

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de pós-graduação em Medicina Tropical

Paulo Sousa Prado

**Validação e confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy
Dengue Duo para o diagnóstico da dengue na rede de saúde
pública do Distrito Federal**

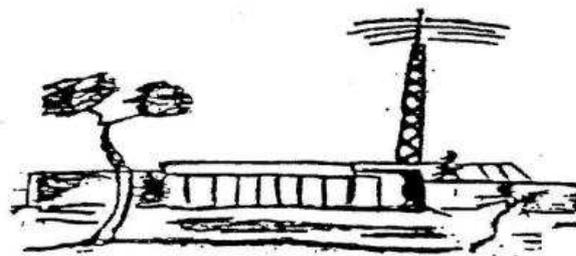
Brasília
2015

Validação e confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para o diagnóstico da dengue na rede de saúde pública do Distrito Federal

Paulo Sousa Prado

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical. Área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Gustavo Adolfo Sierra Romero



Brasília

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SM489v SOUSA PRADO, PAULO
Validação e confiabilidade do teste rápido SD
Bioeasy Dengue Duo para o diagnóstico da dengue na
rede de saúde pública do Distrito Federal / PAULO
SOUSA PRADO; orientador GUSTAVO ADOLFO SIERRA
ROMERO. -- Brasília, 2015.
98 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina
Tropical) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. VALIDAÇÃO DE TESTES. 2. DENGUE. 3. TESTE
RÁPIDO DE DENGUE. 4. DISTRITO FEDERAL. 5. LACEN. I.
SIERRA ROMERO, GUSTAVO ADOLFO, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Eu dedico esse trabalho aos meus pais, Wagner Marques Prado e Nelcina Sousa Prado, como uma pequena forma de honrá-los pela grande dedicação, e por não medir esforços para dar a mim e ao meu irmão um ensino de qualidade, o qual tem nos dado uma oportunidade de um futuro melhor. Obrigado por confiar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, que se faz presente a cada dia, me fortalecendo e me encorajando mesmo em momentos de angústia, desânimo ou tristeza. Não há outro igual a ti Senhor, toda a honra, glória e majestade sejam dadas a Ti.

Sei também que o caminho seria muito mais difícil, se não fosse o apoio incondicional da minha esposa Amanda Fernandes R. Prado, que durante todo esse tempo esteve ao meu lado, me ouvindo, aconselhando e até mesmo me ajudando no laboratório, abrindo mão de muitos momentos, por saber o quanto esse projeto é importante para mim. Te amo meu amor!!!

Não poderia deixar também de agradecer pela família linda que tenho, sempre acreditando no meu potencial e me estimulando a desenvolver algo, mesmo que pequeno, capaz de contribuir para a melhoria da realidade da saúde pública do nosso país. Refiro-me em especial ao meu irmão Tiago Sousa Prado (um gênio da engenharia), que mesmo trabalhando em área tão distinta da minha, a todo o momento esteve presente, e como sempre digo a ele: Você é referencial na minha vida, te amo. À minha cunhada/irmã Livia Neiva S. Prado, parceira de profissão, e minha fã, me estimulando sempre a levantar a bandeira dessa profissão tão bonita que é a biologia (Obs: Não esqueci, creio que ainda trabalharemos juntos no LACEN). Ao meu pai e minha mãe, Wagner Marques Prado e Nelcina Sousa Prado, por tanto amor e dedicação entregues a mim durante todos esses anos, o que contribuiu de forma inequívoca para a formação do meu caráter, tornando-me um servo de Deus, um profissional e aluno dedicado e um filho amado. Obrigado, vocês sempre estarão no meu coração. E como não poderia esquecer, a minha sobrinha, a Flor do tio, que mesmo pequenininha é capaz de despertar tanto amor.

Agradecer também aos meus amigos/colaboradores do Núcleo de Virologia do LACEN-DF. Dizer a: Eliane (Lili), Lucinda, Cristina, Marizoneide, Larissa e Simone que sem vocês seria impossível concluir esse trabalho. Eu posso dizer tranquilamente que tenho a melhor equipe de trabalho. Obrigado.

Reconhecer e agradecer também pelo trabalho memorável dos alunos de Medicina da Universidade de Brasília José e Lanna, que mesmo trabalhando nos bastidores, realizaram tarefas não menos importantes, viabilizando uma análise confiável dos resultados, garantindo assim a qualidade do trabalho.

À Lúcia, secretária da pós-graduação da Medicina Tropical, por toda a paciência, presteza e ajuda na padronização da dissertação.

Agradecer ao meu orientador Gustavo Adolfo Sierra Romero e a professora Maria Regina, por todo o apoio dado ao longo das disciplinas do mestrado e na construção da minha dissertação. Agradecer pelos livros emprestados, aulas cedidas e o tempo gasto pessoalmente no aprimoramento dos resultados do estudo. Tenho orgulho de fazer parte da equipe de pós-graduados da Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos D1F, D1C, D2F, D2C, D3F, D3C, D4F, D4C.....	50
Tabela 2: Sequência das sondas SD1, SD2, SD3, e SD4.....	51
Tabela 3: Características demográficas e clínicas de 1222 participantes com síndrome suspeita de dengue no Distrito Federal, 2014.....	58
Tabela 4: Composição de resultados para os 206 casos, referente às três metodologias padrão de referência: MAC-ELISA IgM, Isolamento Viral e RT-qPCR.	59
Tabela 5: Características demográficas e clínicas dos casos e não casos para o estudo de acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, Brasília, Distrito Federal 2014.	61
Tabela 6: Tabela 2x2 com os dados brutos da acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo. Brasília 2014	63
Tabela 7: Acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para o diagnóstico da dengue no Distrito Federal. Brasília 2014.....	64
Tabela 8: Distribuição dos resultados falsos negativos e verdadeiros positivos do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo entre as categorias definidas pela composição de resultados dos testes que compuseram o padrão de referência (MAC-ELISA IgM, Isolamento Viral e RT-qPCR). Brasília 2014.	65
Tabela 9: Comparação entre o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo e as metodologias padrão de referência (MAC-ELISA, RT-qPCR e Isolamento viral). Brasília 2014	66
Tabela 10: Acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo em cenários de infecção aguda e convalescente. Brasília 2014.	67

Tabela 11: Sensibilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para os casos com ou sem antecedente de infecção por dengue. Brasília 2014	68
Tabela 12: Tabela 2x2 com os dados brutos da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Componente NS1). Brasília 2014	75
Tabela 13: Tabela 2x2 com os dados brutos da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Componente IgM). Brasília 2014	75
Tabela 14: Tabela 2x2 com os dados brutos da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Componente IgG). Brasília 2014	75
Tabela 15: Tabela 2x2 com os dados brutos da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Componente IgM/IgG). Brasília 2014	76
Tabela 16: Concordância bruta, índice de prevalência e valor de Kappa para cada componente do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo.	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diferentes fases de desenvolvimento (ovo a adulto) do mosquito *Aedes aegypti*.. 20
- Figura 2:** Representação esquemática das proteínas do vírus da dengue.. 23
- Figura 3:** Ciclo de vida do vírus da dengue..... 23
- Figura 4:** Efeitos citopáticos do vírus da dengue em cultura de células de inseto C6/36. A) Células não infectadas; B) Células infectadas com o vírus da dengue demonstrando a formação de sincícios (setas)..... 27
- Figura 5:** Dispositivos que compõem o kit do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostics Inc., Korea*). A) Pipeta Pasteur; B) Dispositivo teste NS1; C) Dispositivo teste IgM/IgG; D) Pipeta capilar; E) Solução tamponada para a reação. 33
- Figura 6:** Representação esquemática de uma reação positiva para a presença do antígeno NS1 em uma amostra de paciente para o dispositivo teste NS1 do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Fonte: *Standard Diagnostics Inc., Korea*). 34
- Figura 7:** Mapa do Distrito Federal com a localização dos Hospitais Regionais selecionados para o estudo e o Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF)..... 39
- Figura 8:** Representação esquemática da execução do diagnóstico da dengue utilizando-se o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostics Inc., Korea*). A) Componente NS1; B) Componente IgM/IgG ... 46
- Figura 9:** Representação de alguns resultados possíveis para o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostics Inc., Korea*)..... 47

Figura 10: Técnica de imunofluorescência indireta em células de insetos C6/36. Fluorescência indicando a presença do vírus da dengue nas células C6/36	49
Figura 11: Diagrama de fluxo para o estudo de acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Bossuyt et al. 2003)	56
Figura 12: Sensibilidade do SD Bioeasy Dengue Duo Kit. Avaliação da sensibilidade do componente NS1, IgM e a combinação dos dois componentes NS1/IgM de acordo com o tempo de início dos sintomas até o momento da coleta da amostra de soro. Brasília 2014	71
Figura 13: Sensibilidade do SD Bioeasy Dengue Duo Kit. Avaliação da sensibilidade do componente NS1, IgM e a combinação dos dois componentes NS1/IgM, de acordo com a intensidade da absorbância (DO) do teste padrão de referência MAC-ELISA. Brasília 2014	72
Figura 14: Sensibilidade do SD Bioeasy Dengue Duo Kit. Avaliação da sensibilidade do componente NS1, IgM e a combinação dos dois componentes NS1/IgM, de acordo com o Ct do teste padrão de referência RT-qPCR. Brasília 2014.....	73

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	16
1.1.Dengue, distribuição e transmissão	16
1.2.Vírus da dengue e patogenia	21
1.3.Diagnóstico	<u>25</u> 24
1.3.1.Isolamento viral em cultura celular	25
1.3.2.Métodos sorológicos	<u>28</u> 27
1.3.3.Métodos moleculares	29
1.3.4. Testes imunocromatográficos rápidos.....	<u>31</u> 30
1.4.Teste imunocromatográfico rápido SD Bioeasy Dengue Duo	32
2.JUSTIFICATIVA	35
3.OBJETIVOS	37
3.1.Objetivo geral	37
3.2.Objetivos específicos	37
4.MÉTODOS	38
4.1.Tipo de estudo	38
4.2.Local do estudo.....	<u>39</u> 39
4.3.População de estudo	40
4.4.Critérios de inclusão e exclusão.....	<u>41</u> 41
4.5.Definição de caso suspeito de dengue	41
4.6. Amostragem.....	41
4.7.Padrão de referência.....	43
4.8. Mascaramento	44
4.9. Metodologias diagnósticas utilizadas para a detecção da dengue.....	44

