sobre a presença de sintomas de Dengue, da mesma maneira os pacientes eram orientados a procurar o ambulatório SAE caso apresentasse febre associada a algum sintoma de dengue, porém nenhum paciente relatou ou procurou o serviço de saúde devido a sintomas suspeitos durante os 4 anos de estudo, neste período também não houve no município nenhuma notificação para dengue entre os indivíduos do estudo.

No desenho do estudo estava previsto a coleta de exames para pesquisa de anticorpos anti-Dengue na vigência de sintomas sugestivos ou suspeita de Dengue, porém como nenhum paciente apresentou sintomas esta coleta não pode ser realizada. Chama a atenção o fato de nenhum paciente ter apresentado sintomas ou notificado por dengue no decorrer do estudo, isto corrobora algumas publicações que indicam uma diminuição dos sintomas e da gravidade da infecção por dengue em pacientes soropositivos para o HIV.

O inquérito sorológico ao final do estudo identificou 23 pacientes positivos, evidenciando a presença de IgM em 13 indivíduos sendo que todos estavam assintomáticos. Também foram identificados 11 indivíduos com presença de IgG, destes somente 2 apresentavam positividade no início do estudo, sugerindo que além dos pacientes que, no início do estudo, haviam sido infectados anteriormente, outros 9 pacientes foram infectados no decorrer do seguimento clínico, confirmando que os pacientes realmente foram expostos ao vetor e foram infectados, sustentando a percepção inicial de que estes pacientes apresentam formas oligo-assintomáticas da dengue.

A sintomatologia frustra da dengue em PVHA observado no estudo pode ser justificado pela queda de plaquetas característica da infecção pelo DENV (HOTTZ *et al.*, 2011), em ambas as patologias as plaquetas tem participação na ampliação da resposta inflamatória nos indivíduos infectados (SINGH *et al.*, 2014; HOTTZ *et al.*, 2013). Entretanto na coinfeção dengue e HIV foi observado que os níveis plasmáticos das quimiocinas derivadas de plaquetas

(RANTES/CCL5 e PF4/CXL4) estavam reduzidos, este fato poderia estar relacionado a uma apresentação clínica mais branda da infecção pelo DENV (HOTTZ *et al.*, 2019).

Uma queda nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IFN-gama e IL-1Beta foi observada em pacientes coinfetados (HOTTZ *et al.*, 2019). Estes níveis mais baixos de citocinas também poderiam justificar o achado do estudo.

Destaca-se o fato de que dos 8 pacientes que eram positivos para dengue no inquérito sorológico inicial, ao final do estudo observou-se a não manutenção do IgG em 6 pacientes. Apesar de não ter sido possível comprovar relevância estatística, este achado sugere que os pacientes soropositivos apresentam redução ou perda das imunoglobulinas IgG anti-dengue, independente do estágio da sua infecção pelo HIV e muito provavelmente relacionado ao comprometimento da resposta imune induzido pela infecção pelo HIV.

Vale ressaltar que os 2 casos em que o IgG permaneceu positivo ao final do estudo, 1 paciente apresentava também o IgM positivo, evidenciando que no período do seguimento o paciente pode ter tido novo contato com o DENV. O outro paciente que manteve a positividade do IgG ao final do estudo apresentava a maior contagem de Linfócitos T CD4+ da amostra, este achado chama a atenção pois altos níveis de CD4 pode ser uma possível variável relacionada a manutenção da imunoglobulina anti-dengue nos pacientes soropositivos, porém devido ao número da amostra não foi possível encontrar relevância estatística neste achado.

Finalmente, uma possível explicação para as infecções oligo-assintomáticas observadas na coinfeção dengue e HIV pode estar relacionadas ao uso dos antirretrovirais e estes exerceriam uma ação antiviral contra os vírus dengue, impedindo a infecção destes pacientes e com isso, induzindo uma resposta imune de pequena monta, o que explicaria a baixa prevalência da dengue na população estudada. Obviamente, este é um aspecto que deve ser estudado em maior profundidade.

## Conclusões

---

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que a frequência trimestral de consultas de seguimento impacta positivamente nos níveis de Linfócitos CD4+ e carga viral;

Sugerir que a infecção pelo HIV pode minimizar a gravidade e os efeitos da infecção pelo DENV seja pela interferência entre as infecções, pela resposta imune de menor intensidade apresentada por PVHA ou pela ação dos antirretrovirais nas infecções pelos vírus dengue;

Sugerir que as Imunoglobulinas IgG anti-Dengue deixam de ser detectadas em pacientes soropositivos no período de alguns anos.

Sugerir que contagem de linfócitos T CD4+ pode ser um fator para a manutenção das Imunoglobulinas IgG anti-Dengue no indivíduo.



## Referências

---

## REFERÊNCIAS

- ALTFELD, M. *et al.* **DCs and NK cells: Critical effectors in the immune response to HIV-1.** *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 3, p. 176-186, Mar. 2011
- ANDERSON, R. **Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses.** *Advances in Virus Research*, v. 59, p. 229, 2003.
- ARTS, E. J.; HAZUDA, D. J. **HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 4, 2012.
- AZEREDO, E. L. *et al.* **Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever.** *Immunobiology*, v. 204, n. 4, p. 494–507, 2001.
- BARRE-SINOUSI, F. *et al.* **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** *Science*, v. 220, n. 4599, p. 868–871, 20 Maio 1983.
- BARRÉ-SINOUSI, Françoise. **HIV as the cause of AIDS.** *Lancet*. V. 348, n. 9019, p 31-35, 6 Jul 1996
- BEBENEK, K. *et al.* **Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 28, p. 16948–16956, 1989.
- BHATT, S. *et al.* **The global distribution and burden of dengue.** *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504–507, Abr. 2013.
- BIRIGUI recebe “Prêmio Luiza Matida” por trabalhos para eliminação da sífilis. **Notícias Destaque.** Birigui, 2018. Disponível em: [http://www.birigui.sp.gov.br/birigui/noticias/noticias\\_detalhes.php?id\\_noticia=6037](http://www.birigui.sp.gov.br/birigui/noticias/noticias_detalhes.php?id_noticia=6037)
- BLACKSELL, S. D. **Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: Recent evaluations and future needs?.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p.1-12, 2012.
- BRASIL. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2020..** Brasília, 2020 Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-hivaids-2020>
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico.** v. 52, n. 3, p 1-31, 2021
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Dengue diagnostico e manejo clinico: Adulto e Criança.** 4. ed. 2013. 80 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos.** Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>
- BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. **AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 2, p. 207–217, 2001.
- BRODT, H. *et al.* **Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy.** *AIDS*, v. 11, n. 14, p. 1731–1738, 1997.
- CAMPBELL-YESUFU, O. T.; GANDHI, R. T. **Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 6, p. 780–787, 15 Mar 2011.
- COFFIN, J. M. *et al.* **What to call the AIDS virus?** *Nature*, v. 321, n. 6065, p.10, 1986
- COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. (ed.) **Immunopathogenic Mechanisms of HIV Infection.** *Retroviruses.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19451/>
- COHEN, J. **Confronting the Limits of Success.** *Science*, v. 296, n. 5577, p. 2320–2324, Jan. 2002.

