



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO
DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE EM PACIENTES COM
SÍNDROME FEBRIL AGUDA**

JAQUELINE SILVA CRUZ

Salvador – Bahia – Brasil

2014

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO
DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE EM PACIENTES COM
SÍNDROME FEBRIL AGUDA**

JAQUELINE SILVA CRUZ

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Souza Ribeiro

Dissertação apresentada ao de Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Brasil

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Cruz, Jaqueline Silva

C957a Avaliação de testes diagnósticos para a identificação da infecção pelo vírus da dengue em pacientes com síndrome febril aguda. / Jaqueline Silva Cruz. - 2014. 68f. : il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Souza Ribeiro, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. Dengue. 2. Diagnóstico. 3. Sensibilidade. 4. PCR. 5. ELISA. I. Título.

CDU 616.91

“AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS
DA DENGUE EM PACIENTES COM SÍNDROME FEBRIL AGUDA”

JAQUELINE SILVA CRUZ

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Professor Titular
UFBA



Dr. Juarez Pereira Dias
Epidemiologista
SESAB



Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos meus pais, Marise e José Carlos, aos meus irmãos e a minha família por tudo que fizeram, e ainda fazem por mim, pela dedicação, confiança, amor, motivação e alegria que em mim depositaram. Por serem minha fonte de energia, apoio e equilíbrio. Sem vocês certamente não teria motivação e forças para chegar até aqui.

Amo muito todos vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ser a minha fonte inesgotável de força e esperança.

A meus pais, Marise e José Carlos, meus alicerces e fonte de inspiração, que desde cedo me ensinaram que sem luta não há vitória.

Aos meus irmãos, Adriano e João Victor, pelo amor incondicional.

Aos meus familiares, por entenderem a minha ausência em muitos momentos, em especial a minha avó Isabel e meu avô Orlando (*in memória*).

Ao meu orientador, Guilherme Ribeiro, pela oportunidade, por sua paciência e incentivo, além de suas informações valiosas, que muito me acrescentam como profissional.

Aos amigos do Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB), em especial a Monique Cavalcante e Nivison Júnior, pela grande e especial amizade, cumplicidade, cuidado, carinho, apoio em todos os momentos nesses seis anos de convivência.

Aos amigos da “equipe de dengue” Igor Paplosk, Mariana Kikuti e Moreno Rodrigues, pelo apoio e orientação, Monaise Madalena, Perla Santana e Érica Nascimento.

As amigas Aline Tavares e Manuela Costa pelo apoio, amizade, convívio, palavras de conforto e respeito.

À minha amiga Carmozita Duarte, por todos esses anos de convivência, pelo imenso apoio, incentivo e carinho.

Ao CPqGM, a Biblioteca e aos amigos do LPBM, Jailton Azevedo, Alcinéia Damião, Silvana Souza Paz, Theomira Carmo e todos que não estão escritos aqui mais estão presentes em meu coração.

Ao Dr. Albert Ko, pela oportunidade e ensinamentos.

A Dr. Mitermayer Reis e Eliana Reis por todo o apoio, carinho, orientação e principalmente, por acreditarem em mim.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

(Martin Luther King)

CRUZ, Jaqueline Silva. Avaliação de testes diagnósticos para a identificação da infecção pelo vírus da dengue em pacientes com síndrome febril aguda. 67 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

A dengue é atualmente um dos principais problemas de saúde pública do mundo e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é a doença que mais acomete o homem na atualidade. Sua incidência vem aumentando e estima-se que 50-100 milhões de pessoas desenvolvam a doença a cada ano no mundo. O diagnóstico laboratorial da dengue é realizado por diferentes tipos de testes, entre eles estão o isolamento viral, o RT-PCR, e a detecção por ELISA ou por meio de testes rápidos do antígeno viral NS1 e de anticorpos IgM específicos contra o vírus. A fim de contribuir para um melhor entendimento sobre a validade destes testes em diferentes circunstâncias, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a validade dos diferentes métodos laboratoriais no diagnóstico da dengue. A sensibilidade dos testes diagnósticos, ELISA IgM, ELISA NS1 e RT-PCR, foi avaliada de forma individual e de forma combinada utilizando amostras de soro de 623 pacientes incluídos em um estudo prospectivo de vigilância de base populacional entre fevereiro e julho de 2010. A sensibilidade destes testes também foi avaliada de acordo com a duração dos sintomas, com o tipo de infecção (primária vs secundária) e, por sorotipo infectante. A especificidade de cada método foi avaliada em um grupo de amostras de pacientes com diagnóstico laboratorial de leptospirose, hepatite, doadores de sangue e indivíduos sadios. Os resultados encontrados mostraram que 240 (38%) dos pacientes com doença febril aguda apresentaram dengue no período do estudo sendo que 194 (81%) dos pacientes com dengue representavam pacientes com infecções secundárias, o sorotipo predominante foi o DENV-2 (70%). As sensibilidades do RT-PCR, do ELISA NS1 e do ELISA IgM na amostra de fase aguda foram de 83,3%, 31,7% e 30%, respectivamente. O uso combinado do teste RT-PCR e do teste ELISA IgM em uma amostra de fase convalescente foi capaz de identificar 100% dos casos confirmados de dengue. As especificidades encontradas variaram de 97% a 100% para o ELISA NS1 e de 55% a 85% para o ELISA IgM. Os resultados indicam que na fase aguda da doença o RT-PCR é mais sensível a detecção de anticorpos IgM e do antígeno NS1 por ELISA, entretanto, o uso de métodos diagnósticos adicionais pode ser necessário em pacientes com uma suspeita da doença e resultado negativo do RT-PCR.

Palavras-chaves: Diagnóstico, Dengue, Sensibilidade, Especificidade, RT-PCR, ELISA IgM e ELISA NS1.

CRUZ, Jaqueline Silva. Diagnostic assessment tests for the identification of dengue virus infection in patients with acute febrile illness. 67 f. il. Dissertation (Master) - Oswaldo Cruz Foundation Research Center Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Dengue is currently one of the main problems of public health and the world according to the World Health Organization (WHO) is the disease that affects more men today. Its incidence is increasing and it is estimated 50-100 million people develop the disease each year worldwide. Laboratory diagnosis of dengue is done by testing different types, which include viral isolation, RT-PCR, and detection by ELISA or by rapid viral tests NS1 antigen and specific IgM antibodies against the virus. In order to contribute to a better understanding of the validity of these tests in different circumstances, the aim of this study was to evaluate the validity of different laboratory methods for diagnosis of dengue. The sensitivity of diagnostic tests, IgM ELISA, ELISA NS1 and RT-PCR was evaluated individually and in combination form using serum samples from 623 patients enrolled in a prospective population-based study of surveillance between February and July 2010. The sensitivity of these tests was also evaluated according to the duration of symptoms of infection with the type (primary versus secondary), and the infecting serotype. The specificity of each method was evaluated in a group of samples from patients with laboratory diagnosis of leptospirosis, hepatitis, blood donors and healthy individuals. The results showed that 240 (38%) of patients with acute febrile disease had dengue during the study period of which 194 (81%) of patients with dengue represented patients with secondary infections, the predominant serotype was DENV-2 (70%). The sensitivity of the RT-PCR of NS1 and IgM ELISA ELISA in the acute phase of the sample were 83.3%, 31.7% and 30%, respectively. The combined use of RT-PCR and ELISA IgM in a sample convalescent phase was able to identify 100% of confirmed cases of dengue fever. The specificities found varied from 97% to 100% for ELISA NS1 and 55% to 85% for the IgM ELISA. The results indicate that the acute phase of the disease the RT-PCR is more sensitive detection of IgM antibodies and NS1 antigen by ELISA, however, the use of additional diagnostic methods may be necessary in patients with a suspicion of disease and negative outcome of RT-PCR.

Keywords: Diagnosis, Dengue, Sensitivity, Specificity, RT-PCR, ELISA IgM and ELISANS1.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Mapa dos países em risco de desenvolver Dengue no ano de 2010	24
Figura 2	Resposta imunológica para a infecção da dengue	27
Figura 3	Curso da infecção de acordo com os dias de sintomas da doença	28
Figura 4	Localização da Unidade de Emergência de São Marcos dentro da área de estudo.....	40
Figura 5	Fluxograma descrevendo a identificação e inclusão de participantes no período do estudo.....	46
Figura 6	Sensibilidade dos testes diagnósticos para a dengue por dias de sintomas da doença	51

TABELAS

Tabela 1	Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo (N=623), estratificado pelo status de confirmação.....	47
Tabela 2	Sensibilidade individual dos diferentes tipos diagnóstico da dengue.....	48
Tabela 3	Sensibilidade do uso combinado dos diferentes tipos de diagnóstico da dengue	49
Tabela 4	Sensibilidade dos testes diagnósticos em pacientes com infecção primária e secundária pelo vírus da dengue.....	49
Tabela 5	Sensibilidade de diferentes testes diagnósticos para a dengue de acordo com o sorotipo infectante.....	52
Tabela 6	Especificidade dos testes de ELISA no diagnóstico da dengue	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
DENV	Vírus da dengue
DENV1	Vírus da dengue sorotipo 1
DENV2	Vírus da dengue sorotipo 2
DENV3	Vírus da dengue sorotipo 3
DENV4	Vírus da dengue sorotipo 4
DFA	Doença Febril Aguda
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FC	Fixação de Complemento
FDH	Febre hemorrágica da dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IH	Teste de Inibição de Hemaglutinação
MS	Ministério da Saúde
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2	Proteína não-estrutural 2
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4	Proteína não-estrutural 4
NS5	Proteína não-estrutural 5
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana em Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNDC	Programa Nacional de Controle da Febre Amarela e Dengue
PRNT	Teste de Neutralização por Redução em Placas
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa

SUCAM	Superintendência de Campanhas da Saúde Pública
TDR	Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
TMB	Tetrametilbenzidina
UESM	Unidade de Emergência de São Marcos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS DA DENGUE.....	18
2.2	VETOR.....	19
2.3	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.4	ASPETOS CLÍNICOS E PATOGÊNESE (CLASSIFICAÇÕES).....	25
2.5	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	27
2.5.1	Isolamento Viral.....	28
2.5.2	RT-PCR.....	29
2.5.3	Real Time RT-PCR.....	30
2.5.4	Teste de Inibição de Hemaglutinação (IH).....	31
2.5.5	Teste de Fixação de Complemento (FC).....	31
2.5.6	Teste de Neutralização por Redução em Placas (PRNT).....	32
2.5.7	ELISA.....	32
2.5.8	Testes Rápidos.....	34
2.6	Confirmação laboratorial de caso de dengue.....	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	GERAL.....	37
3.2	ESPECÍFICOS.....	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO.....	38
4.2	SELEÇÃO DE PARTICIPANTES.....	39
4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	41

4.4.	DEFINIÇÃO LABORATORIAL DE CASO DE DENGUE.....	42
4.5.	ASPECTOS ÉTICOS	42
4.6.	RECURSOS NECESSÁRIOS E DISPONÍVEIS.....	42
4.7.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
5.	RESULTADOS	45
6.	DISCUSSÃO	54
7.	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

A dengue é considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e a mais importante arbovirose que afeta o homem na atualidade (WHO, 2009). Os programas de controle e prevenção da doença baseados na eliminação de focos (criadouros) para a reprodução do vetor, bem como na eliminação do vetor adulto tem fracassado no Brasil e em outros países (LIMA et al., 2010). Como ainda não existem vacinas nem drogas antivirais específicas, a principal estratégia de prevenção das complicações causadas pela dengue tem sido relacionada à detecção precoce da doença para seu adequado manejo clínico (BRASIL, 2008).

Com a disseminação da dengue pelo mundo, a demanda por testes diagnósticos sensíveis, específicos e de fácil execução é de fundamental importância para o auxílio na rotina da prática clínica, para as ações de vigilância controle, que permitam atuar preventivamente na expansão de surtos e epidemias. Entretanto, nenhum dos testes existentes para o diagnóstico da dengue apresenta uma performance excelente, o que faz com que a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e o Ministério da Saúde do Brasil (MS) recomendem o uso de diferentes testes laboratoriais como critério para o diagnóstico da dengue.

Algumas das características que tornam o diagnóstico laboratorial da dengue difícil incluem o curto período de viremia, a possibilidade de resposta imune cruzada com outros flavivirus, e o curto período de incubação da doença, que faz com que anticorpos específicos contra o vírus da dengue só sejam identificáveis tardiamente no curso da doença. A forma clássica da doença apresenta sintomatologia que se caracteriza por manifestações inespecíficas, podendo ser confundida com uma série de outras doenças febris, o que ocasiona sub-registro de casos e uma subestimação da magnitude da ocorrência da doença. Além disso, mesmo pacientes que procuram atendimento médico no início dos sintomas e são suspeitados de dengue, frequentemente não são testados para dengue ou porque os exames sorológicos mais acessíveis e mais utilizado para o

diagnóstico da dengue só pode ser feito a partir do sexto dia de sintomas da doença, como recomendado pelo MS (CLARK, 1995; RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

No Brasil, poucos estudos foram conduzidos para avaliar o desempenho individual e em conjunto destes testes diagnósticos na identificação de dengue em pacientes com doença febril aguda (DFAs). Além disso, a escolha por um dos diferentes testes diagnósticos deve ser baseada na duração dos sintomas no momento da coleta da amostra de sangue e nas condições laboratoriais fornecidas pelos serviços de saúde para que os métodos escolhidos sejam apropriados para a realidade em que serão utilizados. Diante da situação epidemiológica da dengue no país, com a co-circulação de quatro sorotipos e ocorrência de sucessivas epidemias, o diagnóstico precoce se torna de grande importância. Assim, são necessários estudos que avaliem a sensibilidade destes testes usado isoladamente ou em conjunto, para determinar quais as melhores abordagens diagnósticas na identificação da dengue em pacientes que se apresentam em uma unidade de saúde pública com doença febril aguda.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS DA DENGUE

O vírus da dengue (DENV) é o menor vírus de RNA envelopado conhecido, sendo membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*. Historicamente, esta família recebeu esse nome em referência ao vírus da febre amarela, que faz parte da mesma família e gênero e cujo nome em latim “flavus” que significa “amarelo”. Esta família contém mais de 70 espécies de vírus, na sua maioria patogênicos ao homem, causando doenças que variam desde febre, encefalites até febres hemorrágicas (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004).