4.9.1.SD Bioeasy Dengue Duo NS1 Ag, IgM/IgG teste.....	44
4.9.2.Detecção in vitro de anticorpos IgM pelo método MAC-ELISA	47
4.9.3.Isolamento do vírus da dengue em cultura celular.....	48
4.9.4.Detecção molecular pela técnica de PCR quantitativa.....	50
4.10. Análise da acurácia do teste rápido	51
4.11. Análise da concordância do teste rápido.....	53
4.12. Aspectos éticos	<u>53</u> 54
5.RESULTADOS.....	54
5.1. Fluxo de seleção e avaliação das amostras.....	54
5.2.Características clínicas e demográficas de todos os participantes do estudo	57
5.3.Características clínicas e demográficas dos casos e não casos de dengue	59
5.4.Acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo.....	62
5.5.Acurácia de cada componente do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo	69
5.6.Descrição do comportamento do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo em subgrupos definidos pelo tempo de sintomas, absorbância ou DO do MAC-ELISA e Ct do RT-qPCR.....	69
5.7.Especificidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para amostras armazenadas na soroteca do LACEN-DF	<u>74</u> 74
5.8.Confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo em cenários de atenção a saúde de diferentes níveis de complexidade.....	74
6.DISSCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	<u>77</u> 77
7.CONCLUSÃO	<u>90</u> 90
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<u>91</u> 92
9.APÊNDICE 1	<u>96</u> 96

RESUMO

Introdução: Atualmente a gestão do diagnóstico da dengue continua sendo um dos maiores desafios para os governos da maioria dos países da América Latina. O diagnóstico é complexo e até recentemente, apenas laboratórios especializados eram capazes de confirmar definitivamente uma infecção por dengue. No entanto, esta realidade tem sido alterada gradualmente com a disponibilização de testes rápidos imunocromatográficos capazes de detectar uma infecção por dengue rapidamente e podem ser aplicados até mesmo na atenção primária. O diagnóstico precoce é de grande interesse para uma gestão clínica eficiente, porque impede a progressão da doença para os casos mais graves, reduzindo a mortalidade para menos de 1%. Entre as várias técnicas disponíveis para o diagnóstico de dengue, os testes rápidos imunocromatográficos estão sendo usados cada vez mais no Brasil. Entretanto, a maioria desses testes não foram submetidos a uma validação científica na população brasileira. Neste contexto, o Distrito Federal, com a participação do Laboratório Central de Saúde Pública decidiu validar o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo recentemente introduzido no sistema público de saúde do Distrito Federal. **Objetivos:** Avaliar a acurácia (sensibilidade e especificidade) e a confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Standard Diagnostics Inc., República da Coreia) para os componentes do teste. A avaliação foi feita no ambiente onde o teste foi aplicado no sistema público de saúde do Distrito Federal. **Metodologia:** Foram coletadas 1353 amostras de sangue venoso entre julho de 2013 a julho de 2014. O tamanho da amostra foi calculado assumindo-se um $\alpha = 0,05$, precisão desejada = +/- 4%, sensibilidade esperada = 92,9%, especificidade esperada = 88,8%. Após os cálculos, 160 amostras positivas (casos) e 240 amostras negativas (controles), classificadas pelos testes padrão de referência, foram necessárias para a estimativa da sensibilidade e especificidade respectivamente, e para a avaliação de reprodutibilidade

utilizou-se 401 amostras. O padrão de referência utilizado foi composto pelo teste MAC-ELISA, isolamento viral e PCR em Tempo Real. As amostras foram consideradas como verdadeiras positivas quando, pelo menos, um dos testes de referência obteve um resultado positivo, e verdadeiro negativo quando, todos os três testes de referência foram negativos. As amostras foram obtidas dos Hospitais Regionais de Taguatinga, Ceilândia, Guará, Planaltina, Sobradinho e do LACEN-DF. A estimativa do intervalo de confiança de 95% foi calculada tanto para a acurácia dos componentes do teste rápido como também para o estudo de confiabilidade, utilizando o Epi Info v. 6.04. **Resultados:** Os resultados para a acurácia global do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, revelaram uma melhor sensibilidade para o componente NS1 (67%) do que para o componente IgM (35%). Há uma melhora substancial da sensibilidade do teste quando analisamos os componentes NS1/IgM em conjunto (76%). O teste apresentou uma alta especificidade, e não apresentou nenhuma reação cruzada com o painel de amostras positivas para outras doenças utilizadas no estudo. Em relação ao estudo de reprodutibilidade, desenvolvido entre as unidades de saúde selecionadas e o laboratório de referência LACEN-DF, os resultados foram satisfatórios, com um Kappa de 0,97 para NS1/IgM. **Conclusões:** Por ser o primeiro estudo de validação de um teste rápido imunocromatográfico de dengue no Brasil, a ser realizado prospectivamente e em larga escala, nossos resultados demonstraram a importância da avaliação da acurácia e reprodutibilidade na introdução de uma nova metodologia diagnóstica para o exame da dengue. O teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, apresentou uma alta especificidade e uma sensibilidade moderada. Portanto, sendo útil para confirmar o diagnóstico de dengue, mas não sendo suficiente para descartar o diagnóstico, e deve ser aprimorado em relação à sensibilidade. Nossos resultados sugeriram também que as condições imunológicas do paciente, resultantes do processo de infecção pelo vírus da dengue, podem influenciar diretamente a acurácia do teste.

ABSTRACT:

Introduction: Currently the management of dengue diagnosis remains a major challenge for governments of most countries in Latin America. The diagnosis is complex and until recently only specialized laboratories were able to definitely confirm dengue infection. However, this reality has been changed gradually with the available of immunochromatographic rapid tests can detect dengue infection quickly and can be applied even in point-of-care. Early diagnosis is of great interest for efficient clinical management, because it prevents the disease progression to more severe cases, reducing the mortality to less than 1%. Among several techniques available for the diagnosis of dengue, immunochromatographic rapid tests have been increasingly used in Brazil. However most of those tests have not undergone scientific validation in the Brazilian population. In this context the Federal District with the participation of the Central Public Health Laboratory decided to evaluate the rapid test SD Bioeasy Dengue Duo recently introduced in the public health system of the Federal District. **Aims:** To evaluate the accuracy (sensitivity and specificity) and the concordance of the rapid test SD Bioeasy Dengue Duo (Standard Diagnostics Inc., Korea) for NS1 and IgM components test. The evaluation was made prospectively in the field conditions in the public health system of the Federal District. **Methodology:** 1353 venous blood samples were collected between July 2013 and July 2014. Sample size was calculated with the following assumptions: $\alpha=0.05$, desired precision= $\pm 4\%$, expected sensitivity= 92.9%, expected specificity= 88.8%. Then, 160 positive samples (cases) and 240 negative samples (controls), as being classified by the reference standard, were required for sensitivity and specificity estimation respectively, and for concordance evaluation we used 400 samples. The Reference standard used was composed by MAC-ELISA, Virus Isolation and Real Time PCR. Samples were considered as true-positive when, at least one of the reference tests

had a positive result, and true-negative when, all the three reference tests were negative. Samples were obtained at the Regional Hospitals of Taguatinga, Ceilândia, Guará, Planaltina, Sobradinho and LACEN-DF. Point and 95% confidence interval estimates were calculated for accuracy measures of the Index test in each of its two components and for concordance, using Epi Info v. 6.04. **Results:** The results for the overall accuracy of the SD Bioeasy Dengue Duo test, showed better sensitivity for the NS1 component (67%) than for the IgM component (35%). There is a substantial improvement in test sensitivity when analyzing the NS1 / IgM components together (76%). The test showed high specificity and showed no cross-reactivity with the panel of positive samples for other diseases used in the study. Regarding the reliability study, developed between health facilities selected and reference laboratory LACEN-DF, the results were satisfactory, with a kappa of 0.97 for NS1 / IgM. **Conclusions:** For being the first validation study of dengue immunochromatographic rapid tests in Brazil, to be carried out prospectively and in large-scale, our results demonstrate the importance of evaluating the accuracy and reliability of a test before introduction a new diagnostic methodology for the examination of dengue. The rapid test SD Bioeasy Dengue Duo had a high specificity and moderate sensitivity. Therefore, it is useful to confirm the diagnosis of dengue, but not enough to rule out the diagnosis, and should be improved in sensitivity. Our results also suggested that the immunological conditions of the patient, resulting from the infection by the dengue virus process can directly influences the accuracy of the test.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Dengue, distribuição e transmissão

Dengue é a doença viral transmitida por vetores mais disseminada entre humanos. A Organização Mundial da Saúde estima que 50 milhões de pessoas são infectadas anualmente e 2,5 bilhões vivem em áreas de alto risco de infecção. Essas áreas estão localizadas nas regiões tropicais e subtropicais como o Sudeste Asiático, África, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental e Américas do Sul e Central. O número de casos aumentou aproximadamente 30 vezes nos últimos 50 anos (WHO 2009). Uma das principais razões para esse aumento de casos está relacionada, diretamente, ao rápido desenvolvimento da população e consequente urbanização, o que favorece a formação de criadouros naturais para o desenvolvimento das larvas do principal vetor da doença, o *Aedes aegypti*. Outros fatores também têm sido associados a esse aumento, como a falha no controle dos mosquitos vetores (Wang & Sekaran 2010; Gubler 2011).

Existem quatro sorotipos do vírus da dengue geneticamente e antigenicamente distintos (Dengue 1, 2, 3 e 4) (WHO 2009). Os quatro sorotipos podem causar o adoecimento em humanos e esse adoecimento pode ser caracterizado clinicamente desde formas mais brandas, como a dengue clássica (DC), até formas mais graves como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD) (Gubler 2006). Embora a infecção em humanos pelos quatro sorotipos da dengue já esteja bem descrita, em outubro de 2013 foi confirmado um novo sorotipo, o dengue 5. Esse novo sorotipo foi identificado apenas em um camponês de 57 anos na província de Sarawak, Malásia. Os estudos indicam que esse novo sorotipo é geneticamente similar ao sorotipo 2 e causa uma reação

moderada da doença (Mustafa et al. 2015). Os quatro vírus da dengue originaram-se em macacos e foram transmitidos independentemente para os seres humanos na África ou no Sudeste da Ásia entre 100 e 800 anos atrás. A dengue permaneceu relativamente irrelevante, sendo geograficamente restrita, até meados do século 20. Com o início da segunda guerra mundial, com o intenso transporte de carga e coincidentemente, o transporte dos mosquitos vetores ao redor do mundo, ocorreu a disseminação dos vírus. A FHD foi documentada pela primeira vez apenas na década de 1950 durante as epidemias nas Filipinas e na Tailândia. A partir de 1981 um grande número de casos de FHD começou a aparecer no Caribe e na América Latina, onde os programas altamente eficazes de controle do *Aedes* estiveram em vigor até o início da década de 1970 (Gubler 2006).