COOPER, D. A.; MERIGAN, T.C. **Clinical treatment.** AIDS, v. 10 Suppl A, 1996.

COX, J. *et al.* **Habitat segregation of dengue vectors along an urban environmental gradient.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 76, n. 5, p. 820–6, Maio 2007.

DEEKS, S.G. *et al.* **Human immunodeficiency virus (HIV) infection.** Nature Reviews, v. 1, p. 1-22, 2015.

DEEKS, S. G.; LEWIN, S. R.; HAVLIR, D. V. **The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease.** The Lancet, v. 382, n. 9903, p. 1525–1533, Nov. 2013.

DEEKS, S. G.; WALKER, B. D. **Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy.** Immunity. V. 27, n. 3, p. 406-416, Set. 2007

EASTERBROOK, P.; MEADWAY, J. **The changing epidemiology of HIV infection: New challenges for HIV palliative care.** Royal Society of Medicine Press Ltd, v.94, n.9, p. 442–448, 2001.

EGGLETON, J. S.; NAGALLI, S. **Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART).** Neuroimaging Pharmacopoeia, p. 203–212, Abr. 2021. Disponível em: <https://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554533/>

ELLIOTT, P.; WARTENBERG, D. **Spatial Epidemiology: Current Approaches and Future Challenges.** Environmental Health Perspectives, v. 112, n. 9, p. 998, 2004.

ESPESETH, A. S. *et al.* **HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, n. 21, p. 11244–11249, Out. 2000.

FAROOQ, T. *et al.* **Antiretroviral Agents: Looking for the Best Possible Chemotherapeutic Options to Conquer HIV.** Critical reviews in eukaryotic gene expression, v. 26, n. 4, p. 363–381, 2016.

FAUCI, A. S. *et al.* **NIH conference. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations.** Annals of internal medicine, v. 100, n. 1, p. 92–106, Jan. 1984.

FERLAZZO, G. *et al.* **Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 101, n. 47, p. 16606-16611, 2004.

PALELLA, F., *et al.* **Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.** The New England journal of medicine, v. 338, n. 13, p. 853–860, Mar. 1998.

FONSECA, M. G. *et al.* **AIDS e grau de escolaridade no Brasil: evolução temporal de 1986 a 1996.** Cadernos de Saúde Pública, v. 16, n. 1, p. S77–S87, 2000.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. T. **HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA.** Annual Review of Biochemistry, v. 67, p. 1-25, 1998.

GALLO, R. C. *et al.* **Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.** Science (New York, N.Y.), v. 224, n. 4648, p. 500–3, May 1984.

GOTTLIEB, *et al.* **Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men.** New England Journal of Medicine, v. 305, n. 24, p. 1425–1431, Dez. 1981.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. **Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem.** Emerging infectious diseases, v. 1, n. 2, p. 55–7, 1995.

GUBLER, D. J. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** Clinical Microbiology Reviews, v. 11, n. 3, p. 480–496, Jul. 1998.

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

- HALSTEAD, S. B. **Dengue**. *Lancet*. v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, Nov. 2007
- HASSE, B. *et al.* **Aging and ( Non-HIV-associated ) Co-morbidity in HIV-positive Persons : The Swiss HIV Cohort Study ( SHCS )**. The SHCS - 18th Conference on Retroviruses and Opportunist Infection, p. 161, 2011.
- HEMELAAR, J. **The origin and diversity of the HIV-1 pandemic**. *Trends in Molecular Medicine*. V.18, n. 3, p. 182-193, 2012.
- HERRERO, L. J. *et al.* **Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis**. *Pharmacology & therapeutics*, v. 137, n. 2, p. 266–282, Fev. 2013.
- HIRSCHHORN, L. R. *et al.* **Cancer and the “other” noncommunicable chronic diseases in older people living with HIV/AIDS in resource-limited settings: a challenge to success**. *AIDS*, v. 26 Suppl 1, n. SUPPL.1, 31 Jul 2012.
- HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. **The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. Infection, genetics and evolution**. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v. 3, n. 1, p. 19–28, Maio 2003.
- HOTTA, S. **Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus**. *The Journal of infectious diseases*, v. 90, n. 1, p. 1–9, 1952.
- HOTTZ, E. D. *et al.* **Platelet function in HIV plus dengue coinfection associates with reduced inflammation and milder dengue illness**. *Scientific Reports* 2019 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–13, 8 Maio 2019.
- HOTTZ, E. D. *et al.* **Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation**. *Blood*, v. 122, n. 20, p. 3405–3414, 2013.
- HOTTZ, E. D. *et al.* **Platelets in dengue infection**. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 8, n. 1–2, p. 33–38, Jun. 2011
- IBE, S. *et al.* **HIV-2 CRF01-AB: First circulating recombinant form of HIV-2**. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 54, n. 3, p. 241–247, Jul. 2010.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. Birigui (SP). Cidades e Estados**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/birigui.html>>. Acesso em: 17 jul 2021.
- IVES, N. J. *et al.* **The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in London clinic**. *Journal of Infection*, v. 42, n. 2, p. 134–139, 2001.
- JAFFE, *et al.* **Acquired Immune Deficiency Syndrome in the United States: The First 1,000 Cases**. *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES*, v. 148, n. 2, p. 338-345, 1983.
- JOOB, B.; WIWANITKIT, V. **Dengue in HIV infected patients: clinical profiles**. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 4, n. Suppl 2, p. S568–S569, 2014.
- KAHN, J.O.; WALKER, B.D. **Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection**. *The New England Journal of Medicine*, v. 339, p. 33–39, 1998.
- KARON, J. M. *et al.* **Projections of the number of persons diagnosed with AIDS and the number of immunosuppressed HIV-infected persons--United States, 1992-1994**. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, v. 41, n. RR-18, p. 1–29, Dez. 1992.
- KING, M. B. **Prejudice and AIDS: The views and experiences of people with HIV infection**. *AIDS Care*, v. 1, n. 2, p. 137–143, 1989.
- KOHLSTAEDT, L.A. *et al.* **Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor**. *Science*, v. 256, n. 5065, p. 1783–1790, 1992.

- LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. **Regulation of T cell immunity by dendritic cells.** Cell. v. 106, n. 3, p. 263-266, Ago. 2001
- LIU, Y. J. **Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity.** Cell. v.106, n. 3, p. 259-262, Ago. 2001
- LOS ALAMOS. **HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs).** 2020. Disponível em: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>. Acesso em: 15 jun 2021.
- MAHAJAN, A. P. *et al.* **Stigma in the HIV/AIDS epidemic: A review of the literature and recommendations for the way forward.** AIDS, v. 22, n. Suppl 2, p. S67, 2008.
- MCLINDEN, J. H. *et al.* **Expression of the dengue virus type 2 NS5 protein in a CD4(+) T cell line inhibits HIV replication.** The Journal of infectious diseases, v. 198, n. 6, p. 860–863, 2008.
- MCMICHAEL, A. J. *et al.* **The immune response during acute HIV-1 infection: Clues for vaccine development.** Nature Reviews Immunology. V. 10, n.1, p. 11-13, Jan. 2010
- MELHUIISH, A.; LEWTHWAITE, P. **Natural history of HIV and AIDS.** Medicine, v. 46, n. 6, p. 356–361, Jun. 2018.
- MENDES, W.S.; BRANCO, M.F.C.; MEDEIROS, M.N.L. **Clinical case report: Dengue hemorrhagic fever in a patient with acquired immunodeficiency syndrome.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 74, n. 5, p. 905–907, Maio 2006.
- MESSINA, J. P. *et al.* **Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history.** Trends in microbiology, v. 22, n. 3, p. 138–146, 2014.
- MIYADA, S. *et al.* **Treatment adherence in patients living with HIV/AIDS assisted at a specialized facility in Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 50, n. 5, p. 607–612, 1 Set 2017.
- MONTAGNIER, L. **25 years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine.** Virology, v. 397, n. 2, p. 248–254, Fev. 2010.
- MORGADO, M. G. *et al.* **Human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome and tropical diseases: a Brazilian perspective.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. suppl 1, p. 145–151, 2000.
- NAKAGAWA, F.; May, M.; Phillips, A. **Life expectancy living with HIV: recent estimates and future implications.** Current opinion in infectious diseases, v. 26, n. 1, p. 17–25, Fev 2013.
- O'BRYAN, Thomas A. e colab. **Impact of the highly active antiretroviral therapy era on the epidemiology of primary HIV-associated thrombocytopenia.** BMC Research Notes, v. 8, n. 1, p. 595, Out. 2015.
- OLESKE, J. *et al.* **Immune Deficiency Syndrome in Children.** The Journal of the American Medical Association, v. 249, n. 17, p.2345-2349, May. 1983.
- OSMANOV, S. *et al.* **Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000.** Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, v. 29, n. 2, p. 184–190, Fev. 2002.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Data - Dengue.** Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en.html>>. Acesso em: 22 jul 2021.
- PANG, J. *et al.* **Differential clinical outcome of dengue infection among patients with and without HIV infection: A matched case-control study.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 92, n. 6, p. 1156–1162, 2015.
- PEDERSEN, C. *et al.* **Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection.** BMJ (Clinical research ed.), v. 299, n. 6692, p. 154–7, Jul. 1989.

PICKER, L. J. **Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection.** Current Opinion in Immunology. v. 18, n. 4, p. 399-405, Ago. 2006

RAUT, R. *et al.* **A small molecule inhibitor of dengue virus type 2 protease inhibits the replication of all four dengue virus serotypes in cell culture.** Virology Journal. v. 12, n. 1, p. 1–7, Fev. 2015.

REEVES, J. D.; DOMS, R. W. **Human immunodeficiency virus type 2.** Journal of General Virology. v. 83, n. 6, p. 1253-1265, Jun. 2002

REIS, M. N.G. *et al.* **Identification of new HIV-1 circulating recombinant forms CRF81-cpx and CRF99-BF1 in central Western Brazil and of unique BF1 recombinant forms.** Frontiers in Microbiology, v. 10, n. FEB, 2019.

ROMAGNANI, C. *et al.* **Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells.** European Journal of Immunology, v. 35, n. 8, p. 2452–2458, Jan. 2005.

ROSENBERG, Z. F.; FAUCI, A. S. **The Immunopathogenesis of HIV Infection.** Advances in Immunology, v. 47, n. C, p. 377–431, Jan. 1989.

SANDERS, R W. **HIV takes double hit before entry.** BMC biology, v. 10, p.1-2, 2012.

SEITZ, R. **Human Immunodeficiency Virus (HIV).** Transfusion Medicine and Hemotherapy, v. 43, n. 3, p. 203–222, 2016.