O vírus da dengue pode ser distinguido em quatro sorotipos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 e em cada sorotipo existem genótipos diferentes (WHO, 1997). Os diferentes sorotipos do vírus da dengue são sorologicamente relacionados, mas antigenicamente distintos. As infecções pelo vírus da dengue conferem uma imunidade homóloga permanente e heteróloga transitória por dois ou três meses. Como consequência a imunidade de longo prazo após uma infecção pelo vírus é sorotipo específica (CORDEIRO et al., 2009; WHO, 2009).

A estrutura do vírus da dengue é relativamente simples. As partículas virais são esféricas. O genoma é constituído por RNA de fita simples, com aproximadamente 11 kilobases (KDa). Esse genoma codifica as proteínas estruturais, C (proteína do capsídeo), M (proteína associada à membrana) e E (proteína associada ao envelope). A proteína E é considerada a principal proteína estrutural e está diretamente relacionada com a imunidade e provável virulência do vírus. O RNA viral ainda codifica sete outras proteínas não estruturais que são sintetizadas durante o processo de infecção celular. Tais proteínas são denominadas de NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH; RICE, 2003; FAHEEM et al., 2011). Nas extremidades 5' e 3' do código genético existem regiões não codificadoras, com seqüências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam o

processo de amplificação genômica, tradução e empacotamento viral (BURKE; MONATH, 2001).

Segundo FLAMAND et al. (1999) há duas formas de expressão da proteína NS1 pelas células infectadas: a primeira é a expressão associada à membrana celular e a segunda, é a secreção da primeira que pode ativar os fatores do sistema complemento, sugerindo algum papel na progressão da doença (KUROSU et al., 2007). Alguns estudos conduzidos por LIBRATY et al. (2002) e YOUNG et al. (2000) além de avaliarem a detecção de NS1 como ferramenta para o diagnóstico da dengue, identificou uma correlação entre a gravidade da doença e a quantidade desse antígeno no soro.

A proteína NS2A atua muito provavelmente na montagem viral e replicação do RNA. Já a NS2B, está associada à membrana e ambas formam um complexo estável com a proteína NS3. Sua função é fundamental para o processamento da poliproteína viral, agindo como helicase e protease e para a replicação do RNA (HARRIS et al., 2006). A função da proteína NS4A ainda não é muito conhecida, entretanto, tem sido relacionada à reorganização das membranas intercelulares (MILLER et al., 2007). A proteína NS4B está relacionada à replicação viral bloqueando a transdução de sinal mediada pelo interferon, sugerindo importância na patogênese da doença (MUNOZ-JORDAN et al., 2003). A proteína NS5 é a proteína mais altamente conservada entre os sorotipos do vírus da dengue, caracterizada por atividades de metiltransferases e RNA polimerase (MEDIN; FITZGERALD; ROTHMAN, 2005). Na região 3' encontra-se associada a maioria das proteínas não estruturais não traduzida dos genoma, formando um complexo de síntese de RNA (FINK; GU; VASUDEVAN, 2006).

2.2. VETOR

A dengue é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo a espécie *Aedes aegypti* o principal vetor associado à transmissão urbana da doença e de maior importância epidemiológica no Brasil. No entanto, outras espécies do mesmo gênero, como o *Aedes albopictus*, e muito raramente o *Aedes scutellaris* e o *Aedes polyniensis*, também podem ser vetores de transmissão do vírus da dengue, principalmente na Ásia

e na Oceania. O *A. aegypti* é uma espécie de mosquito hematófago de origem africana que se adaptou e se domesticou ao ambiente urbano. Acredita-se que o *A. aegypti* foi trazido ao continente americano pelos navios negreiros na época da colonização, no século XVI (BRASIL, 2008). O *A. aegypti* é também o vetor da febre amarela urbana (SALUD; BUREAU; STAFF, 1995; CDC, 2012)

O *A. aegypti* está distribuído principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde fatores climáticos como chuva, umidade e temperatura propiciam condições para sua sobrevivência. Contudo, a expansão e manutenção da circulação, tanto do vírus quanto do vetor da dengue, dependem da combinação de vários fatores estruturais e conjunturais como uma inadequada infra-estrutura básica urbana, como por exemplo, falta de estrutura de fornecimento de água, esgoto ou coleta de lixo, favorecendo assim a proliferação do vetor, parcialmente ocasionada pela migração rural-urbana nas últimas décadas e por ações de políticas públicas deficientes (TAUIL, 2001; FARRAR et al., 2007). Devido à adaptação às habitações humanas, o *A. aegypti* passou a ser um mosquito de hábitos domésticos e predominantemente antropofílico. Sua convivência com o homem é favorecida pela utilização de depósitos artificiais de água, onde encontra as condições necessárias para sua reprodução e o desenvolvimento de suas formas imaturas (RIGAU-PÉREZ et al., 1998; TAUIL, 2001; FORATTINI, 2002).

O *A. aegypti* possui hábitos diurnos, com preferência de repasto pelas primeiras horas da manhã e ao entardecer. Os mosquitos adultos machos e fêmeas se alimentam de néctar de plantas; no entanto a doença é transmitida ao homem através da picada de mosquitos fêmeas grávidas, que praticam hematofagia, necessitando de sangue humano para o desenvolvimento dos ovos (ROZENDAAL, 1997). As fêmeas realizam oviposição, de preferência, em água limpa e em lugares artificiais ou naturais, como recipientes para armazenamento de água, vaso de flores e plantas, pneus, baldes, dentre outros, favorecendo condições para proliferação do mosquito dentro ou nas proximidades de habitações (CDC, 2012).

2.3. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

Os primeiros registros clínicos de uma síndrome similar a da dengue são datados do ano de 992, em uma enciclopédia chinesa publicada durante a dinastia Chin (KYLE; HARRIS, 2008) e epidemias de uma doença até então desconhecida, com manifestações clínicas semelhantes foram descritas na Indonésia, Egito e EUA no final do século XVIII. No século seguinte, quatro grandes epidemias assolaram o Caribe e o sul dos Estados Unidos (GUBLER, 2006). Segundo PINHEIRO; CORBER (1997), epidemias de dengue iniciaram no sudoeste asiático durante e após a Segunda Guerra Mundial, nas décadas de 1940 e 1950, se expandindo para o resto do mundo.

Nas Américas, entre os anos 1844-1849, um quadro clínico semelhante à dengue foi relatado em diversos países, inclusive no Brasil (DE SOUZA, 2008). Já na década de 1950, o DENV-2 foi isolado pela primeira vez na ilha de Trinidad e somente após a década de 60 houve a intensificação da transmissão do vírus da dengue nas Américas. A partir de 1963, houve confirmação laboratorialmente do sorotipo 3 na Venezuela. Em 1977, o sorotipo 1 foi introduzido nas Américas, inicialmente pela Jamaica e a partir daí, países da América do Sul livres da dengue foram acometidos por epidemias causadas por este sorotipo. Foi então que, a partir de 1980, houve aumento das epidemias pelo continente. Um surto ocorrido em Cuba no ano de 1981, relacionado à presença do sorotipo 2, foi responsável pelo primeiro caso de febre hemorrágica da dengue ocorrida fora do continente asiático. Foi também neste mesmo ano que ocorreu a introdução do sorotipo 4, causando grandes epidemias no Caribe, México e na América do Sul (SALUD; BUREAU; STAFF, 1995; SAN MARTIN et al., 2010; CDC, 2011; 2012).

No Brasil, os primeiros relatos da ocorrência de surtos de dengue ocorreram em 1846 acometendo os estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Bahia e outras cidades (PEDRO, 1923). No fim da primeira metade do século XX, devido à grande epidemia de febre amarela vivida no Rio de Janeiro, campanhas para a erradicação do mosquito coordenadas por Oswaldo Cruz, pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) e pelo Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) foram

lançadas pelo governo brasileiro e, em 1955, o *A. aegypti* foi considerado erradicado do Brasil, que recebeu certificação internacional de país livre do *A. aegypti*.

A erradicação do *Aedes* durou cerca de vinte anos (FRANCO, 1976; M. G. TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999) e, devido a falhas ocorridas na vigilância epidemiológica e a uma urbanização acelerada, o mosquito foi reintroduzido no Brasil a partir de 1976 (BRAGA; VALLE, 2007). A rápida disseminação do mosquito nos anos seguintes fez com que a distribuição geográfica do mosquito fosse similar à verificada antes dos programas de erradicação (SALUD; BUREAU; STAFF, 1995; CDC, 2012).

A reemergência da dengue no Brasil ocorre com a documentação de casos clínicos, com confirmação laboratorial em Boa Vista, Roraima, entre os anos de 1981 e 1982. Estes casos, causados pelos sorotipos 1 e 4 (OSANAI et al., 1983), ficaram restritos a esta região e período, não havendo registros de casos adicionais nos anos que se seguiram. Foi só a partir de 1986 que grandes epidemias, de escala nacional, começaram a ocorrer, inicialmente no Rio de Janeiro, com mais de 33.500 casos notificados e, em algumas capitais nordestinas, com a disseminação do sorotipo 1 para diversas cidades do país (M. G. TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999; E. A. TEIXEIRA, 2005). No ano de 1990, outra grande epidemia ocorreu também no Rio de Janeiro, desta vez, causada pelo sorotipo 2, e se espalhou rapidamente para a região sudeste. Em 1998, a epidemia da dengue adquiriu proporções alarmantes, com o número de casos chegando a 500.000 notificações (TEIXEIRA, 2005).

A confirmação pela primeira vez no Brasil do isolamento do sorotipo 3 ocorreu no final de 2000. Uma epidemia iniciou-se então no Rio de Janeiro no ano de 2001, e disseminou-se por muitos estados, contribuindo para um aumento na incidência da doença em todo país (CAMARA et al., 2007). Esta epidemia alastrou-se nos dois anos seguintes, sendo o sorotipo 3 detectado em inúmeras cidades e estados do Brasil (TEIXEIRA, 2005). No ano de 2002, com aproximadamente 800 mil casos foram notificados, e o Brasil foi responsável por 80% das notificações de dengue do continente americano (PAHO, 2009; SAN MARTIN et al., 2010). A reintrodução do sorotipo 4, que não circulava no país desde o seu registro em Boa Vista, na década de

80, ocorreu em julho de 2010, novamente em Boa Vista, Roraima (TEMPORAO et al., 2011) sendo em pouco tempo detectado em todas as regiões brasileiras.

O surgimento da primeira epidemia de dengue na Bahia ocorreu em fevereiro de 1987 no município de Ipupiara e foi provocada pelo DENV-1. Com a rápida adoção medidas de controle, em 90 dias houve a erradicação do vetor no município e o vírus deixou de circular. Foi então que em 1994, um novo sorotipo, o DENV-2, foi introduzido na Bahia pela cidade de Prado, extremo sul do estado, caracterizando-se pela disseminação rápida do vírus para outros municípios baianos (VASCONCELOS et al., 2000).

O Brasil viveu nos últimos vinte anos, cinco grandes epidemias associadas a um dos sorotipos virais predominantes: em 1998 (sorotipo 1), 2002 (sorotipo 3), 2008 (sorotipo 2), 2010 (sorotipo 1) e 2012 (sorotipo 3) (BRASIL, 2012).

Os casos de FHD notificados até o ano de 2006 atingiam principalmente indivíduos da faixa etária de 20 a 40 anos de idade. A partir de 2007, houve uma mudança na faixa etária nos casos de FHD, onde 53% destes acometeram menores de 15 anos de idade. Esta mudança nos padrões de ocorrência da FHD pode ser explicada, em parte, pela imunidade aos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 na população adulta (SIQUEIRA JR et al., 2005; BARRETO; TEIXEIRA, 2008; ROCHA; TAUIL, 2009; SAN MARTIN et al., 2010; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011).

Segundo o Ministério da Saúde, na última década foram registrados cerca de cinco milhões de casos de dengue no Brasil, um milhão somente no ano de 2010 e 1,5 milhões em 2013.

A reemergência da dengue não foi restrita ao Brasil, a incidência da doença no mundo aumentou cerca de 30 vezes nos últimos cinquenta anos e são estimados 50 milhões de casos anualmente com 250 a 500 mil casos de FHD por ano no mundo. A letalidade da doença em pacientes com manifestações graves variam de 1% a 10% sendo maiores em países onde o manejo clínico de pacientes com sintomas hemorrágicos graves é deficiente (HESSE, 2007; WHO, 2009). Atualmente, mais de

100 países já notificaram a doença, e cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização a cada ano, ocorrendo cerca de 20 mil mortes em consequência da doença por ano (WHO, 2009).

Desde a década de 90, Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, representando o Cone Sul, são responsáveis por mais da metade das notificações da doença no mundo, sendo o Brasil responsável por 60% dos casos do Cone Sul desde 2000 (SAN MARTIN et al., 2010). A figura 1 mostra a distribuição dos países e áreas em risco de desenvolver a dengue retratando a gravidade do cenário epidemiológico atual.