A re-emergência da dengue no Brasil está diretamente relacionada à reinfestação do país por *A. aegypti*. Antes da epidemia de Boa Vista, Roraima, em 1981/1982, o último registro de dengue havia ocorrido há quase 60 anos, em 1923 (Tauil 2002).

Nas décadas de 1950 e 1960, o Brasil e mais 17 países das Américas conseguiram eliminar o vetor de seus territórios. Porém, a partir de uns poucos países que não obtiveram o mesmo êxito, o Brasil enfrentou centenas de re-infestações, as quais foram detectadas precocemente e eliminadas. Em 1976, foi detectada uma infestação a qual não pôde ser eliminada, disseminando-se para outros estados como o Rio Grande do Norte e o Rio de Janeiro. A partir de então, o *A. aegypti* re-infestou todos os Estados da Federação e atualmente já foi detectado em quase 4.000 municípios (Tauil 2002).

Em 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) em consenso das Américas, alterou a classificação da dengue. A classificação foi simplificada para Dengue/Dengue grave substituindo a classificação de dengue clássica (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD). Alguns dos principais motivos associados a essa mudança estão: maior facilidade na definição correta dos casos de dengue para os estudos

clínicos, porque define mais precisamente a gravidade da doença e permite avaliar de forma dinâmica a progressão dos casos; descreve corretamente todas as formas clínicas de dengue grave; ajuda na reorganização dos serviços de saúde para a gestão de surtos; maior auxílio no diagnóstico presuntivo e acompanhamento da doença devido a sua alta sensibilidade e alto valor preditivo negativo (VPN) (Horstick et al. 2015).

No Brasil, o Ministério da Saúde no ano de 2013, considerado o ano da maior epidemia do país, apontou um aumento considerável dos casos notificados no primeiro trimestre, comparado com o mesmo período de 2012. Até o final de março foram 714.226 casos notificados, enquanto no mesmo período de 2012 foram 190.294, indicando um aumento de 375%. Em 2013 foram registrados mais de 1.417 casos graves, dos quais 132 vieram a óbito, sendo a região Sudeste a que mais apresentou número de óbitos (50 casos). A faixa etária que apresentou maior risco de morrer por dengue foi a de pessoas acima de 60 anos. As causas da concentração da letalidade nessa faixa etária não estão completamente esclarecidas, mas, podem estar relacionadas com a maior prevalência de doenças crônicas tais como doenças cardíacas, diabetes, entre outras (MS 2013).

Seguindo a mesma tendência do cenário nacional, o Distrito Federal, nos quatro primeiros meses de 2013, apresentou 4.676 casos confirmados, com coeficiente de incidência de 328,63 (por 100 mil habitantes), indicando um alto risco de transmissão (> 300 casos por 100 mil habitantes). Em relação à vigilância virológica, houve a circulação do dengue 1 (19 casos) e do dengue 4 (7 casos) com o registro de 14 óbitos (SVS 2013).

A distribuição mundial dos casos de dengue está associada à densidade e distribuição geográfica dos mosquitos vetores pertencentes ao gênero *Aedes*, e por ser uma doença transmitida por vetor artrópode, a dengue também pode ser classificada como uma arbovirose (“arbo” do inglês “arthropod borne”). A doença é transmitida por fêmeas de mosquitos pertencentes a esse gênero, sendo a espécie *A. aegypti* (figura 1) a mais prevalente nas Américas (Fonseca & Fonseca 2002). É um mosquito

doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos. Estes têm uma alta capacidade de resistir à dessecação, mantendo-se viáveis na ausência de água por até 450 dias. *A. aegypti* tem mostrado uma grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais consideradas desfavoráveis. Adultos já foram encontrados em altitudes elevadas e as larvas em água poluída (Tauil 2002).

Outro vetor transmissor de dengue no Sudeste Asiático, existente no Brasil desde 1986, é *A. albopictus*, até agora não encontrado naturalmente infectado no país. Possui uma valência ecológica bem mais ampla que *A. aegypti*, sendo encontrado também em ambiente silvestre, não passível, portanto, de eliminação. É um vetor secundário, uma vez que não é muito doméstico e nem muito antropofílico. Assim, mesmo que *A. aegypti* seja eliminado, ainda existe, mesmo que reduzido, o risco de transmissão de dengue por *A. albopictus* (Tauil 2002).

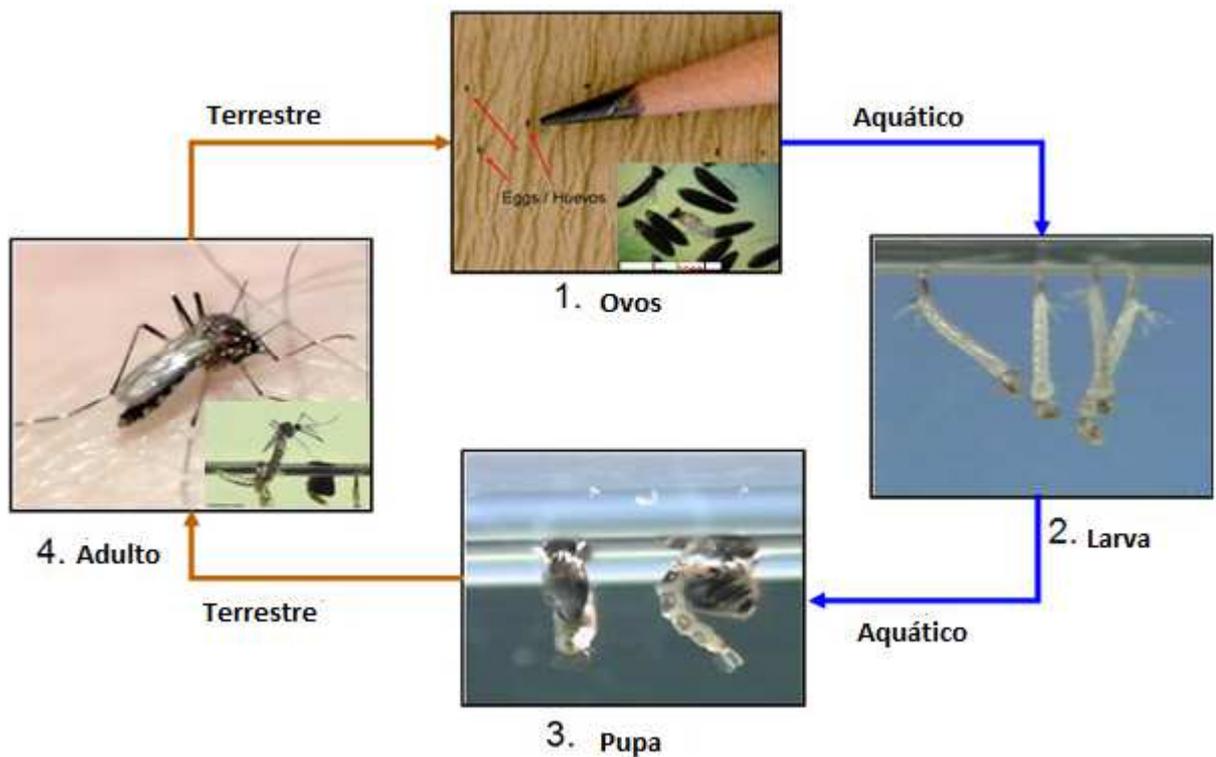


Figura 1: Diferentes fases de desenvolvimento (ovo a adulto) do mosquito *Aedes aegypti*.

Adaptado de http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html

Na dinâmica da doença, quando uma pessoa é picada por um mosquito infectado, ocorre um período de incubação que pode variar de três a 14 dias, sendo mais comum que dure uma semana. Esse período é assintomático e precede os primeiros episódios de febre comuns à doença (Rigau-Pérez et al. 1998). O período no qual o vírus pode ser isolado do sangue circulante, começa cerca de dois dias antes dos sintomas até cinco a seis dias depois, quando ocorre o clareamento da viremia e o aparecimento de anticorpos neutralizantes (Fonseca & Fonseca, 2002). O período de viremia torna o indivíduo infectado potencialmente infectante se este for picado por outro mosquito vetor ocorrendo assim, a disseminação da doença.

Em relação às manifestações clínicas a dengue clássica é geralmente autolimitada e é caracterizada por febre e uma variedade de sinais e

sintomas inespecíficos, tais como: dor de cabeça, mal-estar, fraqueza, erupções cutâneas e dores no corpo. A SCD se distingue da FHD pelo extravasamento de plasma, trombocitopenia marcada, e diátese hemorrágica, sendo que o extravasamento de um grande volume de plasma pode levar ao choque. A letalidade em pacientes não tratados com a FHD varia entre 10% e 20%, mas, pode atingir até 40% com a síndrome do choque. No entanto, o número pode ser reduzido a 0,2% em hospitais com profissionais capacitados para o manejo adequado da doença (Innis 1995).

Uma infecção primária confere imunidade protetora ao longo da vida contra o sorotipo infectante, mas, não confere proteção cruzada contra os outros sorotipos (Sierra et al. 2002). Um fator de risco para a FHD e SCD é uma segunda infecção com um sorotipo heterólogo. Outros fatores de risco incluem a idade, o período entre infecções por dengue, a etnia, bem como o sorotipo e o genótipo do vírus infectante (Rigau-Pérez et al. 1998).

Não existe atualmente vacina registrada contra a dengue e um dos meios de prevenção é por meio das ações da vigilância vetorial. Também não há terapêutica antiviral eficaz no mercado e a reposição de líquidos é o único tratamento para as formas graves da doença (Guzmán & Kourí 2004). Um diagnóstico oportuno, portanto, é de grande interesse para o manejo clínico eficiente, pois previne a evolução da doença para os casos mais graves o que resulta na diminuição na letalidade da doença. Além disso, o diagnóstico preciso e precoce permite dirigir a atenção para as formas mais graves e evita o uso desnecessário de antibióticos (Guzman et al. 2010).

1.2. Vírus da dengue e patogenia

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. A família *Flaviviridae* compreende três gêneros distintos: *Flavivirus* (gênero ao qual também pertence o vírus da Febre Amarela e uma série de vírus

relacionados a encefalites transmitidas por artrópodes), *Pestivirus* (vírus de suínos e ruminantes) e *Hepacivirus* (vírus da Hepatite C em humanos) (Fauquet & Fargette 2005).