SHAFER, R. W. *et al.* **A Guide to HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease Sequencing for Drug Resistance Studies.** HIV Sequence Compendium, v. 2001, p. 1-51, 2001.

SINAN. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação.** Dengue. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan> Acesso em: Nov. 2021

SINGH, M. V. *et al.* **Characterization of Platelet–Monocyte Complexes in HIV-1–Infected Individuals: Possible Role in HIV-Associated Neuroinflammation.** The Journal of Immunology, v. 192, n. 10, p. 4674–4684, 15 Maio 2014.

SIONG, W. C. *et al.* **Dengue infections in HIV patients.** The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health, v. 39, n. 2, p. 260–5, Mar. 2008.

SNOW, G. E. *et al.* **Research on Dengue During World War II Revisited.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 91, n. 6, p. 1203–1217, Dez. 2014.

TALARMIN, A *et al.* **Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever.** Journal of clinical microbiology, v. 36, n. 5, p. 1189–92, May. 1998.

TANSER, F. *et al.* **Concentrated HIV subepidemics in generalized epidemic settings.** Current Opinion in HIV and AIDS. v. 9, n. 2, p. 115-125, Mar 2014

TORRENTES-CARVALHO, A. *et al.* **Apoptosis characterization in mononuclear blood leukocytes of HIV patients during dengue acute disease.** Scientific Reports 2020 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–13, Abr. 2020.

TORRENTES-CARVALHO, A. *et al.* **Characterization of clinical and immunological features in patients coinfecting with dengue virus and HIV.** Clinical Immunology, v. 164, p. 95–105, 2016.

UNAIDS. **UNAIDS Data 2020.** Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, p. 1–436, 2020. Disponível em: <<https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/unaids-data>>. Acesso em: 2 mar 2021.

URCUQUI-INCHIMA, S. *et al.* **Recent Developments in Understanding Dengue Virus Replication.** Advances in Virus Research, v. 77, n. C, p. 1–39, Jan. 2010.

VAISHNAV, Y. N.; WONG-STAAAL, F. **THE BIOCHEMISTRY OF AIDS**. Annual Review of Biochemistry, v. 60, p. 577-633, 1991.

VAUGHN, D. W. *et al.* **Dengue in the early febrile phase: Viremia and antibody responses**. Journal of Infectious Diseases, v. 176, n. 2, p. 322-330, 1997.

VISSEAU, B. *et al.* **Hiv-2 molecular epidemiology**. Infection, Genetics and Evolution, v. 46, p. 233-240, 1 Dez 2016.

WATT, G.; KANTIPONG, P.; JONGSAKUL, K. **Decrease in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Load during Acute Dengue Fever**. HIV/AIDS, v. 36, n. 1, p. 1067-1069, 2003.

WILD, C.; GREENWELL, T.; MATTHEWS, T. **A Synthetic Peptide from HIV-1 gp41 Is a Potent Inhibitor of Virus-Mediated Cell-Cell Fusion**. AIDS Research and Human Retroviruses. v. 9, n. 11, p. 1051-1053, 1993

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global HIV & AIDS statistics. Fact sheet**. p.1-2, 2020. Disponível em: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>. Acesso em: 15 jul 2021.

WU, H. *et al.* **Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 59, n. 2, p. 1100-1109, Fev. 2015.

WU, L.; KEWALRAMANI, V. N. **Dendritic-cell interactions with HIV: Infection and viral dissemination**. Nature Reviews Immunology. v. 6, n. 11, p. 859-868, 13 Nov 2006

ZACHEK, C. M. *et al.* **The Intersection of HIV, Social Vulnerability, and Reproductive Health: Analysis of Women Living with HIV in Rio de Janeiro, Brazil from 1996 to 2016**. AIDS and behavior, v. 23, n. 6, p. 1541, Jun. 2019.


# Anexos

---



## ANEXOS

## ANEXO A - Parecer consubstanciado do CEP

USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP	
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>	
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>	
<b>Título da Pesquisa:</b> AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E SOROLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO VIRUS DENGUE EM PACIENTES INFECTADOS PELO VIRUS	
<b>Pesquisador:</b> Igor Barcellos Precinoti	
<b>Área Temática:</b>	
<b>Versão:</b> 3	
<b>CAAE:</b> 58422716.5.0000.0065	
<b>Instituição Proponente:</b> Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -	
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio	
<b>DADOS DO PARECER</b>	
<b>Número do Parecer:</b> 1.897.133	
<b>Apresentação do Projeto:</b> Nada a acrescentar	
<b>Objetivo da Pesquisa:</b> Avaliar as características clínico-epidemiológicas e sorológicas, de pacientes coinfectados com o HIV e vírus dengue quanto a existência de variações na apresentação e no desfecho da infecção pelos vírus dengue nos pacientes infectados pelo HIV.	
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> Apresentado o risco inerente à coleta de sangue. Não há benefício direto ao paciente.	
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> Foi incluída a Carta de Anuência do Serviço de Birigui, onde também será realizado o estudo. Foi solicitada a inclusão de CEP do HC-FMRP de Ribeirão Preto. O autor informou não ser possível a mudança de CEP, uma vez que o projeto já foi avaliado e existe um parecer Consubstanciado de outro CEP (da FMUSP). Ainda segundo o autor o CEP do HCFMRP-USP de Ribeirão consentiu com a avaliação do Projeto apenas pelo CEP de São Paulo.	
<b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> Foram incluídas as solicitações de parecerista anterior, quais sejam contato do pesquisador e do CEP no TCLE avisar o voluntário que ele receberá uma via deste do TCLE	
<b>Endereço:</b> DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36 <b>Bairro:</b> PACAEMBU <b>CEP:</b> 01.246-903 <b>UF:</b> SP <b>Município:</b> SAO PAULO <b>Telefone:</b> (11)3893-4401 <b>E-mail:</b> cep.fm@usp.br	

**USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 1.897.133

**Recomendações:**

Nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendência

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_631589.pdf	09/01/2017 20:18:18		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_de_anuencia.pdf	09/01/2017 20:13:21	Igor Barcellos Precinoti	Aceito
Outros	Carta_Resposta.docx	09/01/2017 20:12:26	Igor Barcellos Precinoti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v2_corrigida.doc	09/01/2017 20:10:49	Igor Barcellos Precinoti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_v_corrigida.doc	29/10/2016 22:13:36	Igor Barcellos Precinoti	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_assinada.pdf	02/08/2016 20:14:21	Igor Barcellos Precinoti	Aceito
Outros	UPC_Aprovacao.pdf	30/07/2016 17:22:03	Igor Barcellos Precinoti	Aceito
Orçamento	Planilha_orcamentaria.docx	30/07/2016 17:19:49	Igor Barcellos Precinoti	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 23 de Janeiro de 2017

Assinado por:

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador)**

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
 Bairro: PACAEMBU CEP: 01.248-003  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

## ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **"AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E SOROLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO VIRUS DENGUE EM PACIENTES INFECTADOS PELO VIRUS HIV"**

Pesquisador responsável: **Igor Barcellos Precinoti CRM 142361**

Convidamos o Sr(a) a participar da pesquisa científica chamada **"AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E SOROLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO VIRUS DENGUE EM PACIENTES INFECTADOS PELO VIRUS HIV"**, o objetivo deste estudo é conhecer como se comporta a infecção pelo Dengue nos pacientes soropositivos (infectados pelo HIV).

Este estudo é importante porque com o uso dos Antirretrovirais a infecção pelo HIV passou a ser considerada uma doença crônica, e os pacientes passaram a viver mais tempo. Desta forma os pacientes soropositivos passaram a contrair outras doenças, como por exemplo a Dengue.

Porém não sabemos como a infecção pelo Dengue acontece no paciente soropositivo, se existem diferenças nos sintomas, na gravidade, nos riscos de contrair a doença, nem nas formas que o corpo se defende desta infecção.

Para isso estamos propondo este estudo, que consiste em fazer uma entrevista de duração aproximada de 10 minutos, na entrevista iremos avaliar o uso de medicações, doenças anteriores, exames. Nesta ocasião iremos coletar uma amostra de sangue (aproximadamente 10 ml) para avaliarmos se você já teve contato com o vírus da dengue.

No período de 3 anos, caso você apresente febre, ou sintomas de Dengue, iremos te fazer uma nova entrevista, com duração aproximada de 10 minutos, e questionaremos sobre os sintomas (o que você está sentindo) e a duração destes sintomas. Nesta ocasião iremos coletar nova amostra de sangue (aproximadamente 10 minutos) para avaliar como seu corpo se defende da infecção pelo Dengue, e caso você permitir, iremos coletar outras duas amostras de sangue com o intervalo de 30 dias entre elas. O único incômodo que o(a) Sr(a) será submetido(a) neste trabalho é a dor causada por estas coletas de sangue

EU \_\_\_\_\_,

abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento "TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO", de que trata o Projeto de Pesquisa **"AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E SOROLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO VIRUS DENGUE EM PACIENTES INFECTADOS PELO VIRUS HIV"**, que tem como pesquisador responsável o (a) Sr. (a) Igor Barcellos Precinoti, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, à forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas

com a pesquisa e o tratamento a queerei submetido.

2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.
6. Receber uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Birigui, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável  
Igor Barcellos Precinoti

**Contatos:**

**Pesquisador**

**Igor Barcellos Precinoti:**

Fone: 18 – 36436233 (Ramal 119) / 18 – 981127828

E-mail: [igorprecinoti@usp.br](mailto:igorprecinoti@usp.br)

Endereço: Gumerindo de Paiva Castro S/N, Birigui-SP, CEP 16012-015


**CEP – Comitê de Ética em Pesquisa**

Fone: 11 – 38935501

E-mail: [cep\\_fm@usp.br](mailto:cep_fm@usp.br)

Endereço: Doutor Arnaldo, 251, 21º andar sala 34, São Paulo-SP, CEP 01246-903

## ANEXO C - Bula PanBio Dengue IgG Capture ELISA



532 Seventeen Mile Rocks Rd, Sinnamon Park, Brisbane, QLD 4073 Australia  
 T +61 7 3363 7100 F +61 7 3363 7199 E panbio@panbio.com  
 Freecall 1800 622 642 www.panbio.com

**Not for Sale or Distribution in the United States of America**

## DENGUE IgG CAPTURE ELISA

### For the Detection of Secondary Dengue Infection

**Cat No. E-DEN02G**

**INTENDED USE**  
 The PanBio Dengue IgG Capture ELISA is for the qualitative detection of IgG antibodies to dengue virus (serotypes 1-4) in secondary dengue infections. This test is intended as an aid in the clinical laboratory diagnosis of secondary dengue virus infection, and can be used in conjunction with the PanBio Dengue IgM Capture ELISA for presumptive differentiation between primary and secondary infection. This test should only be used with samples from patients with clinical symptoms consistent with dengue fever. Positive results must be confirmed by virus isolation, paired sera analysis, antigen detection by immunohistochemistry or viral nucleic acid detection for confirmation of dengue virus infection.

**INTRODUCTION**  
 Dengue virus is a flavivirus found largely in areas of the tropics and sub-tropics. Over half the world's population lives in regions at risk of potential dengue transmission, making dengue the most important arbovirus disease in humans, in terms of morbidity and mortality<sup>1</sup>. There are four distinct but antigenically related serotypes of dengue viruses, and transmission is via female mosquito, principally *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Aedes polynesiensis*.

The clinical manifestations of dengue virus infection are varied, ranging from subclinical through to fatal. The disease is graded according to severity as follows: non-specific febrile illness, classic dengue fever, dengue haemorrhagic fever (DHF) (grades I and II), and dengue shock syndrome (DSS) (grades III and IV)<sup>1</sup>. Classic dengue fever is characterised by the sudden onset of fever with two or more of: headache, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, rash, haemorrhagic manifestations and leukopenia<sup>2</sup>. A biphasic febrile course is common as is insomnia and anorexia with loss of taste or bitter taste. DHF and DSS are severe, potentially fatal complications often associated with infection by a second serotype<sup>3</sup>.