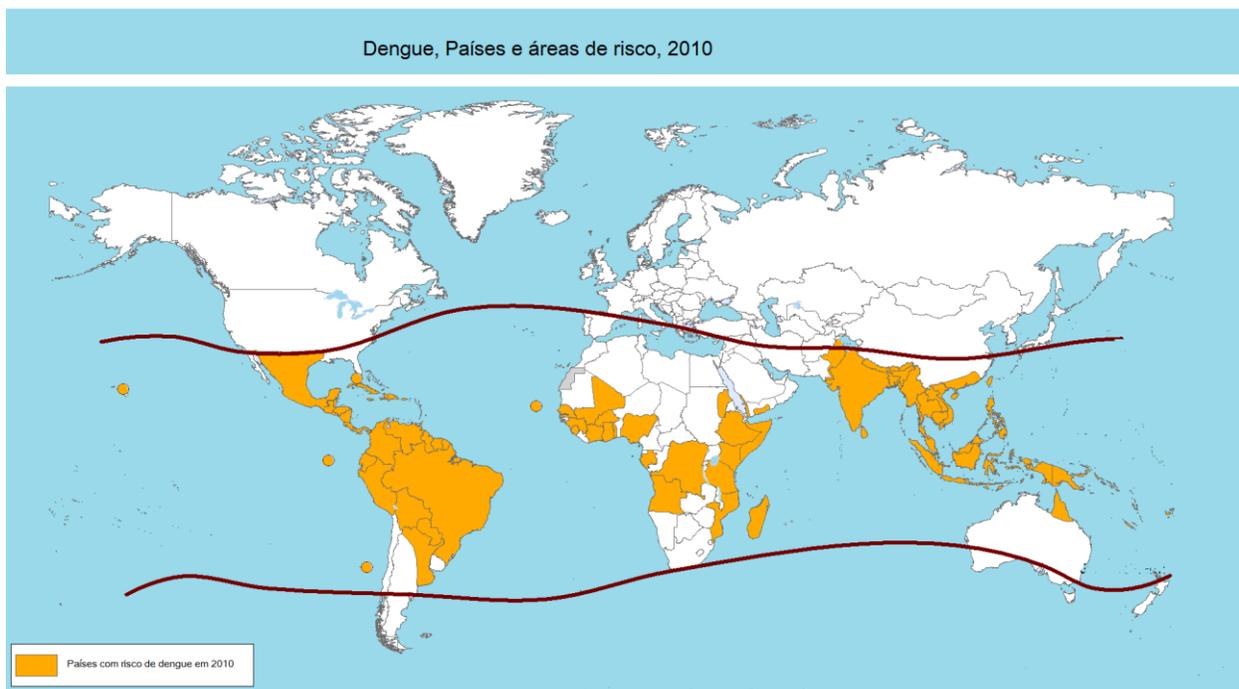


Figura 1: Mapa dos países e áreas em risco de desenvolver Dengue no ano de 2010. Adaptado de: World Health Organization. Map Production: Public Health Information and Geographic Information Systems.

2.4. ASPETOS CLÍNICOS E PATOGÊNESE (CLASSIFICAÇÕES)

A infecção por qualquer um dos sorotipos da dengue pode manifestar-se de forma variável, de quadros leves até graves como a dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue (VAUGHN et al., 2000). A dengue clássica é a forma clínica mais comum da doença e se caracteriza por febre alta de início súbito, cefaléia, mialgia, astenia, prostração, dor retroorbitária, artralgia e exantema. A forma clássica da dengue costuma ser autolimitada, com duração de cerca de 5-7 dias, quando ocorre a defervescência e regressão dos sintomas. O período de defervescência é um período importante para o monitoramento de sinais de alerta, como sangramento, trombocitopenia, ascite, derrame pleural e dores abdominais, pois uma pequena fração dos pacientes pode evoluir para formas graves da doença neste período (WHO, 2009). Já a dengue hemorrágica caracteriza-se por fenômenos hemorrágicos e extravasamento plasmático. Nos casos de síndrome de choque da dengue, ocorre insuficiência circulatória. Esta forma de classificar a dengue de acordo com sua patogênese, pela presença e intensidade de fenômenos de hemorragia e extravasamento de plasma (DEEN et al., 2006), vem sendo substituída em todo o mundo, após a publicação pela OMS, em 2009, de uma nova classificação que tem como base a gravidade das manifestações clínicas e em 2014 o Ministério da Saúde adotou essa nova classificação. De acordo com a nova classificação proposta, os casos podem ser classificados como dengue, dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue grave (DG).

A definição para a DCSA é todo caso de dengue que, no período de defervescência da febre apresenta um ou mais sinais de alarme como dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdomen; vômitos persistentes; acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico); sangramento de mucosas; letargia ou irritabilidade; hipotensão postural (lipotímia); hepatomegalia maior do que 2 cm ou aumento progressivo do hematócrito. A DG é todo caso de dengue que apresenta um ou mais dos seguintes resultados como choque devido ao extravasamento grave de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar

igual ou maior a três segundos, pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mm Hg; hipotensão arterial em fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória e/ou sangramento grave, segundo a avaliação do médico e/ou comprometimento grave de órgãos tais como: dano hepático importante (AST o ALT >1000), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos (BRASIL, 2014).

A infecção por um dos sorotipos induz uma imunidade protetora temporária contra os outros sorotipos. Esta imunidade, também chamada de imunidade heteróloga ou cruzada, desaparece em alguns meses. Entretanto, a imunidade conferida contra o sorotipo causador de uma infecção, imunidade homóloga, é permanente para o sorotipo causador da infecção (TORRES, 1998). Há dois padrões observados nas infecções pela dengue relacionado com a resposta imune adaptativa, indivíduos que não possuem anticorpos prévios ou primo-infectados, o que caracteriza uma infecção primária e, indivíduos que possuem anticorpos prévios, proveniente de infecção anterior por um sorotipo distinto, caracterizando-se assim como uma infecção secundária.

Na infecção primária há um aumento lento e gradativo dos níveis de anticorpos específicos, sendo a imunoglobulina M (IgM) o primeiro a aparecer, podendo ser detectado entre o quinto e o décimo dia após o início dos sintomas, atingindo seu pico máximo após duas semanas. Segundo a Organização Panamericana de Saúde (OPAS), de todos os casos de dengue, 80% tem anticorpos IgM detectáveis cinco dias após o aparecimento da doença, e cerca de 93-99% entre o 6º e o 10º dia, podendo permanecer detectável por 60 a 90 dias (FIGUEIREDO, 1999; GUZMÁN et al., 2006; CDC, 2011). Já os anticorpos da imunoglobulina G (IgG) aparecem no final da primeira semana de doença, sendo detectáveis em níveis baixos, e permanecem detectáveis por anos e possivelmente pelo resto da vida (CHANAMA et al., 2004; SCHILLING et al., 2004; WHO, 2009) (Figura 4).

Na infecção secundária, que acomete um indivíduo que já teve uma infecção prévia por um sorotipo diferente, a concentração dos anticorpos IgG aumenta rapidamente atingindo valores elevados, enquanto a concentração dos anticorpos IgM

umentam em menor escala, alcançando um pico mais baixo que na primo infecção, podendo até não ser detectável ou ser detectável por um período de duração mais curto quando comparada com a infecção primária (SCHILLING et al., 2004; GUBLER et al., 2007). A dinâmica de produção dos anticorpos do tipo IgM e IgG em infecções primárias e secundárias está ilustrada na Figura 2.

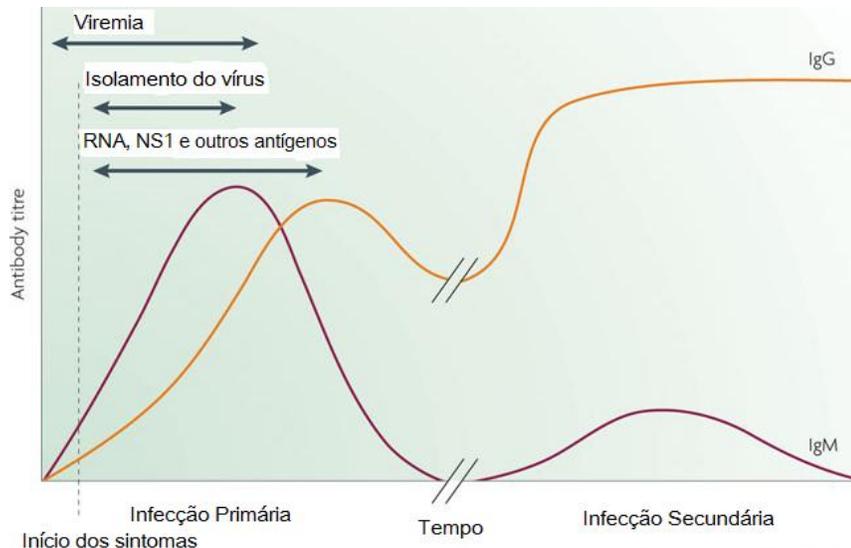


Figura 2: Resposta imunológica para a infecção da dengue. Fonte: Adaptado de PEELING et al. (2010).

2.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico da dengue é difícil de ser realizado quando baseado apenas em aspectos clínicos devido à apresentação semelhante a outras infecções febris agudas como leptospirose, rubéola, malária, sarampo e outras arboviroses. Após o início dos sintomas, o vírus pode ser detectado no soro, plasma, células circulantes no sangue e outros tecidos por 4-5 dias (WHO, 2009). Para a detecção do vírus da dengue, técnicas como o isolamento viral e RT-PCR e a detecção da proteína não estrutural 1 (NS1) por ELISA ou testes rápidos de imunocromatografia são utilizadas. Testes sorológicos que buscam evidências indiretas da ocorrência da infecção também tem sido usado no diagnóstico da dengue. Entre eles, podemos citar os testes de inibição da hemaglutinação, de fixação do complemento, de redução da neutralização em placas

(PRNT), os ensaios imuno-enzimáticos (MAC-ELISA) (GUBLER, 1998) e os testes rápidos. Atualmente, no Brasil, o diagnóstico da dengue é realizado, sobretudo, por sorologia, usando ensaios imuno-enzimáticos (ELISA). O ELISA é a técnica usualmente utilizada, tanto para a detecção do antígeno NS1 quanto para a detecção de anticorpos IgM e IgG. Apesar da facilidade de execução, elas não identificam o sorotipo viral responsável pela infecção (DE PAULA; FONSECA, 2004) (Figura 3).

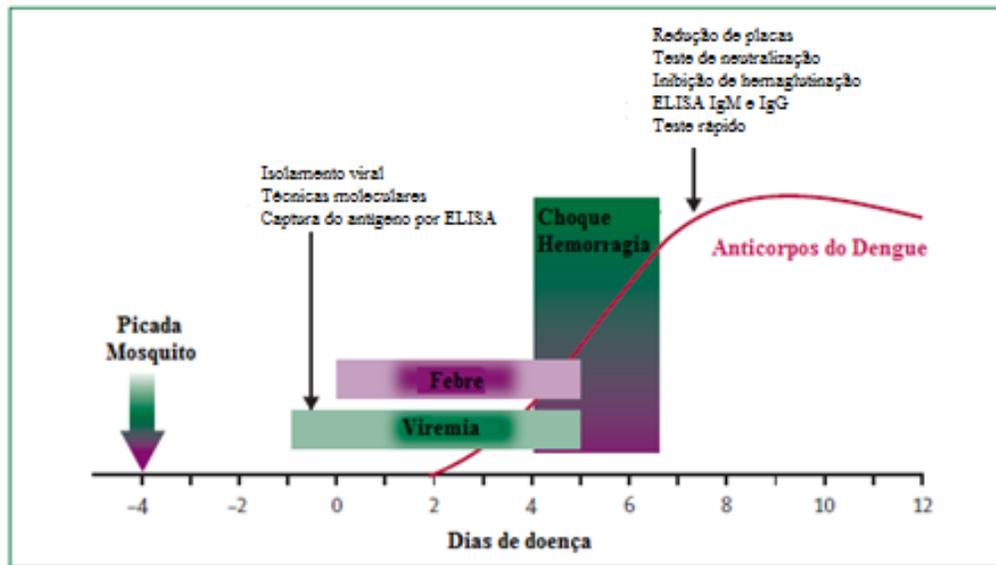


Figura 3: Curso da infecção de acordo com os dias de sintomas da doença. Adaptado de Halsted, 2007.

A seguir, são apresentados detalhes sobre a execução de cada um dos testes diagnósticos mencionados.

2.5.1. ISOLAMENTO VIRAL

O isolamento viral deve ser feito com amostras coletadas no período da viremia, ou seja, até cinco dias após o aparecimento de sintomas da doença. A cultura celular é o método mais amplamente utilizado para o isolamento do vírus da dengue, sendo as linhagens de clones de *Aedes albopictus* C6/36 e *Aedes pseudoscutellaris* AP61, de escolha para isolamento de rotina. Culturas de células de mamíferos, como Vero, LLCMK2 e BHK21 também podem ser utilizadas para o isolamento, porém são menos eficientes (WHO, 2009).

O período de incubação da cultura é de cerca de uma semana e o vírus pode ser detectado por técnicas sorológicas, como a imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais sorotipo-específicos (mAbs) ou por técnicas moleculares (RIGAU-PEREZ et al., 1998).

O isolamento viral tem como vantagens a alta sensibilidade, o potencial de identificação do sorotipo viral e a caracterização molecular das amostras. Estudos tem demonstrado que os vírus da dengue, isolados de pacientes duranteas grandes epidemias ocorridas no Rio de Janeiro e nos demais estados do Brasil, pertencem a apenas um genótipo de cada sorotipo: DENV-1 (subtipo I), DENV-2 (subtipoII) e DENV-3 (subtipo III) (NOGUEIRA; MIAGOSTOVICH; SCHATZMAYR, 2000). Entre as desvantagens da técnica, incluem-se a necessidade de amostras de sangue coletadas precocemente no curso da doença, o tempo de incubação da cultura que impede um diagnóstico terapêutico oportuno e a não diferenciação entre infecções primárias e secundárias (PEELING et al., 2010). Além disso, requer uma infra-estrutura laboratorial especializada para realização de cultura viral.