O vírus da dengue é envelopado e sua organização genômica é composta por uma fita simples de RNA sentido positivo que codifica uma única poliproteína. Nos vírions maduros essa poliproteína é processada para a formação de três proteínas estruturais; proteína do Capsídeo (C), Membrana (M), e Envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5. Múltiplas cópias da proteína C envolvem o RNA genômico, formando o nucleocapsídeo. Esse nucleocapsídeo é coberto por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, na qual 180 cópias das proteínas M e E estão ancoradas (Figura 2 .Rodenhuis-Zybert et al. 2010).

Assim, de forma similar ao que ocorre com os vírus da influenza, os *Flavivirus* entram na célula por endocitose mediada por receptor. O ambiente acidófilo do endossomo é responsável por desencadear uma mudança na conformação das glicoproteínas de fusão (Bäck & Lundkvist 2013). Assim que ocorre a fusão entre a proteína (E) do envelope viral e a membrana do endossomo, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma celular e ocorre a tradução do RNA viral no Retículo Endoplasmático (RE). A poliproteína formada é processada após a tradução por proteases celulares e virais formando as três proteínas estruturais (C, pré-M e E) e as sete proteínas não estruturais (NS). Posteriormente, as proteínas (NS) iniciam a replicação do genoma viral e logo em seguida os novos RNA sintetizados são recobertos pela proteína C, formando o nucleocapsídeo. As proteínas pré-M e E formam heterodímeros (pré-M/E), originando as partículas imaturas do vírus (Rodenhuis-Zybert et al. 2010). A partícula passa pela via secretória do complexo de Golgi e a proteína pré-M é clivada por uma furino-protease e passa a assumir sua forma madura constituindo a proteína de Membrana (M). A clivagem permite que as partes da proteína E que se projetam do vírus fiquem mais evidentes e a saída do vírus ocorre por exocitose (Modis

et al. 2003). Acredita-se que tanto a proteína pré-M quanto o peptídeo “pré” agem como chaperonas estabilizando a proteína E durante a via secretória, prevenindo assim, mudanças conformacionais que poderiam desencadear a fusão precoce da proteína E. (Figura 3 Rodenhuis-Zybert et al. 2010).

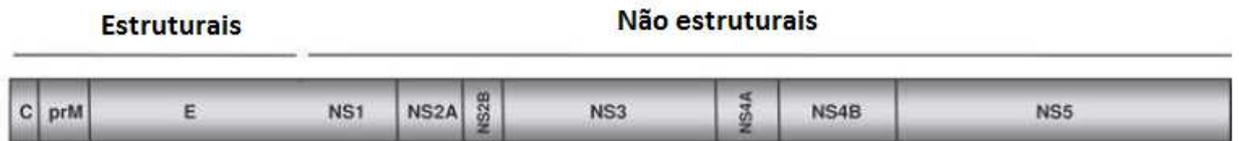


Figura 2: Representação esquemática das proteínas do vírus da dengue.

Adaptado de I. A. Rodenhuis-Zybert.

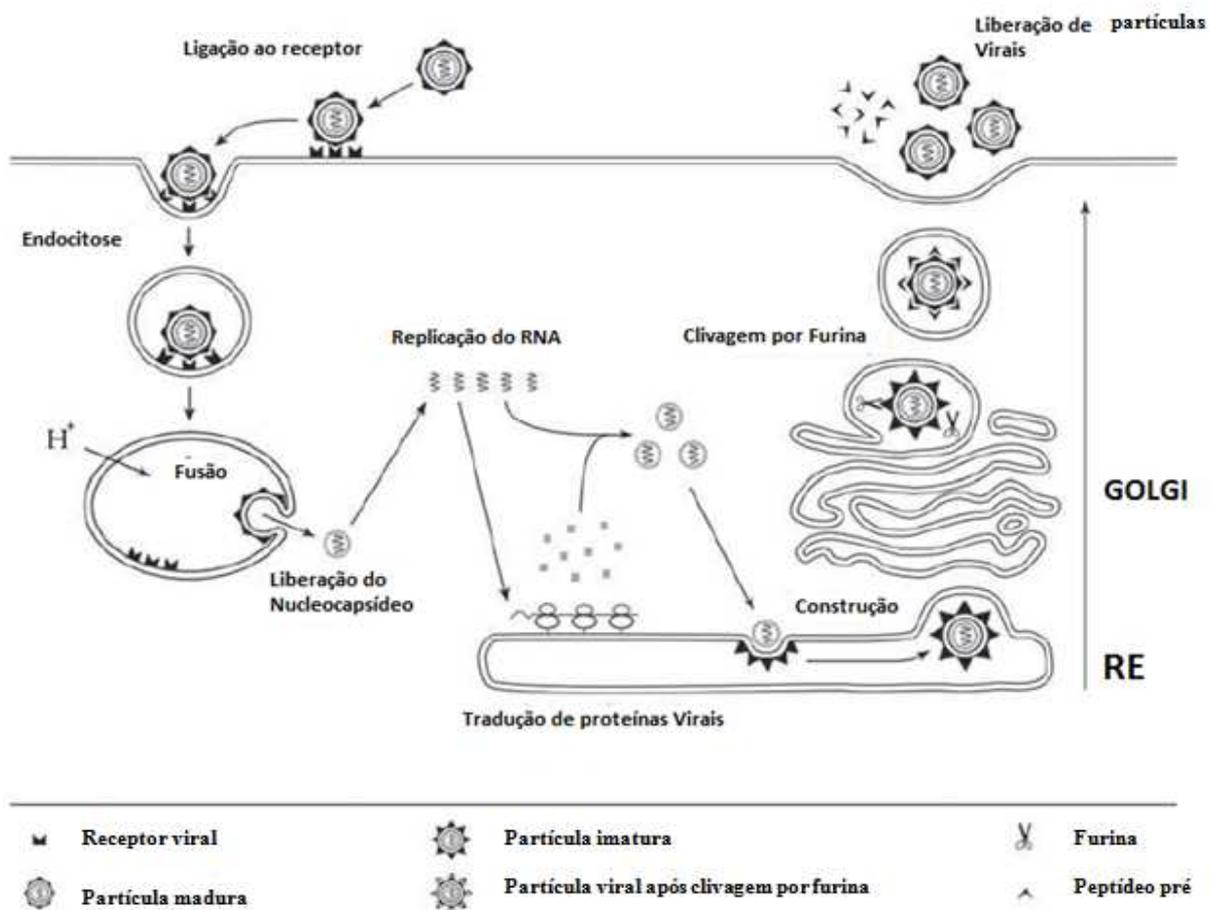


Figura 3: Ciclo de vida do vírus da dengue.

Adaptado de I. A. Rodenhuis-Zybert

Dentre as proteínas não estruturais, a NS1 desempenha um importante papel na patogenia da dengue, pois além de facilitar a infecção viral, também pode ocasionar a disfunção endotelial por meio da reação cruzada entre os anticorpos anti-NS1 com as proteínas do hospedeiro e das células endoteliais. Outro agravante mostrado por algumas pesquisas é que os anticorpos anti-NS1 podem ser importantes moduladores da via do complemento, protegendo o vírus da dengue no plasma, por meio da neutralização da via dependente de complemento (Bäck & Lundkvist 2013).

Ainda sobre a patogenia da doença, a teoria hoje mais aceita para a evolução da dengue para os casos mais graves FHD/SCD, é a “*antibody enhancement hypothesis*”. Essa teoria defende a ideia de que em uma segunda infecção desencadeada por um vírus heterólogo, os anticorpos sub-neutralizantes da primeira infecção facilitariam o transporte e a entrada dos vírus nas células do hospedeiro. Os anticorpos sub-neutralizantes ligados aos vírus formariam os imuno-complexos que se ligariam aos receptores Fc presentes na superfície das células permissivas, em especial células da linhagem mononuclear fagocítica (macrófagos), promovendo a internalização deste complexo. O resultado seria um maior número de células infectadas comparado com o número de células infectadas na infecção primária e uma carga viral maior (Bäck & Lundkvist 2013).

A carga viral mais elevada provocaria uma maior resposta inflamatória do hospedeiro elevando os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, que culminaria no aumento da permeabilidade capilar e ocorrência de hemorragias. Entretanto há questionamentos sobre o assunto, pois, quando ocorrem as hemorragias a concentração viral é muito mais baixa comparada com o pico da viremia e ainda existem pessoas que possuem uma alta carga viral e não apresentam hemorragias (Bäck & Lundkvist 2013).

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da dengue é laboratorial, uma vez que os sintomas clínicos podem ser facilmente confundidos com os de várias outras doenças. Atualmente, as técnicas mais comuns usadas nos laboratórios para o diagnóstico das infecções causadas pelo vírus da dengue são: o isolamento do vírus em cultura celular, detecção do ácido nucléico viral pela técnica de RT-PCR, e a detecção específica dos anticorpos da fase pós-virêmica. Cada metodologia possui suas limitações e algumas adaptam-se melhor às condições da rotina laboratorial de diagnóstico (De Paula & Fonseca 2004).

Uma característica importante do diagnóstico laboratorial da dengue, que precisa ser levado em consideração, é a ausência de um único teste diagnóstico que seja considerado como o padrão de referência. Essa característica afeta diretamente a análise da acurácia de um novo teste diagnóstico para a dengue, pois o ideal seria que esse novo teste fosse comparado com um teste de referência perfeito, entretanto, no caso específico da dengue existe a necessidade de se utilizar um padrão de comparação imperfeito, formado pelo resultado de uma combinação de testes.

1.3.1. Isolamento viral em cultura celular

A cultura viral requer que a amostra do paciente seja coletada até o quinto dia após o início dos sintomas, portanto, o período em que o vírus pode ser isolado com sucesso é bastante curto. A viremia inicia-se antes dos primeiros sintomas, e a concentração viral pode diminuir de forma significativa antes da procura por atendimento médico. Além disso, o aumento dos níveis de anticorpos, já nos primeiros dias após o início da

febre, pode interferir diretamente no resultado do isolamento viral em cultura celular.

Além das limitações na coleta de amostras, a cultura celular demanda tempo e bastante esforço. A amostra deve ser mantida congelada, o procedimento é realizado em laboratório de bio-segurança nível 2 e o treinamento dos profissionais deve ser realizado com rigor. Estes requisitos limitam a utilização mais ampla desta ferramenta de diagnóstico (WHO 1997).

A linhagem de células de *A. albopictus* C6/36 (CRL 166, ATCC) é a mais frequentemente utilizada para isolar o vírus da dengue a partir do material do paciente. As amostras biológicas adequadas para o isolamento do vírus incluem soro plasma ou sangue total sem a utilização de anticoagulantes na fase aguda. Em casos letais podem ser utilizados tecidos de necropsia, especialmente do fígado, baço, linfonodos e timo. Mosquitos coletados *in natura* também podem ser objeto de isolamento viral (WHO 1999).