The majority of patients in countries where dengue is endemic will have secondary dengue infection<sup>4</sup>. Detection of antibodies to dengue virus is a valuable aid to diagnosis, particularly in second and subsequent infections where the occurrence of complications is high<sup>5</sup>. Traditionally, haemagglutination-inhibition (HAI) titres have been used to classify infections as primary or secondary. The current definition depends upon an assay of paired serum specimens separated in time by at least 7 days, with any acute specimen with an HAI titre  $\geq$  1:2560 defined as coming from a patient with a secondary flavivirus infection<sup>7</sup>. However, the variable potency of haemagglutinins made in different laboratories has led to doubts regarding the general applicability of classification of dengue cases according to HAI.

The PanBio Dengue IgG Capture ELISA is a favoured alternative to the HAI assay for the serological diagnosis of secondary dengue infections as it reduces inter-laboratory variation in dengue serology through the use of a standard calibrator. Unlike HAI, acetone extracted sera is not required, and sera need not be obtained after hospital discharge if a positive result is obtained.

Secondary dengue virus infection is characterised by high IgG levels detectable 1-2 days after the onset of infection, which may be accompanied by elevated IgM levels<sup>1,2</sup>. A high IgG level ( $>$  22 PanBio Units) is therefore indicative of secondary dengue virus infection.

**PRINCIPLE**  
 Serum IgG antibodies combine with anti-human IgG antibodies coated on the polystyrene surface of the microwell test strips (assay plate). Antigen reconstitution buffer is added to each antigen vial containing dengue virus antigens (serotypes 1-4). An equal volume of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated monoclonal antibody (MAb) is added to the reconstituted antigen,

allowing the formation of antigen-MAb complexes. Residual serum is removed from the assay plate by washing, and complexed antigen-MAb is transferred to the assay plate. These antigen-MAb complexes then bind to the serum dengue-specific IgG antibodies. After incubation the microwells are washed and a colourless substrate system, tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is added. The substrate is hydrolysed by HRP, if present, and the chromogen turns blue. After stopping the reaction with acid, the TMB turns yellow. Colour development is indicative of the presence of anti-dengue IgG antibodies in the test sample.

**MATERIALS PROVIDED**

1. Anti-human IgG-coated Microwells - (Green Assay Plate) (12x8 wells). Ready for use. Unused microwells should be resealed immediately and stored in the presence of the desiccant. Stable at 2-8°C until expiry.
2. Stabilised Dengue Antigens - Dengue viral antigens 1, 2, 3 and 4 lyophilised in vials. Unused lyophilised antigen should remain at 2-8°C. Reconstituted antigen can be stored frozen and thawed once. Lyophilised antigen is stable at 2-8°C until expiry.
3. Wash Buffer Concentrate - One bottle, 60 mL of 20x concentrate of phosphate buffered saline (pH 7.2-7.6) with Tween 20 and preservative (0.1% Proclin™). Crystallisation may occur at low temperatures. To correct, incubate at 37°C until clear. Mix well. Dilute one part wash buffer concentrate with 19 parts of distilled water. Diluted buffer may be stored for one week at 2-25°C.
4. Serum Diluent - Two bottles, 50 mL (Pink). Ready for use. This buffered saline (pH 7.2-7.6) with preservatives (0.1% Proclin™) and additives. Stable at 2-8°C until expiry.
5. Antigen Reconstitution Buffer - One bottle, 7 mL (Clear). Ready for use. Buffer containing preservative (0.1% Proclin™) and protein stabilisers. Stable at 2-8°C until expiry.
6. HRP Conjugated Monoclonal Antibody Tracer - One bottle, 7 mL (Green). Ready for use. Horseradish peroxidase conjugated monoclonal antibody tracer with preservative (0.1% Proclin™) and protein stabilisers. Stable at 2-8°C until expiry.
7. Tetramethylbenzidine TMB - One bottle, 15 mL. Ready for use. A mixture of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a citric-acid citrate buffer (pH 3.5-3.8). Stable at 2-8°C until expiry.
8. IgG Reactive Control Serum - One Red-capped vial, 200  $\mu$ L human serum (contains 0.1% sodium azide and 0.005% gentamycin sulphate). Stable at 2-8°C until expiry.
9. IgG Calibrator Serum - One Yellow-capped vial, 400  $\mu$ L human serum (contains 0.1% sodium azide and 0.005% gentamycin sulphate). Stable at 2-8°C until expiry.
10. IgG Negative Control Serum - One Green-capped vial, 200  $\mu$ L human serum (contains 0.1% sodium azide and 0.005% gentamycin sulphate). Stable at 2-8°C until expiry.
11. Stop Solution - One bottle, 15 mL. Ready to use. 1M Phosphoric acid. Stable 2-25°C until expiry.

Proclin™ 300 is a registered trademark of Rohm and Haas Company.

**⚠ (0n - Harmful) Control and Calibrator Sera Safety Precaution:**  
 Concentration of sodium azide in these components is classified as harmful and subject to the following risk phrases (R22, R52) "Harmful if swallowed" and "Contact with acids liberates very toxic gas."