2.5.2. RT-PCR

As técnicas moleculares têm importante papel no diagnóstico da dengue por permitir a rápida identificação do vírus na fase aguda da doença, por fornecer informação sobre o sorotipo viral e por quantificar a carga viral, em algumas metodologias. Os ensaios para detecção de ácidos nucleicos consistem em três etapas básicas, a extração e purificação do RNA viral, a amplificação do RNA e a detecção e caracterização do produto amplificado quanto ao sorotipo (WHO, 2009).

A técnica molecular mais utilizada é a reação em cadeia da polimerase convencional com transcrição reversa (RT-PCR), que se baseia na amplificação de fragmentos genômicos específicos de RNA delimitados por primers. Tem como vantagens a rapidez, a alta sensibilidade e elevada especificidade (GUZMAN; KOURI, 1996). Quando comparada ao isolamento viral, demonstra uma sensibilidade que varia

entre 93% a 100% para os quatro sorotipos (LANCIOTTI et al., 1992). Como desvantagens, estão as múltiplas etapas necessárias para realização do teste e a possibilidade de contaminação cruzada entre amostras, principalmente pelo produto da amplificação de outras amostras, gerando resultados falso-positivos (WHO, 2009). Entretanto, contaminação é uma ocorrência rara quando protocolos para execução do RT-PCR são rigorosamente seguidos.

2.5.3. REAL TIME RT-PCR

A realização deste ensaio é feita em uma única etapa, onde utilizam-se iniciadores e sondas fluorescentes específicas para cada sorotipo do vírus (WHO, 2009). O princípio do ensaio se baseia na amplificação de fragmentos genômicos, onde a detecção do produto é realizada diretamente na plataforma de instrumentação, utilizando-se marcadores fluorescentes e métodos sensíveis de mensuração da fluorescência emitida. Podem-se utilizar dois tipos de fluoróforos. O TaqMan que é altamente específico por sua hibridização específica da seqüência de sonda, ou o SYBR Green que tem como principais vantagens na sua utilização a simplicidade no desenho dos marcadores e o uso de protocolos universais de RT-PCR já conhecidos. Como desvantagem o SYBR Green é menos específico que o TaqMan (WHO, 2009).

As principais vantagens do RT-PCR em tempo real são a redução do tempo para realização do teste, o baixo risco de contaminação com o produto amplificado e a quantificação da carga viral por comparação com uma curva padrão. Sua principal desvantagem é o custo elevado (NIESTERS, 2002). A RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) possui uma sensibilidade maior que o isolamento viral e a RT-PCR convencional e equivalente ao *nested* RT-PCR convencional (POERSCH et al., 2005).

2.5.4. TESTE DE INIBIÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (IH)

O teste de IH foi considerado o método sorológico padrão durante muitos anos por sua alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e execução relativamente fácil. O teste tornou-se uma ferramenta útil em inquéritos epidemiológicos e na diferenciação das infecções primárias e secundárias, baseados nos títulos de IH, uma vez que os anticorpos IH persistem por um longo período de tempo. O princípio do teste consiste na capacidade dos anticorpos específicos para a dengue, presentes na amostra de soro, inibirem a aglutinação dos eritrócitos (DE PAULA; FONSECA, 2004). No caso da infecção primária, os anticorpos inibidores da hemaglutinação podem a partir do quinto dia após o início da febre e em casos de infecção secundária, altos títulos de anticorpos IH podem ser precocemente detectados, entre dois e três dias após o início da febre (CLARKE; CASALS, 1958). Segundo KAO et al. (2005), o teste apresenta desvantagens, como a necessidade de um pré-tratamento das amostras para remover inibidores específicos de IH e aglutininas não específicas, a pouca especificidade por conta da reação cruzada, a necessidade de amostras pareadas e a dificuldade em identificar o sorotipo viral infectante em infecções secundárias.

2.5.5. TESTE DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO (FC)

O teste de fixação de complemento baseia-se no princípio de que o complemento será consumido durante a reação antígeno-anticorpo. Esses anticorpos detectados são muito específicos na infecção primária contribuindo para a determinação do sorotipo. Este teste tem o uso limitado em inquéritos epidemiológicos, pois os anticorpos permanecem por um curto período. Tem pouca aplicação na clínica e não é utilizada na rotina pela sua difícil execução, pouca praticidade e baixa sensibilidade (GUBLER, 1998).

2.5.6. TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO EM PLACAS (PRNT)

É o teste mais específico para os *flavivirus* e é sorotipo específico para os quatro tipos do vírus da dengue. O princípio do teste se baseia na interação entre o vírus e o anticorpo, resultando na inativação do vírus, através dos anticorpos neutralizantes, de tal maneira que ele não infecta mais, tão pouco replica-se em células alvo. Os títulos de anticorpos neutralizantes no soro do paciente são medidos e se determina o nível de anticorpos protetores (CDC, 2012). Quanto maior for a presença de anticorpo soro específico, maior é a capacidade de neutralização e menor é a infecção do vírus na célula (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). As principais desvantagens desta técnica são a diferença de interpretação de resultados, o alto custo, a complexidade da técnica, o longo tempo de realização e a sua difícil aplicação na diferenciação de infecções secundárias e terciárias (CASTRO-JORGE et al., 2010).

2.5.7. ELISA

Deteção de anticorpos anti-dengue

Dentre os testes sorológicos, o ELISA tornou-se uma ferramenta importante para o diagnóstico de rotina da dengue (CDC, 2012), sendo considerado o procedimento sorológico mais útil para detecção de anticorpos IgM e amplamente empregado para confirmação de infecções recentes pelo vírus da dengue (WANG et al., 2002). Entre os mais utilizados estão o ELISA indireto onde a placa é sensibilizada com antígeno viral e o ELISA de captura de anticorpos (IgM ou IgG) onde a placa é sensibilizada com anti-imunoglobulina específica (KAO et al., 2005). Dentre os ELISA de captura, o MAC-ELISA ("IgM Antibody Capture-ELISA") vem substituindo outras técnicas de análise para a determinação de IgM devido a sua alta sensibilidade, especificidade, potencial de automatização, facilidade da técnica e capacidade de realização em um grande número de amostras simultaneamente (BRASIL, 2010).

Os anticorpos IgM podem ser detectados ainda na fase aguda da doença, desde que a amostra de sangue seja coletada após 5-7 dias do início dos sintomas, e também

na fase de convalescência. O princípio do teste consiste na detecção específica de IgM anti-dengue no soro através de sua captura por anticorpos anti-IgM humano (BRASIL, 2010).

Brevemente, o MAC-ELISA pode ser descrito da seguinte forma: em uma placa de microaglutinação recoberta por anti-IgM, os anticorpos IgM do soro do paciente, quando presentes, se ligarão aos anticorpos anti-IgM da cavidade da placa. Após lavagem da placa para remoção do soro residual, são adicionados antígenos específicos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) ligados a anticorpos marcados com uma enzima, formando um “sanduíche”. Os anticorpos IgM anti-dengue capturados são detectados por anticorpos monoclonais ou policlonais conjugados com uma enzima que age sobre o substrato fazendo com que a reação mude de cor (WHO, 2009). As vantagens do ELISA são a praticidade, especificidade e sensibilidade. Suas desvantagens são a reatividade cruzada com outros membros da família *flaviviridae* e o fato de que um resultado negativo em amostras de soro de fase aguda, coletada muito precocemente, não exclui o diagnóstico da dengue, tornando-se necessária uma nova coleta de soro do paciente (BRASIL, 2010). Esse teste possibilita a detecção quantitativa e qualitativa dos anticorpos, e sua combinação com testes de captura de IgG, baseados nos mesmos princípios, permite a diferenciação entre infecções primárias e infecções secundárias (INNIS et al., 1989; MIAGOSTOVICH et al., 1999).

Em um estudo caso-controle realizado por BLACKSELL, (2012) que avaliou a sensibilidade e especificidade de sete kits comerciais (ELISA dengue NS1 – Panbio, ELISA dengue IgM Captura – Panbio, ELISA dengue IgG – Panbio, ELISA dengue NS1 – Standard Diagnostic, ELISA dengue IgM – Standard Diagnostic e Platélia NS1 – BioRad) para detecção da dengue na fase aguda da doença em uma amostra de 337 pacientes, com dengue laboratorialmente confirmada realizado em Bangkok, Tailândia, a sensibilidade e especificidade do ELISA IgM variou de 85 a 89% e 88 a 100%, respectivamente.

Detecção do antígeno NS1

O teste de ELISA para detecção do antígeno NS1 do vírus da dengue permite a detecção da infecção pelo vírus da dengue em pacientes na fase aguda da doença (ALCON et al., 2002; LIBRATY et al., 2002), pois o antígeno NS1 está presente no soro de pacientes infectados entre o primeiro e o quinto ou sétimo dia de doença (SHU et al., 2009). O desenvolvimento do ELISA de captura cujo alvo é a proteína NS1 do vírus da dengue foi descrito por YOUNG et al. (2000).

O princípio do teste se baseia na presença dos antígenos proteicos NS1 no soro do paciente que se ligam aos anticorpos anti-NS1 da placa de microaglutinação. Através de lavagem, o soro residual é retirado ficando na placa apenas os antígenos que se ligaram ao anti-NS1. Em seguida é feita a adição de anticorpos monoclonais anti-NS1 conjugado a peroxidase de rábano. Após incubação, a placa de microaglutinação é lavada, em seguida adicionado um substrato incolor (tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio) que é hidrolisado pela enzima e o cromógeno (TMB) adquire uma coloração azul. A reação é interrompida com ácido, tornando-a amarela, que é um indicativo da presença do antígeno NS1 da dengue.

Inúmeros kits comerciais foram desenvolvidos utilizando esse mesmo princípio e um estudo multicêntrico (DENCO) conduzido por GUZMAN et al. (2010), no qual foi utilizado dois kits: Platelia NS1 da BioRad Laboratories e Dengue Early Elisa da Panbio, mostrou uma sensibilidade que variou de 52 - 84% e uma especificidade variando de 90 - 100%.

2.5.8. TESTES RÁPIDOS

Testes laboratoriais são úteis para proporcionar um diagnóstico oportuno da infecção pelo vírus da dengue, permitindo um melhor manejo médico dos pacientes. Diversos testes rápidos para a dengue tem sido desenvolvidos como, por exemplo, testes imunocromatográficos que utilizam antígenos específicos como NS1 ou

imunoglobulinas do tipo IgM, IgG ou combinações de IgM/IgG, ou NS1/IgM/IgG. Tais testes são capazes de detectar pacientes infectados com qualquer um dos quatro diferentes sorotipos e aqueles que detectam anticorpos IgM e IgG ajudam a diferenciar a dengue primária da dengue secundária (DE PAULA; FONSECA, 2004; FAHEEM et al., 2011). Estudos demonstraram sensibilidade entre 70 a 89% e especificidade entre 98 a 99% para os diferentes testes rápidos usados para a detecção de NS1, IgM e IgG (WANG; SEKARAN, 2010).

Sua facilidade de utilização, rapidez dos resultados e o fato de dispensar a utilização de equipamento laboratorial específico são suas principais vantagens. Como desvantagem, a interpretação do resultado do teste é operador-dependente, pois é visual, podendo haver erros de leitura e inconsistência intra e entre operadores (BLACKSELL, 2012).

2.6. CONFIRMAÇÃO LABORATORIAL DE CASO DE DENGUE

A WHO (2009) define como caso de dengue confirmado laboratorialmente o paciente que apresentar: RT-PCR positivo, ou; isolamento do vírus da dengue em cultura de célula, ou; soroconversão de IgM detectado por ELISA entre amostras pareadas, ou; soroconversão de IgG detectado por ELISA entre amostras pareadas; ou aumento de 4 vezes do título de IgG detectado entre amostras pareadas. O CDC (2014) define como caso confirmado o paciente que apresentar o RT-PCR positivo, ou; isolamento do vírus da dengue em cultura de célula, ou; soroconversão de IgM detectado por ELISA entre amostras pareadas, ou; aumento de 4 vezes do título de IgG entre amostras pareadas; ou título no Teste de Inibição de Hemaglutinação entre amostras pareadas; ou aumento de 4 vezes do título da PRNT entre amostras pareadas. Já o BRASIL (2010), define como caso confirmado de dengue, o paciente que apresentar algum critério clínico-epidemiológico com confirmação laboratorial específica: Isolamento do vírus em cultura de célula, ou; RT-PCR positivo, ou; ELISA IgM reagente, ou; pesquisas de antígeno NS1 positivo, ou; estudo anatomopatológico

com pesquisa de antígeno virais por imunohistoquímica, positivo para dengue.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a validade de diferentes métodos laboratoriais para o diagnóstico da dengue.

3.2. ESPECÍFICOS

1. Estimar a sensibilidade de testes laboratoriais para o diagnóstico da dengue em pacientes de um estudo de vigilância prospectiva para doença febril aguda, com diagnóstico confirmado da doença:
 - ✓ De forma Individual;
 - ✓ Suas possíveis combinações;
 - ✓ De acordo com a duração dos sintomas;
 - ✓ De acordo com o tipo de infecção (primária versus secundária);
 - ✓ Sorotipo infectante.

2. Estimar a especificidade dos testes laboratoriais em um conjunto de amostras de pacientes com leptospirose, hepatite, indivíduos saudáveis e em doadores de sangue:
 - ✓ ELISA IgM;
 - ✓ ELISA NS1.