A detecção inicial do vírus na cultura é feita pela observação de efeitos citopáticos nas células infectadas (figura 4) que passam a apresentar formação de sincícios e presença de células gigantes multinucleadas. Esta modificação é comum durante a infecção por flavivirus, então o isolamento viral é confirmado pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo (Guzmán & Kouri 2002).

A



B

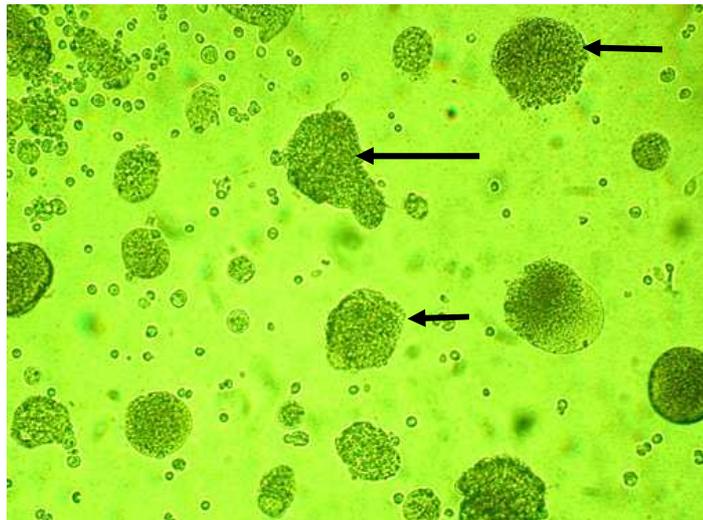


Figura 4: Efeitos citopáticos do vírus da dengue em cultura de células de inseto C6/36. A) Células não infectadas; B) Células infectadas com o vírus da dengue demonstrando a formação de sincícios (setas).

Fonte: Antônio de Jesus Melo Chaib e José Marcus Teixeira (LACEN-DF). Cedidas pelos autores

1.3.2. Métodos sorológicos

Os métodos sorológicos são baseados na detecção de antígenos virais ou de anticorpos específicos contra o vírus. Os métodos que detectam anticorpos não são prejudicados pelas limitações inerentes ao isolamento viral e à detecção de ácidos nucleicos pela PCR, e o tempo de coleta da amostra biológica pode ser mais flexível, pois os anticorpos IgM anti-dengue começam a ser detectáveis a partir do sétimo dia de início dos sintomas e perduram por aproximadamente três meses, já os anticorpos IgG podem ser detectados a partir do décimo quinto dia e permanecer por anos. Os anticorpos não são facilmente inativados e, portanto, não possuem as mesmas restrições de baixas temperaturas como as amostras para isolamento viral ou diagnóstico molecular (Bäck & Lundkvist 2013).

A execução das técnicas sorológicas para detectar anticorpos é relativamente simples e existem kits comerciais disponíveis, embora a detecção dos anticorpos IgM pelo método MAC-ELISA (do inglês: “*Enzyme linked immunosorbent assay*”) seja o mais amplamente utilizado na rotina. O MAC-ELISA anti-IgM é utilizado para a detecção de anticorpos na fase aguda que apresentam títulos bem mais altos em uma infecção primária, proporcionando um diagnóstico bastante sensível e rápido (De Paula & Fonseca, 2004). A principal desvantagem dos testes sorológicos é o risco de resultados falsos positivos devido à reação cruzada com outros flavivirus, por exemplo, no caso da resposta vacinal contra o vírus da febre amarela (Schwartz et al. 2000).

Devido às desvantagens dos métodos que detectam anticorpos para diagnosticar de forma acurada as infecções agudas, foram desenvolvidos métodos alternativos baseados na detecção da proteína NS1 do vírus. A proteína NS1 é detectável no soro por meio de um teste ELISA, a partir do

primeiro dia de febre até o nono dia após o início da sintomatologia. Testes ELISA baseados na detecção de NS1 tornaram-se uma importante ferramenta de diagnóstico para amostras obtidas de casos agudos em que a IgM ainda não é detectável e onde a PCR não esteja disponível (Alcon et al. 2002; Schilling et al. 2004).

Recentemente, uma pesquisa desenvolvida na Tailândia, em pacientes na fase aguda, avaliou a acurácia de sete kits comerciais para a detecção do antígeno NS1 e anticorpos IgM para o vírus da dengue, utilizando o método ELISA. Os resultados demonstraram que a sensibilidade e especificidade dos testes na detecção do antígeno NS1 variaram de 45% a 57% e de 93% a 100%, enquanto para a detecção de IgM a variação foi de 85% a 89%, e 88% a 100%, respectivamente. Combinando os resultados do antígeno NS1 e dos anticorpos IgM observou-se que um teste (*Standard Diagnostics, South Korea*) demonstrou o melhor desempenho, apresentando sensibilidade e especificidade de 87% e 96%, respectivamente (Blacksell et al. 2012).

1.3.3. Métodos moleculares

Apesar de bastante sensíveis, os métodos sorológicos não identificam a variedade viral infectante, principalmente devido à presença de reações cruzadas entre os diferentes sorotipos da dengue e outros flavivirus. As técnicas moleculares foram desenvolvidas para suprir esse tipo de necessidade e a técnica de RT-PCR (do inglês: "*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*"), por exemplo, é capaz de detectar vírus ligados a anticorpos neutralizantes e de identificar o sorotipo viral rapidamente. Além disso, essa técnica é capaz de detectar pequenas quantidades do vírus, seja por viremia baixa ou por má qualidade da amostra

ou por inadequação no armazenamento e transporte das amostras (Fonseca & Fonseca 2002).

A detecção do RNA viral em soro, plasma, sangue total ou células por meio da RT-PCR é baseada na utilização de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos, sendo uma metodologia rápida, robusta e altamente sensível na primeira fase da doença (Rigau-Pérez et al. 1998). A RT-PCR é especialmente útil em situações em que a cultura do vírus não obteve um bom resultado, entretanto, a coleta da amostra deve ocorrer durante a fase sintomática.

O RT-PCR é amplamente utilizado, por permitir a identificação e quantificação do material genético em um curto período de tempo e pode ser desenvolvida de acordo com uma diversidade de protocolos para a detecção do vírus da dengue. A técnica baseia-se na amplificação de regiões específicas do material genético do organismo, por meio da utilização de iniciadores específicos para a região alvo do genoma. Uma vez identificadas essas regiões específicas do genoma pelos iniciadores ocorre a amplificação exponencial desse segmento específico do cDNA. As duas principais tecnologias associadas ao método quantitativo de RT-PCR conhecido com RT-PCR Tempo Real (RT-qPCR) são: o sistema TaqMan® (Roche Diagnostics) que utiliza sondas de hidrólise marcadas em uma das extremidades com um fluoróforo e a outra extremidade com o “Quencher” e o sistema SYBR Green, que utiliza sondas intercalantes marcadas com um corante. A sensibilidade em ambas as tecnologias é bastante próxima, 81% e 84% respectivamente, entretanto, a especificidade do sistema TaqMan é maior que o SYBR Green, com 74% e 66% respectivamente (Paudel et al. 2011). As principais desvantagens associadas a essa metodologia é o alto custo dos insumos e equipamentos necessários e as instalações para o desenvolvimento dessas metodologias não estão amplamente disponíveis nas clínicas e ambientes hospitalares, dificultando a sua aplicação no cenário da atenção primária (Wang & Sekaran 2010).

1.3.4. Testes imunocromatográficos rápidos

Outra metodologia diagnóstica para o vírus da dengue que tem mostrado bastante aceitação no ambiente hospitalar e clínico, são os testes imunocromatográficos rápidos (RDTs pelas suas siglas em inglês *Rapid Diagnostic Tests*) que tem a vantagem de disponibilizar um resultado mais rapidamente ainda na fase precoce da doença, podendo ser executados em ambientes que não necessitam de recursos tecnológicos complexos. Há uma grande variedade de RDTs, sendo que a principal diferença entre eles é o tipo de marcadores biológicos detectados por cada teste. Alguns detectam apenas IgM já outros como o *SD Bioesy Dengue Duo* (*Standard Diagnostics Inc., Korea*) tem a capacidade de detectar tanto IgM como NS1 e IgG (Blacksell et al. 2011).

Com o aumento do número de RDTs comercializados, um dos maiores desafios enfrentados pelo sistema de saúde é a verificação da acurácia desses testes para instruir a tomada de decisão sobre o seu uso em larga escala.

Um trabalho desenvolvido em 2006 detectou que 23 RDTs já estavam disponíveis comercialmente para o diagnóstico da doença durante a fase aguda, dentre esses, oito foram selecionados para avaliação da acurácia. Os resultados demonstraram baixa sensibilidade, variando de 6,4% (intervalo de confiança de 95% [IC 95%], 4,0% a 9,7%) a 65,3% (IC 95%, 59,9% a 70,5%) e a especificidade variou de 69,1% (IC 95%, 61,4% a 76,0%) a 100% (IC de 95%, 97,8% a 100%). Apenas dois testes tinham sensibilidades maiores que 50%, o que é considerado clinicamente útil, e destes, um apresentou relativamente uma baixa especificidade (69,1%). Outro dado importante do estudo foi que amostras coletadas no início da infecção eram menos propensas a terem um resultado positivo do que aquelas coletadas

em estágios mais tardios da infecção. A estabilidade térmica também foi aferida e alguns RDTs demonstraram uma perda de desempenho quando armazenados a uma temperatura ambiente elevada durante três meses (Blacksell et al. 2006).

Assim, com o aumento da incidência da infecção por dengue, um diagnóstico altamente sensível e específico, realizado ainda no início da doença permite a intervenção clínica oportuna, a investigação etiológica e o controle da doença. Portanto, o diagnóstico da doença durante a fase aguda deve ser uma prioridade e uma preocupação da saúde pública (Wang & Sekaran 2010).

1.4. Teste imunocromatográfico rápido SD Bioeasy Dengue Duo

O SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostic Inc., Korea*) é um imunoensaio qualitativo para a detecção simultânea tanto do antígeno NS1 quanto de anticorpos IgG e IgM da Dengue viral humana em mistura de soro, plasma e sangue total.

Os dispositivos do teste são: Dispositivos tipo cassetes NS1 e IgM/IgG; pipetas; capilares e solução tamponada (figura 5).



Figura 5: Dispositivos que compõem o kit do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostics Inc., Korea*). A) Pipeta Pasteur; B) Dispositivo teste NS1; C) Dispositivo teste IgM/IgG; D) Pipeta capilar; E) Solução tamponada para a reação.