Page 1 of 7 Revised 19/02/07 E-DEN02G (EN)

**ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- (1) Accurate adjustable micropipettes with disposable pipette tips (5-1000  $\mu\text{L}$  capacity)
- (2) Deionised water
- (3) Microplate washing system
- (4) Microplate reader with 450 nm filter
- (5) Timer
- (6) Graduated cylinder
- (7) Flask
- (8) Test tubes or microtitre plate for serum dilutions

**PRECAUTIONS****FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE**

- (i) All human source material used in the preparation of controls has been tested for antibody to human immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1 & 2), hepatitis C (HCV) as well as hepatitis B surface antigen and found to be negative. However no test method can offer complete assurance and all human controls and antigen should be handled as potentially infectious material. The Centers for Disease Control and Prevention and the National Institutes of Health (USA) recommend that potentially infectious agents be handled at Biosafety Level 2.
- (ii) This test should be performed on serum only. The use of whole blood, plasma or other specimen matrix has not been established.
- (iii) Icteric or lipaemic sera, or sera exhibiting haemolysis or microbial growth should not be used.
- (iv) Do not heat-inactivate sera.
- (v) All reagents must be equilibrated to room temperature (20-25°C) before commencing the assay. The assay will be affected by temperature changes. Do not remove microvells from closed bag until they have reached room temperature (20-25°C).
- (vi) Dispense reagents directly from bottles using clean pipette tips. Transferring reagents may result in contamination.
- (vii) Unused microvells should be resealed immediately and stored in the presence of desiccant. Failure to do this may cause erroneous results.
- (viii) Substrate System:
  - (a) As TMB is susceptible to contamination from metal ions, do not allow the substrate system to come into contact with metal surfaces.
  - (b) Avoid prolonged exposure to direct light.
  - (c) Some detergents may interfere with the performance of the TMB.
  - (d) The TMB may have a faint blue colour. This will not affect the activity of the substrate or the results of the assay.

**WARNING**

- (ix) Some kit components contain sodium azide, which may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azide compounds. When disposing of these reagents through plumbing fixtures, flush with a large volume of water to prevent azide build-up in drains.
- (x) Sodium azide inhibits conjugate activity. Clean pipette tips must be used for the conjugate addition so that sodium azide is not carried over from other reagents.

**FOR FURTHER SAFETY INFORMATION PLEASE REFER TO THE MATERIAL SAFETY DATA SHEET (MSDS) AVAILABLE FROM PANBIO.****SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

Blood obtained by venipuncture should be left to clot at room temperature (20-25°C) and then centrifuged according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Approved Standard - Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, H0-A4, 1996).

The serum should be separated as soon as possible and refrigerated (2-8°C) or stored frozen (-20°C or colder) if not tested within two days. Self-defrosting freezers are not recommended for storage. The use of icteric sera or sera exhibiting haemolysis, lipaemia or microbial growth is not recommended. The CLSI provides recommendations for storing blood specimens (Approved Standard - Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H10-A2, 1999).

**TEST PROCEDURE**

**Note:** Ensure all reagents are equilibrated to room temperature (20-25°C) before commencing assay. Performing the assay outside the time and temperature ranges provided may produce invalid results. Assays not falling within the established time and temperature ranges must be repeated.

**Serum Predilution**

- (i) Remove the required number of microvells from the foil sachet and insert into strip holder. Five microvells are required for Negative Control (N), Reactive Control (R) and Calibrator (CAL) in triplicate. Ensure the remaining unused microvells are sealed tightly in the foil sachet.
- (ii) Using suitable test tubes or a microtitre plate, dilute the Negative Control, Reactive Control, Calibrator and patient samples:
  - (a) To 10  $\mu\text{L}$  serum add 1000  $\mu\text{L}$  of serum diluent. Mix well.
  - Alternatively,**
  - (b) To 10  $\mu\text{L}$  serum add 90  $\mu\text{L}$  of serum diluent. Take 20  $\mu\text{L}$  of the diluted serum and add 180  $\mu\text{L}$  serum diluent. Mix well.

**ELISA PROCEDURE**

See attached figure for summary of method.

**(a) Stabilised Antigen Vials**

- (i) Remove the required number of lyophilised antigen vials from the kit. Each vial is sufficient for 2 strips (16 wells). Reconstitute each vial with 1 mL of Antigen Reconstitution Buffer. Mix gently to ensure antigen is dissolved. If the entire reconstituted antigen is not used, it may be stored at -80°C until required. Ensure the remaining unused lyophilised vials remain at 2-8°C.
- (ii) Remove the required volume of reconstituted antigen and mix with an equal volume of MAb Tracer in a clean glass or plastic vial. Gently mix the antigen-MAb Tracer solution and leave at room temperature (20-25°C) until required. Prepare sufficient vials for the total number of wells used in the assay plate i.e. each antigen vial is sufficient for 16 wells (2 strips).

**(b) Assay Plate**

- (i) Within 10 minutes after mixing the MAb Tracer and reconstituted antigen, pipette 100  $\mu\text{L}$  diluted patient sample and controls into their respective microvells.
- (ii) Cover plate and incubate for 60 minutes at 37°C  $\pm$  1°C.
- (iii) Wash six (6) times with diluted wash buffer (refer to washing procedure below).
- (iv) Mix the antigen-MAb tracer solution before transfer. Pipette 100  $\mu\text{L}$  of antigen-MAb complexes from the antigen vial to the appropriate wells of the assay plate.
- (v) Cover plate and incubate for 60 minutes at 37°C  $\pm$  1°C.
- (vi) Wash six (6) times with diluted wash buffer (refer to washing procedure below).
- (vii) Pipette 100  $\mu\text{L}$  TMB into each well.
- (viii) Incubate for 10 minutes at room temperature (20-25°C), timing from the first addition. A blue colour will develop.
- (ix) Pipette 100  $\mu\text{L}$  of stop solution to all wells in the same sequence and timing as the TMB addition. Mix well. The blue colour will change to yellow.
- (x) Within 30 minutes read the absorbance of each well at a wavelength of 450 nm, with a reference filter of 600-650 nm.

**Note:** If a dual wavelength spectrophotometer is available, set the reference filter between 600-650 nm. Reading the microvells at 450 nm without a reference filter may result in higher absorbance values due to background.

**WASHING PROCEDURE**

Efficient washing to remove uncomplexed sample or components is a critical requirement of the ELISA procedure.

**A. Automated Plate Washer**

- (1) Completely aspirate all wells.
- (2) Fill all wells to rim (350  $\mu\text{L}$ ) during wash cycle.
- (3) On completion of six washes, invert plate and tap firmly on absorbent paper towel to ensure all wash buffer is removed.

- (4) Automated plate washers must be well maintained to ensure efficient washing. Manufacturer's cleaning instructions should be followed at all times.