4. METODOLOGIA

4.1. LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

Entre 01 de fevereiro e 31 de julho de 2010, foi realizado um estudo prospectivo de vigilância populacional para atendimento médico por doença febril aguda na unidade de emergência de São Marcos, localizada na comunidade de Pau da Lima, Salvador-Bahia. Esta comunidade foi escolhida devido ao suporte dos movimentos sociais organizados que permitiram a criação a partir de 2003 de uma infra-estrutura para pesquisa epidemiológica na localidade.

O bairro de Pau da Lima está situado geograficamente na região central de Salvador, fazendo divisa com os bairros de Sete de Abril, Vila Canária, Jardim Cajazeiras e Sussuarana. O bairro formou-se em meados da década de 50, e seus primeiros moradores, oriundos de áreas rurais, povoaram uma fazenda, onde o dono se chamava Paiva Lima. Com o tempo, a localidade passou a se chamar Pau da Lima. Devido à migração de moradores da zona rural e o crescimento de conjuntos habitacionais e áreas de invasões, a população do bairro cresceu rapidamente sendo hoje considerado o terceiro bairro mais populoso da cidade de Salvador, com uma população estimada em mais de 120 mil pessoas, segundo o censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Como consequência dessa ocupação irregular do solo, a comunidade apresenta precária infra-estrutura urbana, e baixa cobertura de serviços como pavimentação, rede de esgoto e drenagem das águas pluviais e coleta de lixo.

A vigilância populacional para doença febril aguda foi realizada na Unidade de Emergência de São Marcos (UESM), única unidade pública de pronto-atendimento que funciona na comunidade, 24 horas por dia, sete dias por semana, servindo como a unidade de emergência de referência para a região e como a única unidade pública de emergência do Distrito Sanitário de Pau da Lima. A UESM foi construída pela Fundação Monte Tabor sendo administrada pelo Hospital São Rafael e foi cedida a Prefeitura Municipal de Salvador no ano de 2000. A unidade possui uma estrutura

básica para atendimentos de urgências, com laboratório de análises clínicas e serviços de apoio ao diagnóstico. É considerada uma unidade de referência para o município.

4.2. SELEÇÃO DE PARTICIPANTES

De 2ª a 6ª feira, das 7:30 às 16:00 h, uma equipe de pesquisadores identificou ativamente e de forma prospectiva, por meio de consulta aos registros de atendimento da UESM, moradores da comunidade que preencheram os seguintes critérios de inclusão no estudo: idade ≥ 5 anos e história de febre mensurada ou referida ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$) há ≤ 7 dias. Foram definidos como moradores da comunidade os pacientes com residência dentro de uma área composta por 98 setores censitários localizados no entorno da UESM (população: 76.372 habitantes, área: 23,1 km²), conforme Figura 4.

Pacientes que buscaram atendimento por uma DFA em mais de uma ocasião durante o período do estudo foram incluídos no estudo mais de uma vez, desde que houvesse um intervalo maior que 30 dias entre as datas de atendimento médico na UESM. Foram considerados inelegíveis os pacientes com retorno a UESM para atendimento com menos de 30 dias, moradores fora da área composta dos 98 setores censitários ou aqueles que apresentavam mais de 7 dias de início de sintomas.



Figura 4: Localização da Unidade de Emergência de São Marcos dentro da área de estudo.

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão e que aceitaram participar do estudo, fornecendo consentimento livre e esclarecido (TCLE), tiveram uma amostra de sangue coletada de fase aguda após o atendimento médico, e em seguida foram entrevistados para a coleta de dados sócio-demográficos e clínicos, utilizando questionários padronizados e previamente testados. As variáveis clínicas foram auto-referidas, e incluem dias de sintomas no momento da coleta de sangue, e presença de sintomas como cefaléia, prostração, mialgia, artralgia, dor retroorbital e exantema. Todos os prontuários clínicos dos pacientes que foram incluídos no estudo foram revisados para a obtenção de dados sobre suspeita médica e evolução clínica (alta ou hospitalização/transferência). Os pacientes foram convidados a retornar ao UESM após 14 dias para uma segunda coleta de amostra de sangue (amostra de fase convalescente) bem como para obter dados sobre a evolução da doença. Uma equipe

do estudo visitou a residência dos participantes que não retornaram à UESM e realizaram a coleta de amostra de fase convalescente, além de dados sobre evolução da doença, no domicílio dos mesmos. A amostra final de participantes no estudo consistiu apenas do subgrupo de pacientes que tiveram as amostras de fase aguda e de fase convalescente coletadas. Esta decisão foi adotada a fim de fornecer as mesmas oportunidades de diagnóstico de dengue para todos os participantes.

4.3. ANÁLISES LABORATORIAIS

As amostras de sangue coletadas foram transportadas de forma refrigerada para o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do CPqGM/FIOCRUZ e lá foram centrifugadas, processadas e mantidas congeladas em freezers a -20°C para realização de exames sorológicos e -70°C para realização de RT-PCR. Foram utilizados os seguintes testes para o diagnóstico da dengue: 1) ELISA Captura IgM (Panbio® Dengue IgM Capture ELISA – ref.: E-DEN01M, Austrália) em amostras da fase aguda e da fase convalescente, 2) ELISA Captura NS1 (Panbio® Dengue Early ELISA – ref.: E-DEN02P, Austrália) em amostras de fase aguda e 3) detecção do ácido nucléico viral em amostras de fase aguda pelo método reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), seguindo o protocolo previamente descrito por LANCIOTTI et al. (1992). Adicionalmente, o ELISA Indireto IgG (Panbio® Dengue IgG Indirect ELISA – ref.: E-DEN1G, Austrália) foi utilizado em amostras da fase aguda coletadas na data de inclusão do estudo para diferenciar as infecções em primárias e secundárias. Este fabricante de kit de ELISA foi escolhido por ser a marca de kit utilizada nos centros de referencia do Estado (LACEN). Todos os testes ELISAs foram realizados conforme instruções do fabricante. Para garantir os nossos resultados, realizamos um controle de qualidade repetindo uma amostragem dos negativos e todas as amostras que tiveram o resultado positivo ou indeterminado.

4.4. DEFINIÇÃO LABORATORIAL DE CASO DE DENGUE

Foi definido como caso de dengue os pacientes com doença febril aguda que apresentassem laboratorialmente: 1) RT-PCR para dengue positivo, ou; 2) ELISA NS1 positivo, ou; 3) soroconversão de IgM detectado entre as amostras de fase aguda e de fase convalescente através do ELISA-IgM. Os casos confirmados tiveram o tipo viral determinado pelo RT-PCR. Foram definidos como casos primários e secundários de dengue os pacientes que apresentaram, respectivamente, ausência e presença de IgG contra o vírus da dengue na amostra de soro de fase aguda.

Foi considerado como caso provável de dengue o paciente não confirmado por nenhum dos critérios descritos acima, mas com ELISA IgM reagente na amostra de fase aguda. Pacientes que não preencheram os critérios de caso de dengue confirmado ou provável foram definidos como pacientes negativos para a dengue.

4.5. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo CEP - Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ, sob o protocolo nº 154. Todos os participantes receberam orientações sobre os objetivos, procedimentos e riscos associados à participação durante o procedimento de consentimento informado. Foi assegurado o direito a voluntariedade de participação. Os resultados laboratoriais foram disponibilizados aos pacientes, ao UESM e a vigilância epidemiológica, uma vez que a dengue é uma doença de notificação compulsória.

4.6. RECURSOS NECESSÁRIOS E DISPONÍVEIS

Os recursos necessários para a execução deste projeto foram originados do financiamento MCT/CNPq nº 073/2009, PRONEX – REDE DENGUE e pela FAPESB,

através do processo nº 025/2010, Projeto: Vigilância Ativa para Dengue - Avaliação da Transmissão e da Carga da Doença em uma Comunidade Urbana.

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas com o programa Epi Info para Windows versão 3.5.2 (CDC, Atlanta, GA, USA) e com o programa Open Epi versão 3.01. A frequência de infecção pelo vírus da dengue entre os pacientes com síndrome febril aguda foi determinada pela proporção de casos de dengue confirmados na amostra testada. As características dos pacientes incluídos no estudo foram descritas através de frequências para variáveis categóricas contendo as medianas e intervalo interquartil (IIQ).

A sensibilidade de cada teste foi calculada pela divisão do número de positivo por cada teste pelo número total de casos confirmados. Em seguida foi determinada a sensibilidade, para o uso combinado de diferentes testes. O cálculo foi feito dividindo o total de pacientes positivos pela combinação de testes pelo total de casos confirmados.

Para avaliar o desempenho individual do ELISA IgM, do ELISA NS1 e do RT-PCR no diagnóstico da dengue de acordo com o tempo de evolução da doença, foi determinada a sensibilidade de cada teste, de acordo com a duração dos sintomas antes da coleta da amostra de sangue de fase aguda. Foram utilizados os seguintes períodos de duração dos sintomas antes da coleta de amostra de sangue de fase aguda: 1, 2, 3,4 e 5-7 dias. Não houve pacientes com amostra de sangue coletada no mesmo dia do início dos sintomas. A análise da sensibilidade do ELISA IgM de fase convalescente foi realizada para os seguintes períodos após coleta de amostra de fase aguda: 2-4 semanas, 4-7 semanas, 8-11 semanas e ≥ 12 semanas.

Adicionalmente, foi calculada a sensibilidade dos testes avaliados conforme o tipo de infecção (primária e secundária) de dengue para cada método diagnóstico, tomando como referência a presença ou ausência de anticorpos IgG nas amostras de fase agudas.

Na avaliação da especificidade foi utilizado um grupo de amostras de soro de pacientes com leptospirose confirmada (n=68) através do teste de microaglutinação (MAT), um grupo de amostras de soro de doadores de sangue (n=73), um grupo de amostras de soro de pacientes com hepatite (n=18) e um grupo de amostras de soro de pessoas saudáveis residentes na comunidade de Pau da Lima (N=73). A avaliação da especificidade de cada teste foi calculada pela divisão do número de negativos por cada teste pelo número total de negativos.

Intervalos de confiança de 95% foram calculados para todas as medidas de sensibilidade e especificidade utilizando o método de Pontuação de Wilson.

5. RESULTADOS

No período do estudo, 1.404 pacientes foram considerados elegíveis e destes, 773 (55%) pacientes foram recrutados pela vigilância. Dos pacientes incluídos, em 623 (81%) pacientes foi possível coletar as duas amostras de sangue (amostra de fase aguda e de fase convalescente), em 128 (16%) pacientes foi possível obter apenas uma amostra de sangue (de fase aguda ou de fase convalescente) e para 22 (3%) pacientes não foi possível coletar qualquer amostra de sangue (Figura 5). Apenas os 623 pacientes que tiveram as amostras de fase aguda e de fase convalescente disponíveis para avaliação laboratorial do diagnóstico de dengue foram incluídos no estudo.

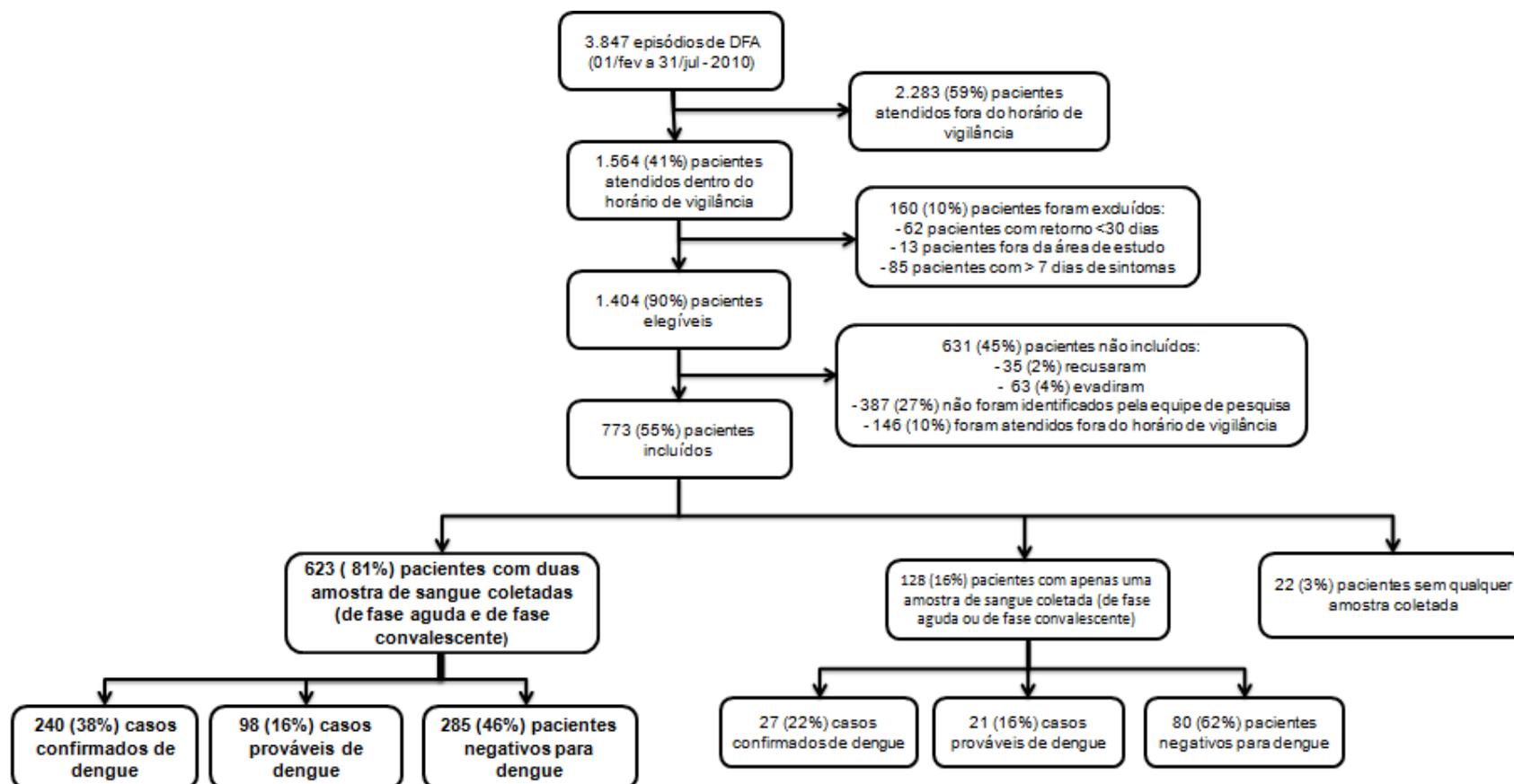


Figura 5: Fluxograma descrevendo a identificação e os critérios de inclusão de participantes no período do estudo, 01 de fevereiro a 31 de julho de 2010.