Os dispositivos de teste são selados em uma bolsa de alumínio com dessecante. Pode-se conservar a qualquer temperatura compreendida entre 15 e 30°C (não é recomendável armazenamento em refrigerador).

As principais precauções recomendadas pelo fabricante para um bom desempenho do teste são: executar o teste imediatamente depois de retirar o dispositivo de teste da embalagem; não reutilizar os dispositivos de teste; antes de usá-los, deixar que todos os componentes do kit e amostras atinjam a temperatura ambiente; não trocar os componentes do kit com números de lote diferentes.

Quanto aos dispositivos cassetes, no lado esquerdo do dispositivo de teste encontra-se o teste rápido DENGUE NS1 Ag. Um ensaio de único

passo, *in vitro*, imunocromatográfico, designado para a determinação qualitativa do antígeno do vírus da dengue, o NS1, em soro, plasma e sangue total. O dispositivo de teste contém uma membrana ou fita marcada com anticorpos anti-dengue NS1. O NS1 Ag anti-dengue-conjugado de ouro coloidal e a amostra movem-se ao longo da membrana cromatográfica até a região de teste e origina uma linha visível (linha “T”) quando se forma o complexo anticorpo-antígeno-anticorpo (Figura 6).

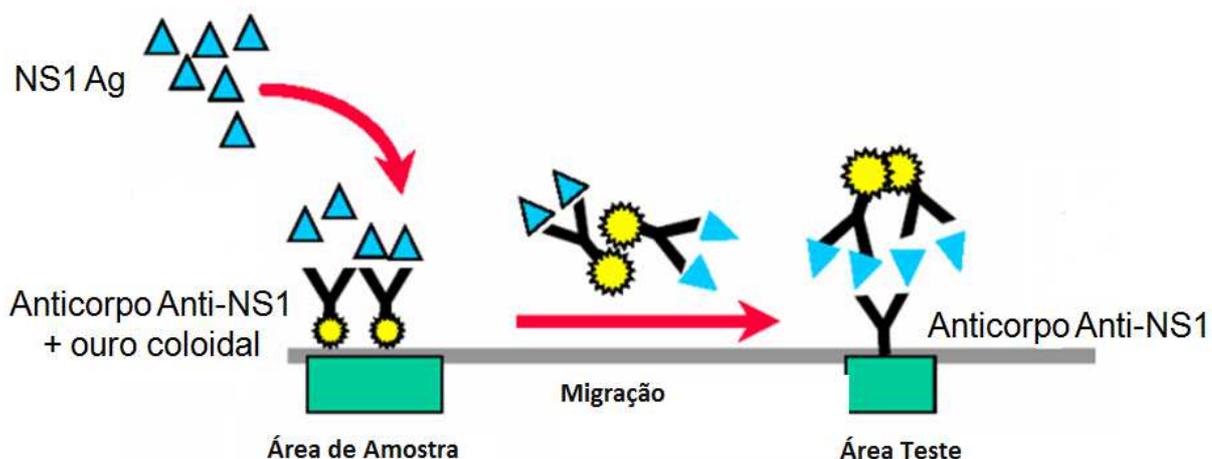


Figura 6: Representação esquemática de uma reação positiva para a presença do antígeno NS1 em uma amostra de paciente para o dispositivo teste NS1 do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo.

Fonte: *Standard Diagnostics Inc., Korea*

No lado direito do dispositivo encontra-se o teste DENGUE IgG/IgM. Um ensaio imunocromatográfico de fase sólida para detecção rápida, qualitativa e diferencial de anticorpos IgG e IgM para o vírus da dengue em amostras de soro, plasma e sangue total. O princípio baseia-se na reação dos anticorpos anti-dengue IgG e IgM presente nas amostras reagirem com proteínas recombinantes do envelope viral conjugadas com ouro coloidal, presentes do dispositivo do teste. O complexo anticorpo-antígeno move-se ao longo da membrana cromatográfica até a região de teste, reagindo com um anti-anticorpo humano IgG e/ou IgM gerando a coloração na linha-teste.

Os resultados do teste devem ser interpretados visualmente após 15 a 20 minutos. Qualquer intensidade de coloração na linha “T” (teste) deve ser interpretada como positivo.

Ainda em relação aos resultados do SD Bioeasy Dengue Duo, espera-se detectar o NS1 a partir do primeiro dia após o aparecimento de febre e que o mesmo persista mais de nove dias tanto em infecções primárias como secundárias, se forem produzidos anticorpos anti-NS1, a detecção de NS1 é inibida. Dengue primária caracteriza-se pela presença de IgM detectável em três a cinco dias após a manifestação de infecção. Dengue secundária é caracterizada pela elevação de IgG específico em um a dois dias após a manifestação de infecção e na maioria dos casos isso é geralmente acompanhado de uma elevação de IgM (Blacksell et al. 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a falta de especificidade dos sintomas e sinais da infecção por dengue, os testes laboratoriais são essenciais para abordar adequadamente o diagnóstico diferencial ainda na fase aguda da síndrome suspeita. Entretanto, em várias regiões endêmicas para a dengue o diagnóstico laboratorial ainda continua sendo precário, o que resulta em prejuízo para o controle e prevenção da doença e principalmente para a redução da letalidade.

Na sua maioria essas dificuldades estão associadas aos baixos recursos disponibilizados aos laboratórios, a descontinuidade no fornecimento dos insumos necessários para a realização dos exames e o desenvolvimento de metodologias diagnósticas complexas, exigindo do profissional que realiza o diagnóstico um conhecimento específico de cada metodologia e uma permanente atualização desse conhecimento, pois, trata-se de uma área com constantes modificações tecnológicas. Uma

abordagem possível para reduzir as dificuldades relacionadas ao diagnóstico laboratorial da dengue seria a aquisição de um teste capaz de disponibilizar um resultado rápido e confiável, com acurácia adequada para o diagnóstico clínico.

Assim, as características de um teste diagnóstico ideal seriam definidas pelos seguintes critérios: 1. Acessível (por aqueles em risco de infecção); 2. Sensível (poucos falso-negativos); 3. Específico (poucos falso-positivos); 4. Fácil manipulação (simples execução exigindo o mínimo de treinamento); 5. Rápido (para permitir o tratamento na primeira visita do paciente) e de fácil armazenamento (não requer armazenamento refrigerado); e 6. Execução manual independente de aparelhos (Blacksell 2012).

Recentemente a Secretaria de Saúde do Distrito Federal, com o objetivo de agilizar e aumentar a acessibilidade ao diagnóstico da dengue, adquiriu o teste rápido para o diagnóstico da dengue SD Bioeasy Dengue Duo, registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e liberado para comercialização. No ano de 2011, esse mesmo teste foi alvo de um estudo no Sri Lanka que avaliou e comparou a acurácia no diagnóstico da infecção aguda da dengue entre seis testes rápidos. Em relação à detecção do antígeno NS1 a sensibilidade e a especificidade apresentadas pelo teste foram de 48.5% e 99.4% respectivamente, já para a imunoglobulina IgM os resultados foram de 79.2% e 89.4%. Quando o NS1 e o IgM foram analisados em conjunto a sensibilidade e a especificidade da combinação obteve um melhor desempenho, com sensibilidade e especificidade de 92.9% e 88.8% respectivamente (Blacksell et al. 2011).

Atualmente não existe nenhum teste rápido para o diagnóstico da dengue no Brasil que tenha passado por um estudo científico de validação no próprio país. A maioria dos RDT passaram por estudos prévios ou de validação em populações de outros países, com características genéticas, morfofisiológicas e culturais bastante diferentes às do Brasil. Assim, há uma necessidade de ampliar os estudos de validação e o monitoramento da

introdução de novas metodologias diagnósticas no país, incluindo os testes rápidos.

Nesse contexto, o Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, LACEN-DF, desempenha um papel fundamental no monitoramento e acompanhamento da introdução de novas tecnologias diagnósticas na rede de saúde pública do Distrito Federal.

Portanto, com a introdução recente de um teste rápido no diagnóstico da dengue no Distrito Federal (DF) considerou-se de grande importância a realização da validação desse novo teste na população usuária da rede pública do DF, no intuito de fornecer dados de acurácia e confiabilidade obtidos localmente para oferecer à população uma maior segurança no diagnóstico da doença e apoiar de um modo mais científico as ações da vigilância epidemiológica e ambiental.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a acurácia e a confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostic Inc., Korea*) para o diagnóstico da dengue na rede de saúde pública do Distrito Federal.

3.2. Objetivos específicos

- Estimar a sensibilidade, especificidade, razões de verossimilhança positiva e negativa e valores preditivos positivo e negativo do teste

rápido na população com a síndrome suspeita de dengue na rede de saúde pública do Distrito Federal.

- Estimar a especificidade do teste rápido em amostras de soro armazenadas na soroteca do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal.
- Avaliar a reprodutibilidade do teste rápido em cenários de atenção a saúde de diferentes níveis de complexidade.

4 MÉTODOS

4.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo com os seguintes componentes:

- Estudo de validação de fase III (Boelaert et al. 2007) realizado prospectivamente em larga escala em participantes com a síndrome suspeita da doença, pertencentes à população-alvo da aplicação do teste;
- Estudo da especificidade, de fase II (Boelaert et al. 2007), em amostras selecionadas em soroteca com diagnóstico confirmado de outras doenças;
- Estudo da confiabilidade entre observadores e entre unidades do sistema de saúde com diferentes níveis de complexidade.

4.2. Local do estudo

Foram selecionadas seis unidades de saúde, assim distribuídas: cinco hospitais regionais, sendo eles: Hospitais Regionais de Ceilândia, Guará, Taguatinga, Sobradinho e Planaltina; e o Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (Figura 7).