#### B. Manual Washing

- (1) Discard contents of plate in appropriate waste container.
- (2) Fill wells with wash buffer using a suitable squeeze bottle. Avoid bubbling of wash buffer as this may reduce wash efficiency. Discard wash buffer from wells immediately.
- (3) Refill wells with wash buffer and discard immediately.
- (4) Repeat step (3) another four times. This will make a total of six washes with wash buffer.
- (5) After the final wash, discard contents of wells and tap the plate on absorbent paper towel to ensure all wash buffer is removed.

#### QUALITY CONTROL

Each kit contains Calibrator, Reactive and Negative Control sera. Acceptable values for these sera are found on the accompanying specification sheet. The negative and reactive controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The reactive control will not ensure precision at the assay cut-off. The test is invalid and must be repeated if the absorbance readings of either the controls or the calibrator do not meet the specifications. If the test is invalid, patient results cannot be reported.

Quality Control (QC) requirements must be performed in conformance with local, state, and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard QC procedures.

It is recommended that the user refer to CLSI C24-A and 42 CFR 493.1202(c) for guidance on appropriate QC practices.

#### CALCULATIONS

**IMPORTANT NOTE:** The calibration factor is batch specific and detailed in the specification sheet. Obtain the calibration factor value before commencing calculations.

- (1) Calculate the average absorbance of the triplicates of the Calibrator and multiply by the calibration factor. This is the Cut-off Value.
- (2) An index value can be calculated by dividing the sample absorbance by the Cut-off Value (calculated in step (1) above).

#### Alternatively,

- (3) Parbio Units can be calculated by multiplying the index value (calculated in step (2) above) by 10.

$$\text{Index Value} = \frac{\text{Sample Absorbance}}{\text{Cut-off Value}}$$

Example: Sample A Absorbance = 0.949  
Sample B Absorbance = 0.070

Mean absorbance of Calibrator = 0.802  
Calibration Factor = 0.62  
Cut-off Value = 0.802 x 0.62 = 0.497

Sample A (0.949/0.497) = 1.91 Index value  
Sample B (0.070/0.497) = 0.14 Index value

$$\text{Parbio Units} = \text{Index Value} \times 10$$

Sample A 1.91 X 10 = 19.1 Parbio Units  
Sample B 0.14 X 10 = 1.4 Parbio Units

**Diagnosis of Dengue Infection:** The Dengue IgG Capture ELISA determines the level of IgG antibodies to dengue in a patient's serum. A positive result ( $\geq 22$  Parbio Units) is indicative of secondary dengue infection. If differentiation between primary and secondary infection is required, the Dengue Duo (E-DEN010) ELISA should be used.

#### INTERPRETATION OF RESULTS

The Parbio Dengue IgG Capture ELISA determines the elevated level of IgG antibodies to dengue virus in a patient's serum with secondary dengue infection. A positive result ( $\geq 22$  Parbio Units) is indicative of active secondary infection. If differentiation between primary and secondary is required, the Parbio Dengue Duo (E-DEN010) ELISA should be used.

INDEX	PANBIO UNITS	RESULT
$<1.8$	$<18$	Negative
$1.8 - 2.2$	$18 - 22$	Equivocal
$\geq 2.2$	$\geq 22$	Positive

RESULT	INTERPRETATION
Negative	No detectable IgG antibody. The result does not rule out dengue infection. If a secondary dengue virus infection is suspected, repeat another specimen in 4-7 days. Samples with Parbio Units $<18$ can be tested on the Parbio Dengue IgM Capture ELISA (E-DEN01M) to detect primary dengue virus infections.
Equivocal	Equivocal samples should be repeated. Samples that remain equivocal after repeat testing should be repeated by an alternative method or another sample should be collected.
Positive	Presence of detectable IgG antibody. Suggestive of active secondary dengue infection. Other dengue serology assays should be performed to confirm dengue infection.

The following is a recommended way of reporting the results obtained: "The following results were obtained with the Parbio Dengue IgG Capture ELISA. Values obtained with different methods may not be used interchangeably. The magnitude of the measured result above the cut-off value is not indicative of the total amount of antibody present." The result should be reported as positive, negative or equivocal, and not as a numerical value.

#### TEST LIMITATIONS

1. The clinical diagnosis must be interpreted with clinical signs and symptoms of the patient. The results from this kit are not by themselves diagnostic and should be considered in association with other clinical data and patient symptoms.
2. Population seroprevalence may vary over time in different geographical regions. Consequently, the cut-off may require adjustment based on local studies.
3. Screening of the general population should not be performed. The positive predictive value depends on the likelihood of the virus being present. Testing should only be performed on patients with clinical symptoms or when exposure is suspected.
4. Serological cross-reactivity across the flavivirus group is common (i.e. between dengue 1, 2, 3 & 4, Japanese encephalitis, Murray Valley encephalitis, St. Louis encephalitis, West Nile, and yellow fever viruses). These diseases must be excluded before confirmation of diagnosis. In clinical trials with the Parbio IgG Capture ELISA we have observed cross-reactivity at the IgG level, similar to the observations by other groups<sup>(1),(2)</sup>.
5. Heterophilic antibodies are a well-recognized cause of interference in immunoassays<sup>(3)</sup>. These antibodies to animal IgG may cross-react with reagent antibodies and generate a false positive signal. This must be excluded before confirmation of diagnosis.
6. The performance characteristics have not been established for visual result determination.
7. This assay employs insect-expressed proteins. The cross-reactivity or interference of human anti-insect antibodies is unknown with the assay's results.
8. All sera demonstrating a positive result by the Parbio Dengue IgG Capture ELISA test must be referred to a reference laboratory for confirmation and epidemiological recording.

#### EXPECTED VALUES

Secondary infection is characterized by high levels of specific IgG 1-2 days after the onset of infection and in the majority of cases is accompanied by elevation of IgM.

In some secondary infections detectable levels of IgG antibodies may be low. Some patients may not produce detectable levels of antibody within the first seven to ten days after infection. Where symptoms persist, we recommend that patients be re-tested 4-7 days after the first specimen.