A mediana de idade dos 623 pacientes incluídos no estudo foi de 21 anos (intervalo interquartil [IIQ] 11-32), e porcentual de participantes do sexo masculino foi de 51% (Tabela 1). A mediana de dias entre o início dos sintomas e a coleta da amostra de sangue de fase aguda foi de 3 dias ([IIQ] 2-4). As características clínicas mais freqüentes nos participantes no estudo foram cefaléia (86%), prostração (77%) e mialgia (76%).

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo (N=623), estratificado pelo status de confirmação.

Características Demográficas e Clínicas	Total N= 623 n (%) ou mediana (IIQ)	Status de confirmação		
		Confirmados n= 240	Prováveis n= 98	Não confirmados n= 285
		n (%) ou mediana (IIQ)		
Idade em anos	21 (11-32)	18 (11-28)	21 (10-35)	24 (11-33)
Sexo masculino	317 (51)	125 (52)	55 (56)	137 (48)
Duração dos sintomas (dias)	3 (2-4)	3 (2-4)	3 (2-4)	3 (2-4)
Cefaléia	536 (86)	206 (86)	89 (91)	241 (85)
Prostração	482 (77)	190 (79)	78 (80)	214 (75)
Mialgia	471 (76)	181 (75)	78 (80)	212 (74)
Dor retroorbital*	326 (52)	141 (59)	50 (51)	135 (47)
Artralgia*	285 (46)	126 (52)	45 (46)	114 (40)
Tosse*	198 (32)	61 (25)	31 (32)	106 (37)
Vômito	165 (27)	77 (32)	21 (21)	67 (23)
Exantema	130 (21)	55 (23)	31 (32)	44 (15)
Diarréia	128 (20)	45 (19)	24 (24)	59 (21)
Suspeição médica do diagnóstico de dengue	74 (12)	46 (19)	20 (20)	8 (3)
Alta	610 (98)	235 (98)	97 (99)	278 (96)
Transferência	8 (1)	5 (2)	0	3 (1)

* Diferença observada entre os pacientes confirmados e não confirmados para dengue foi estatisticamente significativa ($p < 0,005$)

Dos 623 pacientes incluídos no estudo, 240 (38%) foram casos confirmados de dengue, 98 (16%) foram casos prováveis de dengue e 286 (46%) foram pacientes negativos para dengue. Comparando os pacientes confirmados aos pacientes negativos para dengue, os casos confirmados foram mais jovens (mediana de idade: 18 vs 24) e apresentam mais freqüentemente dor retroorbital (59% vs 47%), artralgia (52% vs 40%) e tosse (25% vs 37%). Apenas 46 (19%) dos 240 casos confirmados e 20 (20%) dos

casos prováveis de dengue tiveram suspeita médica de dengue registrada em prontuário (Tabela 1). Entre os 140 casos confirmados de dengue, 43 (18%) e 194 (81%) apresentavam dengue primária e secundária, respectivamente, e para os 98 casos prováveis de dengue, 8 (8%) e 90 (92%) apresentavam dengue primária e secundária, respectivamente.

Avaliando os testes diagnósticos para dengue de forma individual, nenhum dos testes alcançou mais que 90% de sensibilidade, o RT-PCR na amostra aguda apresentou o melhor desempenho com 83,8%, seguido do ELISA IgM na amostra convalescente com 81,3%. O ELISA NS1 e o ELISA IgM na amostra aguda tiveram baixo desempenho, aproximadamente 30% de sensibilidade (Tabela 2).

Tabela 2: Sensibilidade individual dos diferentes tipos de diagnóstico da dengue (n=240).

Teste Laboratorial	N° Positivos	% (IC 95%)
RT-PCR	201	83,8 (78,6 - 87,9)
ELISA IgM convalescente	195	81,3 (75,8 - 85,7)
Soroconversão de IgM por ELISA	128	53,3 (47,0 - 59,5)
ELISA NS1	76	31,7 (26,1 - 37,8)
ELISA IgM aguda	72	30,0 (24,6 - 36,1)

Quando usamos os testes diagnósticos de forma combinada, o uso combinado do ELISA NS1 ou do ELISA IgM da amostra aguda com o RT-PCR não acresceu benefício a sensibilidade apresentada pelo RT-PCR individualmente mas, agregar o ELISA IgM da amostra convalescente a sensibilidade do conjunto de testes para 100% (Tabela 3). O uso conjunto do ELISA NS1 e do ELISA IgM da amostra convalescente apresentou sensibilidade de 82,9%. O uso conjunto do ELISA NS1 e do ELISA IgM na amostra aguda só alcançaram 50,4% de sensibilidade.

Tabela 3: Sensibilidade do uso combinados dos diferentes tipos de diagnóstico da dengue (n=240).

Combinação de testes	Nº Positivos	% (IC 95%)
RT-PCR ou ELISA IgM convalescente	240	100,0 (98,4 - 100,0)
RT-PCR ou ELISA IgM aguda	207	86,3 (81,3 - 90,1)
RT-PCR ou ELISA NS1	207	86,3 (81,3 - 90,0)
ELISA IgM aguda ou ELISA IgM convalescente	201	83,8 (78,6 - 87,9)
ELISA NS1 ou ELISA IgM convalescente	199	82,9 (77,7 - 87,2)
ELISA NS1 ou ELISA IgM aguda	121	50,4 (44,1 - 56,7)

A sensibilidade dos testes diagnósticos também foi avaliada de acordo com o tipo de infecção, o ELISA IgM da amostra aguda foi quase quatro vezes mais sensível (34,4%) na infecção secundária que na infecção primária (9,3%) e o RT-PCR teve melhor desempenho nas infecções secundárias (87,2% vs 67,4%). Já, a soroconversão de IgM por ELISA é mais freqüente na infecção primária (76,7%) que na secundária (48,7%). O ELISA NS1 apresentou um baixo desempenho nos dois tipos de infecção, com sensibilidades de 37,2% para infecção primária e 29,7% para a infecção secundária e para três pacientes não foi possível identificar o tipo de infecção (Tabela 4).

Tabela 4: Sensibilidade dos testes diagnósticos em pacientes com infecção primária e secundária pelo vírus da dengue (n=240).

Teste	Sensibilidade de acordo com o tipo de infecção			
	Infecção Primária n=43		Infecção Secundária n=194	
	Nº Positivos	% (IC 95%)	Nº Positivos	% (IC 95%)
Teste Laboratorial				
RT-PCR	29	67,4 (52,5 - 79,5)	170	87,2 (81,8 - 91,2)
ELISA NS1	16	37,2 (24,4 - 52,1)	58	29,7 (23,8 - 36,5)
ELISA IgM aguda	4	9,3 (3,7 - 21,6)	67	34,4 (28,1 - 41,3)
ELISA IgM convalescente	37	86,0 (72,7 - 93,4)	157	80,5 (74,4 - 85,5)
Soroconversão de IgM por ELISA	33	76,7 (62,3 - 86,9)	95	48,7 (27,1 - 40,2)

Os dados da sensibilidade dos testes diagnósticos para a dengue por dia de sintomas da doença no momento da coleta da amostra de fase aguda estão apresentados na Figura 6. O RT-PCR foi pouco influenciado pela duração da doença, mas teve uma sensibilidade ligeiramente maior nos 3 primeiros dias de sintomas. A baixa sensibilidade do ELISA NS1 reduz ainda mais após 4º dia de sintomas (22,6%). Já o ELISA IgM em amostra de fase aguda aumenta a sensibilidade com a maior duração dos dias de sintomas e atinge seu pico (71%) entre o 5º e 7º dia de doença. Em relação ao ELISA IgM na amostra de fase convalescente, observou-se um melhor desempenho quando a amostra foi coletada entre 2-4 semanas após o atendimento médico (~90%), com redução da sensibilidade nas semanas seguintes. A sensibilidade da Soroconversão de IgM por ELISA é boa (entre 67% e 77%) quando a amostra de fase aguda é coletada nos primeiros dias de sintomas, mas reduz-se rapidamente até o 7º dia de sintomas, acompanhando de forma inversa a sensibilidade do ELISA IgM de fase aguda.

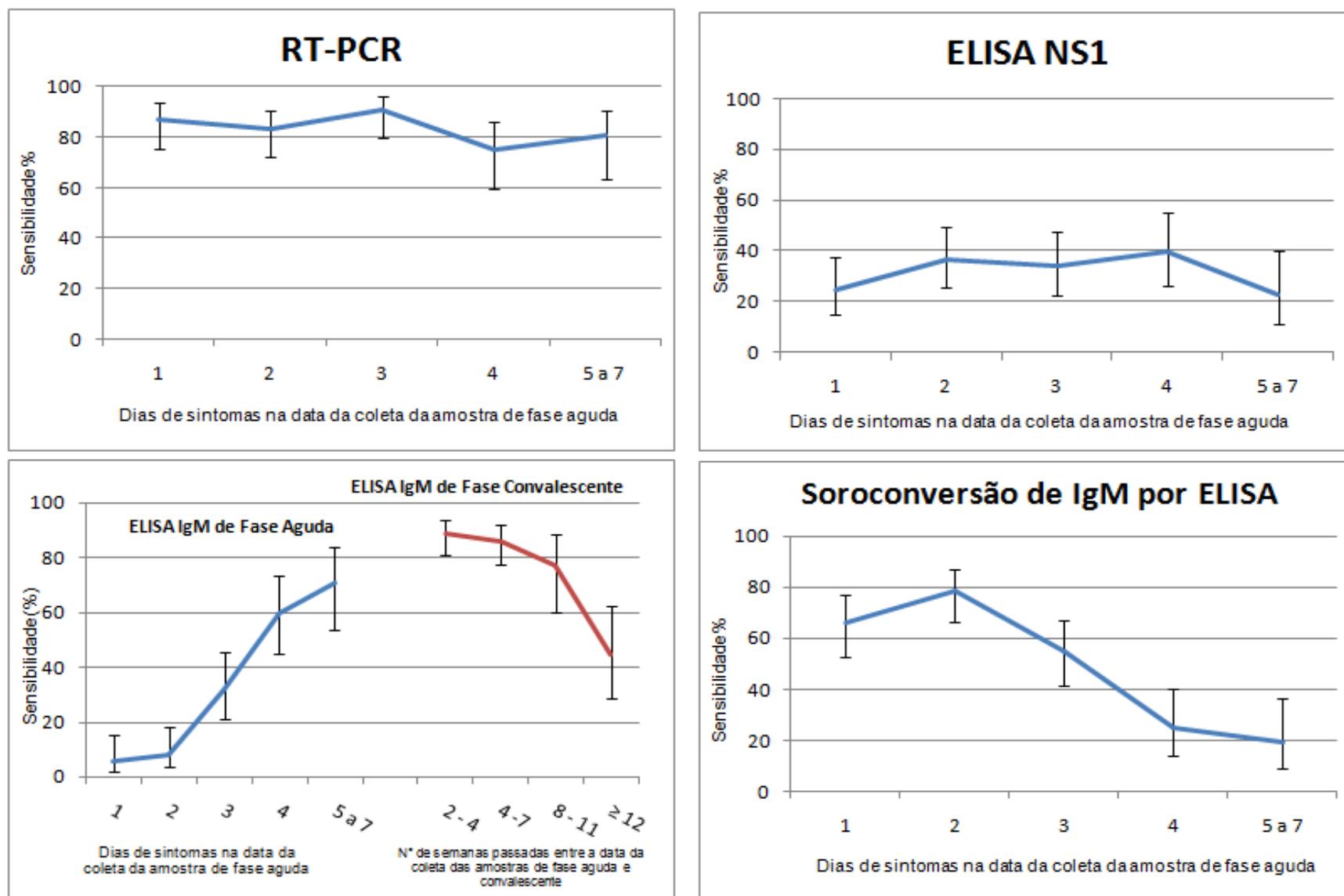


Figura 6: Sensibilidade dos testes diagnósticos para a dengue por dias de sintomas da doença.

Dos 201 pacientes que foram positivos por RT-PCR, 12 (6%) foram positivas para DENV-1, 168 (83,6%) para DENV-2, 11 (6,5%) para DENV-3 e 10 (5%) para DENV-4. O pequeno número de pacientes identificados com dengue por DENV-1, DENV-3 e DENV-4, limitou as comparações das sensibilidades, mas foi digno de nota o fato de todos os casos causados por DENV-3 e DENV-4 terem sido identificados apenas com base nos PCR's conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5: Sensibilidade de diferentes testes diagnósticos para a dengue, de acordo com o sorotipo.