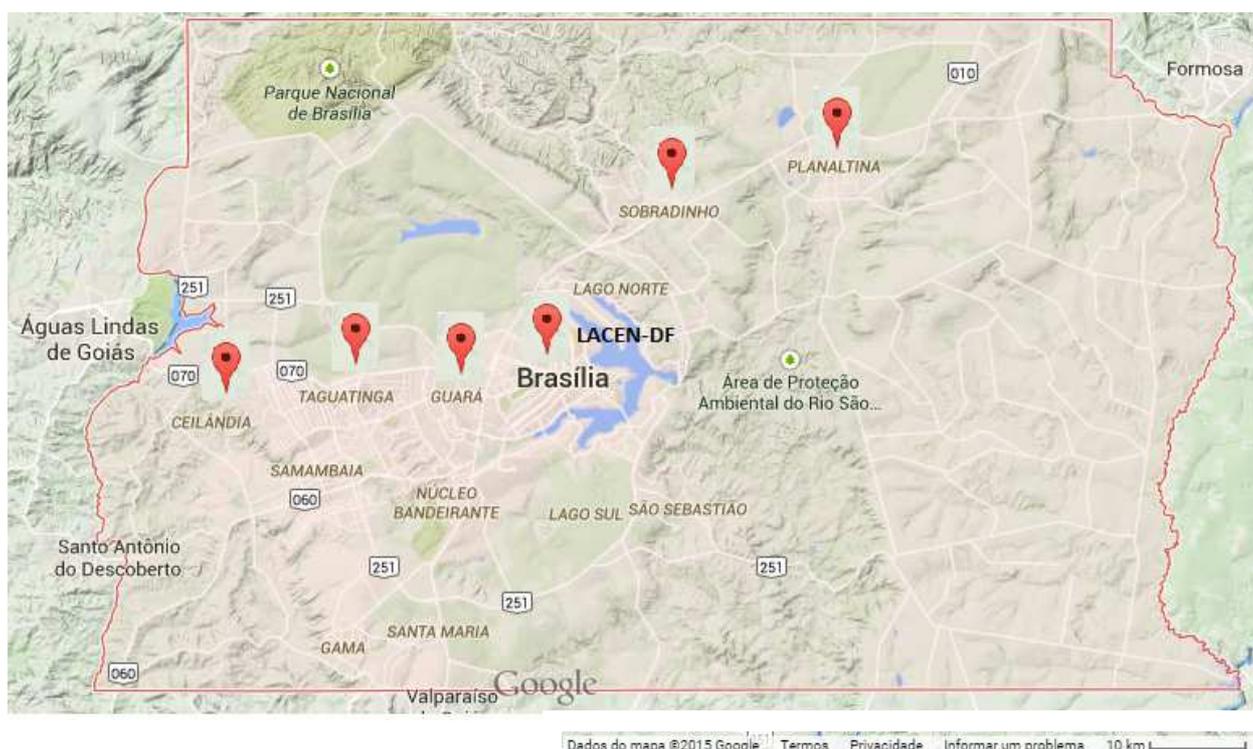


Figura 7: Mapa do Distrito Federal com a localização dos Hospitais Regionais selecionados para o estudo e o Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF).

Fonte: Adaptado de <https://www.google.com.br/maps/place/Distrito+Federal>.

A escolha dessas unidades de saúde considerou critérios baseados na capacidade de acolhimento dos pacientes, na infraestrutura física e tecnológica necessárias ao desenvolvimento do projeto e para os hospitais regionais, se possuíam o Núcleo de Vigilância Epidemiológica.

Todos os seis hospitais regionais selecionados são de atenção secundária e possuíam infraestrutura física adequada, sendo compostos por; sala de acolhimento e triagem dos pacientes, sala de coleta de amostras biológicas, laboratório de análises clínicas e o Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Os laboratórios possuíam suporte tecnológico, com instalação dos sistemas laboratoriais Labtrak e TrakCare e os Núcleos de Vigilância Epidemiológica com acesso ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação).

O LACEN-DF, que possui a função de coordenar e supervisionar os laboratórios da rede de saúde do Distrito Federal, é referência regional para o diagnóstico da dengue. Composto em parte pelo Núcleo de Recepção, responsável pelo acolhimento e triagem dos pacientes e pelo Núcleo de Virologia, responsável pela execução do diagnóstico de média e alta complexidade da dengue. Composto por um parque tecnológico de alta qualidade com equipamentos tais como extratores de ácidos nucleicos automatizados, termocicladores de tempo real, sequenciador genético, dentre outros.

Os profissionais de saúde, incluindo os técnicos de laboratório de todos os hospitais regionais, envolvidos no diagnóstico da dengue, foram devidamente capacitados para o manejo adequado e a aplicação do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, previamente à execução do projeto. A capacitação foi ministrada por profissionais capacitados do LACEN-DF.

4.3. População de estudo

A população do estudo foi constituída pelos pacientes com a síndrome suspeita de dengue que procuraram atendimento nas unidades de saúde participantes, no período compreendido de julho de 2013 a julho de 2014.

4.4. Critérios de inclusão e exclusão

Os participantes foram selecionados consecutivamente no período de estudo dentre os pacientes que consultaram espontaneamente uma das unidades de saúde que participaram do estudo e preencheram os critérios de classificação para caso suspeito de dengue estabelecido pelo SINAN; concordaram em participar voluntariamente da pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e não apresentavam contraindicações para a extração de amostras de sangue venoso por punção percutânea.

4.5. Definição de caso suspeito de dengue

Caso Suspeito: Paciente com febre com duração máxima de 7 dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, prostração, exantema e com exposição à área com transmissão de dengue ou com presença de *A. aegypti* nos últimos quinze dias.

4.6. Amostragem

Para o cálculo do tamanho da amostra para a avaliação da acurácia foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Sensibilidade estimada de 92.9 % (Blacksell et al. 2011);

- Especificidade estimada de 88.8% (Blacksell et al. 2011);
- Intervalo de 95% de confiança;
- Precisão do IC95% de +/- 4% (semi-amplitude do IC95%).

Demonstração do cálculo:

Fórmula: $N = Z * Z (P(1-P)) / (D * D)$.

P= Proporção esperada (estimativa pontual prévia da sensibilidade ou especificidade)

D= Semi-amplitude do intervalo de confiança.

Z= 1,96 (Intervalo de Confiança de 95%)

Sensibilidade : $N = 1.96 * 1,96 (0,071(1-0,071)) / 0,04 * 0,04 = 160$

Especificidade : $N = 1.96 * 1,96 (0,112(1-0,112)) / 0,04 * 0,04 = 240$

Após os cálculos realizados, estimou-se que para a sensibilidade seriam necessárias 160 amostras positivas para a dengue pelo padrão de referência e para estimar a especificidade seriam necessárias 240 amostras negativas pelo padrão de referência.

Para o estudo da especificidade do teste rápido em amostras armazenadas na soroteca do LACEN-DF, foram selecionadas aleatoriamente 29 amostras procedentes dos Núcleos de Virologia, Bacteriologia e Parasitologia do LACEN-DF, com diagnóstico positivo para outras doenças infecciosas, com a seguinte distribuição: 10 amostras positivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), 10 para o vírus da hepatite C (HCV), 1 para leptospirose, 5 para leishmaniose, 2 para malária e 1 para rubéola.

Todas as amostras biológicas coletadas nas seis unidades de saúde que compuseram o painel de amostras para a validação do teste em estudo foram amostras de soro, pois é o único material possível de ser

analisado em todas as metodologias diagnósticas propostas para a validação do teste rápido em estudo. Todas as amostras foram encaminhadas ao LACEN-DF acompanhadas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice 1), contendo dados do paciente e informações clínicas relevantes.

Para o cálculo amostral na avaliação da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Proporção de positividade de 0,5
- Poder de 80%
- Hipótese nula $k=0,70$
- Kappa a ser detectável 0,8

Segundo Sim & Wright (Sim & Wright 2005) com esses parâmetros para o cálculo amostral para a análise da confiabilidade, seriam necessárias 401 amostras.

4.7. Padrão de referência

Foram considerados casos verdadeiramente positivos aqueles que tiveram resultado positivo em qualquer um dos seguintes testes: MAC-ELISA, isolamento viral ou amplificação do material genético viral pela PCR quantitativa (RT-qPCR). Os casos negativos foram aqueles que tiveram resultado negativo nas três provas descritas acima.

Com exceção do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo NS1, IgM/IgG, que foi executado tanto nas unidades de saúde quanto no laboratório de referência LACEN-DF, todas as outras metodologias diagnósticas que constituíram o padrão de referência foram executadas no LACEN-DF.

4.8. Mascaramento

Toda pessoa que se apresentou em alguma das seis unidades de saúde selecionadas e que preencheu os critérios de inclusão teve uma amostra de 3 a 5 mL de sangue venoso coletada e testada para o diagnóstico da dengue utilizando-se o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo NS1, IgM/IgG. Posteriormente foram executadas as metodologias de referência: MAC-ELISA, Isolamento Viral e RT-qPCR para o diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue.

Os membros da equipe que realizaram o teste SD Bioesy Dengue Duo NS1, IgM/IgG não tiveram conhecimento do resultado da avaliação nos testes de referência e vice-versa.

4.9. Metodologias diagnósticas utilizadas para a detecção da dengue

4.9.1. SD Bioeasy Dengue Duo NS1 Ag, IgM/IgG teste

Todas as amostras coletadas nas seis unidades de saúde para o painel de validação foram testadas com o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo logo após a coleta.

O procedimento de execução para a verificação da presença do Dengue NS1 Ag seguiu os seguintes passos:

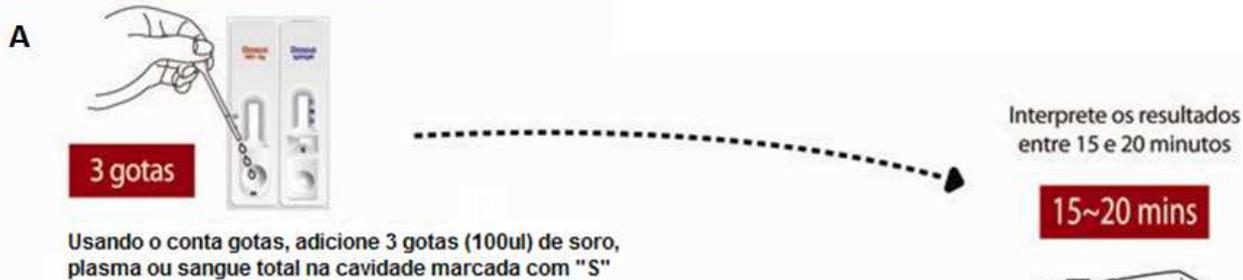
- Remoção do dispositivo de teste da embalagem de alumínio, e colocado em uma superfície seca e plana.