Sensibilidade do Teste	Sorotipo 1 (n=12)	Sorotipo 2 (n=168)	Sorotipo 3 (n=11)	Sorotipo 4 (n=10)
ELISA NS1	75,0 (46,8 - 91,1)	65,5 (58,0 - 72,3)	0,0	0,0
Soroconversão de IgM por ELISA	58,3 (32,0 - 80,7)	51,8 (44,3 - 59,2)	9,1 (1,6 - 37,7)	0,0
ELISA IgM aguda	16,7 (4,7 - 44,8)	38,1 (31,1 - 45,6)	0,0	0,0
ELISA IgM convalescente	75,0 (46,8 - 91,1)	86,9 (81,0 - 91,2)	0,0	0,0

A Tabela 6 apresenta dados da especificidade dos diferentes testes de ELISA para a dengue em amostras de pacientes com diagnóstico laboratorial de leptospirose e hepatite, em doadores de sangue e em indivíduos saudáveis residentes na comunidade de Pau da Lima. O ELISA NS1 foi o mais específico dentre os testes avaliados com especificidade $\geq 97\%$ para pacientes com leptospirose, Hepatite A e para doadores de sangue. O ELISA IgM em amostra de fase aguda teve uma especificidade de 85% para doadores de sangue, 55% para pacientes com Hepatite A, 79% para pacientes com leptospirose e 72% para indivíduos saudáveis. A soroconversão de IgM por ELISA em pacientes com leptospirose teve uma especificidade de 92,6%.

Tabela 6: Especificidade dos testes de ELISA no diagnóstico da dengue.

Teste	Especificidade			
	Doadores de sangue (N=73) N (%) IC95%	Leptospirose (N=68) N (%) IC 95%	Hepatite A (N=18) N (%) IC 95%	Indivíduos Saudáveis (N=73) N (%) IC 95%
ELISA NS1	100,0 (95,0 - 100,0)	97,1 (89,9 - 99,2)	100,0 (82,4 - 100,0)	97,3 (90,6 - 99,3)
ELISA IgM aguda	84,9 (75,0 - 91,4)	79,4 (68,4 - 87,3)	55,6 (33,7 - 75,4)	72,6 (65,8 - 84,9)

6. DISCUSSÃO

A dengue é considerada atualmente como a mais importante arbovirose e o número de casos reportados a OMS vem crescendo a cada década, sobretudo em países tropicais e subtropicais (KORAKA et al., 2003). A co-circulação de diferentes sorotipos do vírus na maioria das vezes de forma simultânea aumentou e com isso a preocupação com relação à ocorrência de formas mais graves da doença e estratégias eficientes de detecção em seu estágio inicial tornaram-se imprescindíveis para o diagnóstico precoce e controle desse agravo (WANG et al., 2010).

O aumento considerável de epidemias da dengue no mundo e os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas no diagnóstico das doenças infecciosas fizeram com que a oferta de testes diagnósticos para dengue aumentasse no mercado e daí a importância de se avaliar o desempenho destes testes, não só em pacientes hospitalizados ou que apresentam sintomatologia característica da dengue, mas também em pacientes que apresentem uma doença febril aguda inespecífica em que a dificuldade para o diagnóstico clínico é maior.

No presente estudo, tivemos a oportunidade de avaliar os kits da Panbio de MAC-ELISA IgM, ELISA-NS1, bem como do RT-PCR (protocolo de Lanciotti) com um painel de amostras consecutivas de pacientes atendidos por uma síndrome febril aguda em uma unidade de emergência pública de uma comunidade carente de Salvador, durante um ano epidêmico. Esta abordagem para seleção de amostras dos casos confirmados de dengue é especialmente interessante pela maior representatividade da coleção de amostras analisadas, em comparação às coleções usadas em outros estudos, que não possuem uma base epidemiológica que as legitime como generalizáveis para uma população de casos de dengue. Dentro desta coleção de amostras, os testes também foram avaliados quanto à capacidade de confirmar casos de dengue quando usados de forma combinada e de acordo com a duração dos sintomas, com o tipo do sorotipo, com o tipo de infecção (primária e secundária) e também quanto à especificidade em indivíduos com leptospirose, hepatite, doadores de sangue e indivíduos saudáveis.

Até o presente, poucos estudos foram conduzidos no Brasil para avaliar a sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos para dengue. Em um estudo realizado por SOUZA et al. (2007) foi avaliada a sensibilidade e a especificidade dos kits de ELISA IgM e IgG da companhia Focus na discriminação entre infecção primária e secundária encontrando uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97,8% utilizando amostras pareadas da epidemias ocorrida em Santos e Vitória em 2002 e 2003.

Outros estudos ocorreram no ano de 2010, realizado por CASTRO-JORGE et al. (2010) onde avaliaram a sensibilidade e especificidade do ELISA para detecção de NS1 da BioRad em uma amostra de 105 indivíduos confirmados por dengue através da combinação de isolamento por cultura e/ou RT-PCR e/ou presença de anticorpos IgM. A sensibilidade encontrada foi de 95,9% e a especificidade de 81,1%. O outro estudo ocorrido nesse mesmo ano foi realizado por LIMA et al. (2010) que avaliaram o uso potencial de 3 kits comerciais de ELISA NS1 em um painel de 220 amostras positivas para dengue confirmadas através do isolamento do vírus ou RT-PCR ou ELISA IgM positivo ou quatro vezes aumento de títulos de IgG em amostras pareadas, da epidemias ocorridas no Rio de Janeiro entre 1986 a 2008, encontrando uma sensibilidade de 72,3% e especificidade de 100% para o kit da Panbio. Os valores mais elevados observados nos estudos de CASTRO-JORGE et al. (2010), LIMA et al. (2010) e SOUZA et al. (2007) podem estar atribuídos as diferenças clínicas (muitas vezes as amostras de coleções são de pacientes de maior gravidade e/ou hospitalizados) entre os nossos pacientes (que representam pacientes em unidade de emergência com formas mais leves da doença) e os pacientes dos outros estudos podem justificar parcialmente as diferenças nos achados, bem como o estado imunológico pregresso (a maior parte de nossos casos eram secundários) e o padrão-ouro utilizado, e em especial, a duração da doença no momento da coleta da amostra.

Sensibilidades que variaram entre 63 e 91% foram observadas em diferentes estudos de avaliação do kit de ELISA NS1 (BLACKSELL et al., 2007; BESSOFF et al., 2008, MCBRIDE et al., 2009). Uma das primeiras avaliações do kit de ELISA NS1 da Panbio foi realizada por BLACKSELL et al. (2008) que encontrou uma sensibilidade e

especificidade respectivamente de 63% e 100% ao realizarem um estudo em Laos com um painel de 92 amostras de pacientes com suspeita clínica de dengue admitidos no Hospital Mahosot. Outros estudos obtiveram sensibilidades similares de 60,4% (BESSOFF et al., 2008) e 64,9% (DUSSART et al., 2008). Já, MCBRIDE (2009) realizou um estudo com 91 amostras de pacientes confirmados por dengue na Austrália e encontrou uma sensibilidade para o NS1 de 63,7%. GUZMAN et al. (2010) encontraram uma sensibilidade de 52% e especificidade de 90% em um estudo multi-cêntrico com 1.385 pacientes com suspeita clínica de dengue.

Neste estudo encontrou-se uma sensibilidade para o ELISA NS1 inferior às descritas (31,7%), isso pode ser parcialmente explicado pelo fato de que as amostras não eram caracterizadas por pacientes com suspeita clínica de dengue e que em 83,6% eram do sorotipo DENV-2. A literatura relata que diferenças nas sensibilidades entre os sorotipos demonstram que o ELISA NS1 é menos sensível em detectar casos de DENV-2 (MCBRIDE, 2009) e de DENV-4 (BESSOFF et al., 2008; MCBRIDE, 2009).

Entretanto a sensibilidade do RT-PCR encontra neste estudo foi de 83,8% corroborando com o estudo de WATTHANAWORAWIT et al. (2011) que relatou 88,9% de sensibilidade em um estudo prospectivo realizado com pacientes que apresentavam febre indiferenciada em uma área endêmica para dengue na Malásia, com o estudo de PAUDEL et al. (2011) onde comparou o qRT-PCR ao RT-PCR convencional para o diagnóstico de dengue em uma coleção de 223 amostras de pacientes febris que foram confirmados por dengue pelo ELISA e RT-PCR, encontrando uma sensibilidade de 84% e com o estudo de KHAN et al. (2009) ao comparar o RT-PCR e ELISA IgM em surto de dengue ocorrido no Paquistão no ano de 2006, relatando uma sensibilidade para o RT-PCR de 83,9%.

Com relação ao ELISA IgM, BLACKSELL (2012) descreveram a sensibilidade dos testes da Panbio em uma amostra de 239 pacientes pediátricos tailandeses confirmados por dengue pelos seguintes métodos: ELISA IgM (captura) ou ELISA IgG (captura) e RT-PCR para determinar o sorotipo e, encontraram sensibilidade e especificidade para amostras de fase aguda de 83,2% e 87,8% e para as amostras de

fase convalescente de 93,7% e 87,8%, respectivamente. A TDR/WHO (2009) com o objetivo de determinar o desempenho dos Kits de ELISA IgM e testes rápidos disponíveis no mercado, avaliou a sensibilidade e especificidade desses kits em um painel de amostras positivas para dengue através do MAC-ELISA IgM e por outras doenças similares encontrando sensibilidade e especificidade de 99% e 84,4% para os kits de ELISA da Panbio.

No presente estudo, os valores encontrados para a sensibilidade do ELISA IgM foi de 30% para a amostra agudas, o baixo valor da amostra na fase aguda da doença pode ser justificado pelo fato de que a procura pelo atendimento médico tenha ocorrido muito precocemente na fase inicial da doença, quando níveis de anticorpos não são suficientes para serem detectados. Já para as amostras de fase convalescente, a sensibilidade do ELISA IgM foi de 81,3%. Sensibilidades que variam entre 85% e 93,7% foram descritas por BRANCH e LEVETT (1999) e BLACKSELL (2012). Vale ressaltar que no estudo de BLACKSELL (2012) não foi relatado o tempo decorrente entre a coleta da amostra de fase aguda e a coleta da amostra de fase convalescente.

Alguns autores relatam os benefícios do uso combinado do antígeno NS1 e IgM no diagnóstico da dengue (BLACKSELL et al., 2008; OSORIO et al., 2010; FRY et al., 2011), aumentando a sensibilidade no diagnóstico da doença (BLACKSELL, GUZMAN et al., 2010). Neste estudo encontrou-se uma sensibilidade combinada para o ELISA NS1 ou o ELISA IgM amostra de fase aguda de 50,4% e para ELISA NS1 ou ELISA IgM amostra de fase convalescente de 82,9%. A literatura relata que o uso combinado de ELISA NS1 e ELISA IgM variam entre 59,7% e 87,9% para amostras de fase aguda e já para a combinação de ELISA NS1 ou ELISA IgM amostra de fase convalescente a sensibilidade relatada é de 63% (BLACKSELL et al., 2008; WATTHANAWORAWIT et al., 2011; BLACKSELL, 2012). Uma possível explicação para essa diferença pode estar na seleção das amostras ou no tempo decorrente do início dos sintomas até a coleta das amostras.

Este estudo mostrou que o uso combinado do o RT-PCR e ELISA IgM amostra de fase aguda aumentou a sensibilidade para 86,3%, diferentemente do valor

encontrado no estudo de CASTRO-JORGE et al. (2010) que relatou uma sensibilidade de 67,1% para essa combinação. Quando dispomos de uma segunda amostra de sangue, a combinação do RT-PCR com ELISA IgM (convalescente) aumentou a sensibilidade para 100%. Esses resultados evidenciam a importância da coleta de uma segunda amostra de sangue principalmente se o paciente apresentar sintomatologia característica da doença e o resultado da primeira avaliação sorológica negativa.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que 80,8% eram infecções secundárias e DENV-2 o sorotipo predominante com 83,6%. O ELISA NS1 foi capaz de identificar uma maior proporção de infecções primárias que secundárias corroborando com que já descrito em literatura, que uma maior sensibilidade é obtida em casos de infecções primárias (KUMARASAMY et al., 2007; SEKARAN et al., 2007; MCBRIDE, 2009). Nossos resultados demonstraram que a sensibilidade tanto do ELISA IgM de fase aguda quanto do RT-PCR, foram maiores para infecções secundárias. A relação entre infecção secundária por DENV-2 e gravidade da doença já foi descrita na literatura, primeiramente por HALSTEAD; SHOTWELL; CASALS (1973), em um estudo com macacos infectados com DENV-2 que mostrou que a viremia era 13 vezes mais elevada em animais com infecções secundárias. VAUGHN et al. (2000) reportou em um estudo prospectivo com crianças na Tailândia que pacientes com infecções por DENV-2 tinham a doença mais grave do que com os outros sorotipos e que há uma correlação entre gravidade da doença e altos títulos de viremia quando o paciente possuía infecção secundária e por DENV-2. Neste estudo avaliamos a gravidade da doença, mas apenas 8 (1%) dos pacientes confirmados foram hospitalizados e não houve óbito.

Tanto o ELISA NS1 quanto o RT-PCR tiveram suas maiores sensibilidade no 4º dia de sintomas da doença (40% e 90,6%), já os níveis de anticorpos detectáveis através do ELISA IgM iniciaram em níveis mais baixos com 5,7% no primeiro dia da doença chegando a 71% entre 5-7 dias de doença. O ELISA IgM de fase convalescente atinge seu maior pico de 2-4 semanas com uma sensibilidade de 89,1% decaindo com o passar das semanas. Como o teste depende da produção de anticorpos e tem o seu maior pico de anticorpos duas semanas após início dos sintomas, é de se esperar que a sensibilidade do ELISA IgM fosse maior na fase de convalescência do que na fase

aguda da doença (GUZMAN et al., 2010). HU et al. (2011) relatou sensibilidade no ELISA IgM de 42% para casos de infecções primárias em amostras coletadas até o 3º dia de sintomas da doença relatou 42,9% de sensibilidade e para amostras obtidas após o 8º dia, 100% de sensibilidade.

No nosso estudo conseguimos detectar o antígeno NS1 até o 7º dia após o início dos sintomas em aproximadamente 22%, diminuindo com o surgimento e elevação dos anticorpos IgM. SEKARAN et al. (2007) detectou-se antígeno NS1 até o 10º dia após o início dos sintomas em cerca de 30%, com uma diminuição após este período. Houve uma melhoria da sensibilidade do ELISA IgM após o 5º dia do início dos sintomas, alcançando aproximadamente 70% de sensibilidade, sendo que nesse estudo 75% dos pacientes confirmados tinham até quatro dias de sintomas, quando se espera menor sensibilidade.

O desenvolvimento deste estudo apresentou algumas limitações como o uso da combinação dos resultados de ELISA IgM, ELISA NS1 e RT-PCR como padrão-ouro para definir casos confirmados de dengue, a não realização de outros métodos diagnósticos para a dengue como o isolamento viral, considerado método mais específico no diagnósticos de dengue. Outra limitação foi o sistema de vigilância que trabalhava apenas em horário comercial e não funcionava aos finais de semanas e com isso não pudemos avaliar os pacientes que procuravam atendimento na UESM à noite e aos finais de semana e isso pode ter influenciado na representatividade.

Nós preferimos não incluir no estudo os 98 (16%) dos casos prováveis no grupo de casos confirmados, por receio de incluir casos de infecções pregressas. Esta escolha teve um custo que foi o de uma possível subestimação da sensibilidade do ELISA IgM e uma super-estimação das sensibilidades do ELISA NS1 e do RT-PCR.

7. CONCLUSÕES

A partir deste estudo, avaliamos o desempenho dos diferentes métodos laboratoriais, a fim de determinar qual a melhor abordagem diagnóstica na identificação de casos de dengue. Para tanto foi utilizado um painel de amostras de pacientes com doença febril aguda identificado prospectivamente em uma unidade pública de emergência de um bairro pobre de Salvador- Ba.

O presente estudo demonstrou que o ELISA NS1 e o ELISA IgM da amostra de fase aguda, apresentaram uma baixa sensibilidade, mesmo quando usado de forma combinada entre si. Em contrapartida, o RT-PCR apresentou uma sensibilidade maior que 83% e o ELISA IgM da amostra de fase convalescente alcançou 81%. O uso combinado do RT-PCR na amostra de fase aguda e do ELISA IgM da amostra de fase convalescente foram capazes de detectar 100% dos casos de dengue. A sensibilidade dos testes de acordo com o tipo de infecção mostrou a predominância de infecções secundárias (81%) e o sorotipo predominante foi o DENV-2 (84%).

Este estudo indica que o RT-PCR é uma boa ferramenta no diagnóstico da dengue em pacientes com doença febril aguda e a coleta de uma segunda amostra de sangue poderá aumentar o número de casos confirmados pela doença principalmente em áreas endêmicas onde a maioria das infecções são secundárias. Desta forma, recomenda-se a realização de métodos diagnósticos adicionais em pacientes com uma suspeita da doença e resultado negativo do RT-PCR.

8. REFERÊNCIAS

ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein ns1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no brasil: Situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BESSOFF, K. et al. Comparison of two commercially available dengue virus (denv) ns1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute denv infection. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 10, p. 1513-1518, 2008.

BLACKSELL, S. D. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: Recent evaluations and future needs? **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2012, p. 151967, 2012.

BLACKSELL, S. D. et al. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in laos. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 11, p. 1458-1464, 2007.

BLACKSELL, S. D. et al. Evaluation of the panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin m antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in laos. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 60, n. 1, p. 43-49, 2008.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: histórico do controle no Brasil. **Epidemiol. Serv. de Saúde.**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010.

_____. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Vigilância em Saúde. **Dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose**. Brasília, MS. 2008.

BURKE, D.; MONATH, T. Flaviviruses. **Fields Virol.**, v. 1, n., p. 1043-1125, 2001.

CAMARA, F. P. et al. [regional and dynamics characteristics of dengue in brazil: A retrospective study]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 2, p. 192-196, 2007.

CASTRO-JORGE, L. A. et al. Clinical evaluation of the ns1 antigen-capture elisa for early diagnosis of dengue virus infection in brazil. **J. Med. Virol.**, v. 82, n. 8, p. 1400-1405, 2010.

CDC. Dengue fever. Disponível em: <Http://www.Cdc.Gov/dengue>. Acesso em: 16 mar 2014.

_____. Laboratory guidance and diagnostic testing [homepage on the internet], atlanta - USA: Centers for disease control and prevention 2011. Dengue. Disponível em: <Http://www.Cdc.Gov/dengue/clinicallab/laboratory.Html>. 2011.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, v. 44, n., p. 649-688. 1990.

CHANAMA, S. et al. Analysis of specific igm responses in secondary dengue virus infections: Levels and positive rates in comparison with primary infections. **J. Clin. Virol.**, v. 31, n. 3, p. 185-189, 2004.

CLARK, G. G. Situación epidemiológica del dengue en américa. Desafíos para su vigilancia y control. **Salud Públ. México**, n. 37, p. 5-11, 1995.

CLARKE, D. H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 7, n. 5, p. 561-573, 1958.

CORDEIRO, M. T. et al. Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute dengue infection based on igg elisa. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e4945, 2009.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. Dengue: A review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

DE SOUZA, L. J. **Dengue—diagnóstico, tratamento e prevenção**: Editora Rubio, 2008.

DEEN, J. L. et al. The who dengue classification and case definitions: Time for a reassessment. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 170-173, 2006.

DUSSART, P. et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using ns1 antigen detection in human serum. **PLoS neglected Trop. Dis.**, v. 2, n. 8, p. e280, 2008.

FAHEEM, M. et al. A molecular evaluation of dengue virus pathogenesis and its latest vaccine strategies. **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, n. 6, p. 3731-3740, 2011.

FARRAR, J. et al. Towards a global dengue research agenda. **Trop. Med. Int. Health**, v. 12, n. 6, Jun, p. 695-699, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 32, n. 1, p. 1999.

FINK, J.; GU, F.; VASUDEVAN, S. G. Role of t cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, n. 4, p. 263-275, 2006.

FLAMAND, M. et al. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein ns1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **J. Virol.**, v. 73, n. 7, p. 6104-6110, 1999.

FORATTINI, O. P. Evolutionary epidemiological thought on infections. **Rev. Saude Publ.**, v. 36, n. 3, p. 257-262, 2002.

FRANCO, O. **A história da febre amarela no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde. 1976.

FRY, S. R. et al. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. **PLoS Neglect. Trop. Dis.**, v. 5, n. 6, p. e1199, 2011.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

_____. Dengue/dengue haemorrhagic fever: History and current status. **Novartis Found. Symp.**, v. 277, p. 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253, 2006.

GUZMÁN MG; GARCÍA G; G., K. El dengue y el dengue hemorrágico: Prioridades de investigación. **Rev. Panam. Salud Públ.**, v. 19, p. 204-215, 2006.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: A continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, 2010.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 3, n. 6, p. 621-627, 1996.

HALSTEAD, S. B.; SHOTWELL, H.; CASALS, J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. li. Clinical laboratory responses to heterologous infection. **J. Infect. Dis.**, v. 128, n. 1, p. 15-22, 1973.

HARRIS, E. et al. Molecular biology of flaviviruses. **Novartis Found. Symp.**, v. 277, p. 23-39; discussion 40, 71-23, 251-253, 2006.

HESSE, R. R. Dengue virus evolution and virulence models. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 11, p. 1462-1466, 2007.

HU, D. et al. Kinetics of non-structural protein 1, igm and igg antibodies in dengue type 1 primary infection. **Viol. J.**, v. 8, n. 47, p. 422, 2011.

INNIS, B. L. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and japanese encephalitis co-circulate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, n. 4, p. 418-427, 1989.

KAO, C. L. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: Current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 38, n. 1, p. 5-16, 2005.

KORAKA, P. et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 9, p. 4154-4159, 2003.

KUMARASAMY, V. et al. Evaluation of a commercial dengue ns1 antigen-capture elisa for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. **J. Virol. Meth.**, v. 140, n. 1, p. 75-79, 2007.

KUROSU, T. et al. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 362, n. 4, Nov 3, p. 1051-1056, 2007.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, n., p. 71-92, 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein ns1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 8, p. 1165-1168, 2002.

LIMA, M. D. R. Q. et al. Comparison of three commercially available dengue ns1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in brazil. **PLoS Neglect. Trop. Dis.**, v. 4, n. 7, p. e738, 2010.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. Virus Res.**, v. 59, n., p. 23-61, 2003.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: The spread and resurgence of japanese encephalitis, west nile and dengue viruses. **Nat. Med.**, v. 10, n. 12 Suppl, p. S98-109, 2004.

MCBRIDE, W. J. H. Evaluation of dengue ns1 test kits for the diagnosis of dengue fever. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n. 1, p. 31-36, 2009.

MEDIN, C. L.; FITZGERALD, K. A.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus nonstructural protein ns5 induces interleukin-8 transcription and secretion. **J. Virol.**, v. 79, n. 17, p. 11053-11061, 2005.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Evaluation of an igg enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **J. Clin. Virol.**, v. 14, n. 3, p. 183-189, 1999.

MILLER, S. et al. The non-structural protein 4a of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2k-regulated manner. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 12, p. 8873-8882, 2007.

MUNOZ-JORDAN, J. L. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 24, p. 14333-14338, 2003.

NIESTERS, H. G. Clinical virology in real time. **J. Clin. Virol.**, v. 25, p. 3-12, 2002.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in brazil. **Cad. Saude Publ.**, v. 16, n. 1, p. 205-211, 2000.

OSANAI, C. H. et al. [dengue outbreak in boa vista, roraima. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

OSORIO, L. et al. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial ns1-based diagnostic tests for early dengue infection. **Virol. J.**, v. 7, n. 361, p. 422X-427, 2010.

PAHO. Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (dhf), region of the americas (by country and subregion) [homepage on the internet]: Pan american health organization; 2009. Disponível em: <http://www.Paho.Org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2008.Htm>. 2009.

PAUDEL, D. et al. Comparison of real-time sybr green dengue assay with real-time taqman rt-pcr dengue assay and the conventional nested pcr for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **North Am. J. Med. Sci.**, v. 3, n. 10, p. 478, 2011.

PEDRO, A. A dengue em nicteroy. **Brasil Méd.**, v. 1, n., p. 173-177, 1923.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: Dengue. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S30-38, 2010.

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

POERSCH, C. D. O. et al. Dengue virus infections: Comparison of methods for diagnosing the acute disease. **J. Clin. Virol.**, v. 32, n. 4, p. 272-277, 2005.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-977, 1998.

RIGAU-PEREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-977, 1998.

ROCHA, L. A. D.; TAUIL, P. L. Dengue em criança: Aspectos clínicos e epidemiológicos, manaus, estado do amazonas, no período de 2006 e 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 1, p. 18-22, 2009.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. From re-emergence to hyperendemicity: The natural history of the dengue epidemic in brazil. **PLoS Neglect. Trop. Dis.**, v. 5, n. 1, p. e935, 2011.

ROZENDAAL, J. A. **Vector control: Methods for use by individuals and communities.** World Health Organization. 1997.

SALUD, O. P. D. L.; BUREAU, P. A. S.; STAFF, P. A. S. B. **Dengue y dengue hemorrágico en las américas: Guías para su prevención y control.** Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 1995.

SAN MARTIN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: A worrisome reality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, n. 1, p. 128-135, 2010.

SCHILLING, S. et al. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. **J. Clin. Virol.**, v. 31, n. 3, p. 179-184, 2004.

SEKARAN, S. D. et al. Evaluation of a dengue ns1 capture elisa assay for the rapid detection of dengue. **J. Infect. Dev. Countr.**, v. 1, n. 2, p. 182-188, 2007.

SHU, P. Y. et al. Application of the dengue virus ns1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 4, p. 589-591, 2009.

SIQUEIRA JUNIOR, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, brazil, 1981–2002. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 1, p. 48, 2005.

SOUZA, V. A. U. F. D. et al. Sensitivity and specificity of three elisa-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. **J. Clin. Virol.**, v. 39, n. 3, p. 230-233, 2007.

TAUIL. Urbanization and dengue ecology. **Cad. Saude Publ.**, v. 17 Suppl, p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA, E. A. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in brazil: What research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cad. Saude Publ.**, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Inf. Epidemiol. Sus.**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TEMPORAO, J. G. et al. Dengue virus serotype 4, roraima state, brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, n. 5, p. 938-940, 2011.

TORRES, E. M. A transmissão. In: **Dengue y dengue hemorrágico**_ 1998.

VASCONCELOS, P. F. et al. A dengue epidemic in ipupiara and prado, bahia. A seroepidemiologic survey. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 1, p. 61-67, 2000.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 1, p. 2-9, 2000.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J. Virol.**, v. 74, n. 7, p. 3227-3234, 2000.

WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. Early diagnosis of dengue infection using a commercial dengue duo rapid test kit for the detection of ns1, igm, and igg. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 3, p. 690-695, 2010.

WANG, W. K. et al. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time pcr assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 12, p. 4472-4478, 2002.

WATTHANAWORAWIT, W. et al. A prospective evaluation of diagnostic methodologies for the acute diagnosis of dengue virus infection on the thailand-myanmar border. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, n. 1, p. 32-37, 2011.

WHO. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** New ed. Geneva: World Health Organization, 2009.

_____. **Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control.** 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1997.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein ns1 in the sera of infected patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.