- Com a pipeta pasteur descartável que acompanha o teste foram adicionadas três gotas de soro, na cavidade de amostra (S).
- A interpretação do resultado do teste foi aferida entre 15 a 20 minutos após a adição da amostra. (Figura 8 A)

De modo semelhante e simultâneo o procedimento para a verificação da presença dos anticorpos IgM e IgG no soro do paciente seguiu os seguintes passos:

- Remoção do dispositivo de teste da embalagem de alumínio, e colocado em uma superfície seca e plana.
- Com a pipeta capilar de 10 uL que acompanha o teste, adicionou-se 10 uL de soro no orifício do cassete marcado com a letra "S".
- Logo após adicionar a amostra foram colocadas quatro gotas (cerca de 90 a 120 uL) de diluente para ensaio (tampão) no espaço indicado.
- A interpretação do resultado do teste foi aferida entre 15 a 20 minutos após a adição da amostra. (Figura 8 B)

[Dengue NS1 Ag]



[Dengue IgG / IgM]



Figura 8: Representação esquemática da execução do diagnóstico da dengue utilizando-se o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostics Inc., Korea*). A) Componente NS1; B) Componente IgM/IgG. Fonte: Adaptado Bula SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostics Inc., Korea*).

Para a interpretação visual dos resultados as amostras foram consideradas negativas quando apenas a linha "C" (controle) aparecia na janela de resultados do teste. Quando a linha "C" não aparecia na janela de resultados tanto no teste NS1 quanto no de IgM/IgG o teste foi considerado inválido sendo repetido com um novo dispositivo cassete. Já para considerar o resultado positivo era imprescindível a presença da linha controle "C" e da linha teste NS1 (amostra positiva para o antígeno NS1) - da linha teste IgM (amostra positiva para IgM) ou da linha teste IgG (amostra positiva para IgG). (Figura 9)

Cabe ressaltar que, conforme proposto pelo fabricante, qualquer intensidade de coloração detectada na linha T (teste) foi interpretada como positiva.



Figura 9: Representação de alguns resultados possíveis para o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostics Inc., Korea*).

Fonte: Adaptado Bula SD Bioeasy Dengue Duo (*Standard Diagnostics Inc., Korea*).

4.9.2. Detecção *in vitro* de anticorpos IgM pelo método MAC-ELISA

O MAC-ELISA é um ensaio de captura de anticorpos IgM específicos para a dengue no soro do paciente, por meio de anticorpos anti-IgM humana adsorvidos à placa do teste (placa sensibilizada).

Seguindo a metodologia de Kuno G. Gómez e Vorndam (Kuno et al. 1987) (Vorndam et al. 1997) a placa *Vinyl Alphanumeric "U" Bottom Microtiter Plates® 96 wells* (Thermo Electron Corporation) foi inicialmente sensibilizada com anticorpos anti-IgM humano, diluído em tampão carbonato pH 9,6. Após a sensibilização, 50uL dos soros (diluídos em albumina bovina a 0,5% em PBS pH 7,4) dos pacientes e dos controles (quatro controles positivos e três negativos) foram adicionados em cada poço da placa. Após a incubação da placa por 1 hora a 37°C, seguida de oito lavagens, foram

adicionados 50uL dos antígenos virais (dengue 1,2,3 e 4). Se no soro do paciente havia o anticorpo IgM dirigido para um destes antígenos, então se formou o complexo anti-IgM+IgM+antígeno. O resultado final do teste foi evidenciado pela adição de 25uL de conjugado (1:2000), que é um anticorpo para flavivirus ligado a enzima peroxidase, que produziu uma coloração esverdeada na presença de substratos específicos.

A leitura do teste foi feita por meio de métodos colorimétricos (densidade óptica - DO), utilizando o espectrofotômetro para leitura de placas de ELISA (*Asys Expert Plus*) com filtro de 405 nm. O ponto de corte na absorbância para a interpretação do teste como positivo foi 0,2. Foram considerados positivos os soros que apresentaram resultado maior ou igual a 0,2.

4.9.3. Isolamento do vírus da dengue em cultura celular

A técnica é baseada na sensibilidade das células C6/36 de *A. albopictus* a vários arbovírus incluindo os flavivirus da dengue e da febre amarela. Antes da inoculação do soro do paciente, as células passaram por um processo de preparação baseado no repique dessas células. Segundo lagarashi (lagarashi, 1978) esse procedimento foi realizado escolhendo-se uma garrafa de cultura celular (75mL e área de 25cm²) com uma concentração de aproximadamente 300.000 células/mL, previamente analisadas ao microscópio, contendo 5 mL de meio Leibovitz (L-15) completo. De cada garrafa selecionada que continha 5 mL do meio Leibovitz, pelo procedimento de repique foi distribuído 1 mL do meio contendo as células C6/36 em cada tubo de cultura (16 x 125mm). Esses tubos permaneceram por dois dias incubados a 28°C em ângulo de 170°, após esse período nos tubos que apresentaram uma monocamada celular confluyente e não apresentaram contaminações ou alcalinização do meio foi realizada a inoculação das amostras.

Em cada tubo de cultura foram inoculados 20uL do soro de cada paciente com suspeita de dengue. Após a inoculação a cultura celular foi incubada a 28°C por 10 dias. Durante o período de incubação a cultura foi analisada constantemente por microscopia óptica, para a verificação da presença de efeitos citopáticos.

Após os 10 dias de incubação, para cada amostra inoculada foi realizada a primeira técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpos policlonais para flavivirus (Gubler et al. 1984). Para as amostras positivas na primeira imunofluorescência foi realizada uma nova imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais para o vírus da dengue 1, 2, 3 e 4, no intuito de identificar os vírus (Figura 10). Todos os anticorpos utilizados na técnica foram fornecidos pelo Instituto Evandro Chagas (IEC).

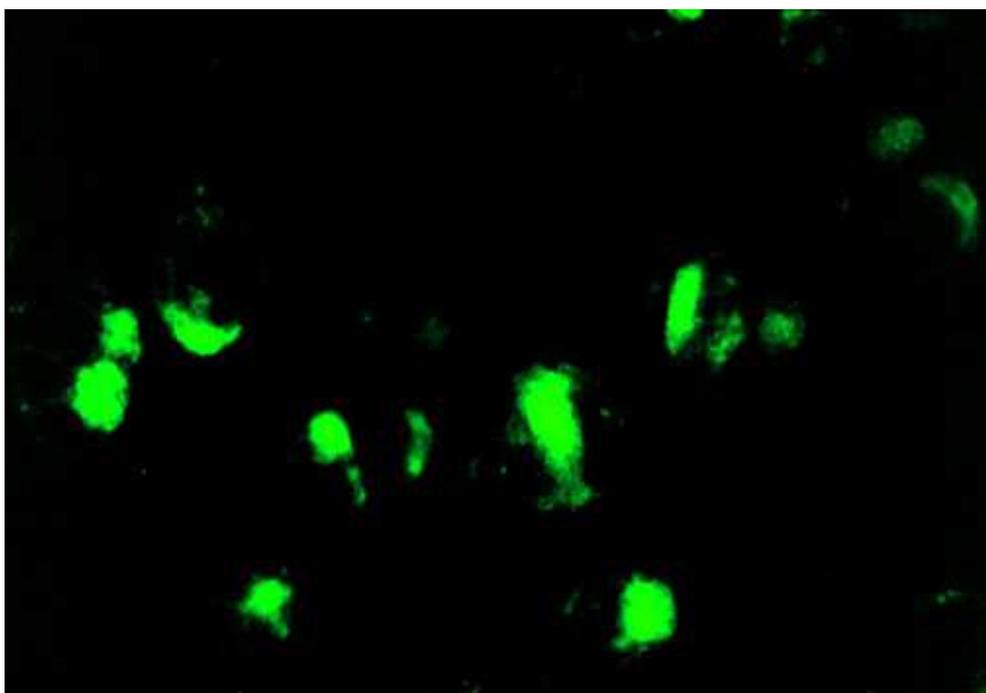


Figura 10: Técnica de imunofluorescência indireta em células de insetos C6/36. Fluorescência indicando a presença do vírus da dengue nas células C6/36.

Fonte: Antônio de Jesus Melo Chaib e José Marcus Teixeira (LACEN-DF).

4.9.4. Detecção molecular pela técnica de PCR quantitativa

A PCR quantitativa ou *Reverse Transcription* qPCR (RT-qPCR) foi realizada após a extração do RNA viral a partir das amostras biológicas de soro, coletadas dos participantes com suspeita de infecção pelo vírus da dengue, utilizando o kit *High Pure Viral Nucleic Acid Kit Version 18* (Roche Diagnostics).

O método utilizado para o RT-qPCR foi o sistema TaqMan® com sondas e iniciadores com sequências de oligonucleotídeos definidos previamente segundo protocolo publicado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Johnson et al. 2005) .

As sequencias de oligonucleotídeos das sondas e dos iniciadores utilizados na pesquisa estão especificadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos D1F, D1C, D2F, D2C, D3F, D3C, D4F, D4C.

Nome	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Posição no Genoma
D1F	CAA AAG GAA GTC GTG CAA TA	8973
D1C	CTG AGT GAA TTC TCT CTA CTG AAC C	9084
D2F	CAG GTT ATG GCA CTG TCA CGA T	1605
D2C	CCA TCT GCA GCA ACA CCA TCT C	1583
D3F	GGA CTG GAC ACA CGC ACT CA	740
D3C	CAT GTC TCT ACC TTC TCG ACT TGT CT	813
D4F	TTG TCC TAA TGA TGC TGG TCG	904
D4C	TCC ACC TGA GAC TCC TTC CA	992

Tabela 2: Sequência das sondas SD1, SD2, SD3, e SD4.

Nome	Sequência nucleotídica (5'-3')	Posição Genoma
SD1	FAM-CAT GTG GTT GGG AGC ACG C-BHQ	8998
SD2	HEX-CTC TCC GAG AAC AGG CCT CGA CTT CAA-BHQ	1008
SD3	Texas Red-ACC TGG ATG TCG GCT GAA GGA GCT TG-BHQ	762
SD4	Cy5-TTC CTA CTC CTA CGC ATC GCA TTC CG-BHQ	960

A RT-qPCR foi realizada em um único passo (*multiplex*), utilizando-se o Master Mix *LightCycler*® *Multiplex RNA Virus Master Version 03* (Roche Diagnostics). O volume final da reação foi de 20uL, sendo a concentração final dos iniciadores D1, D2, D3 e D4 de 0,5uM cada, e das sondas SD1, SD2, SD3 e SD4 de 200nM cada.

O termociclador utilizado para a RT-qPCR foi o *LightCycler*® *480 Instrument II* (Roche Diagnostics), e a programação da ciclagem seguiu o recomendado pelo fabricante do kit *LightCycler*® *Multiplex RNA Virus Master Version 03* (Roche Diagnostics), sendo dividida em quatro etapas: Transcrição Reversa, Desnaturação Inicial, Amplificação e Resfriamento. Para a interpretação dos resultados foi levado em consideração o Ct (*Threshold Cycle*) de cada reação. O Ct de cada reação significa o ciclo que marca a intersecção entre a curva de amplificação e a linha do *Threshold*. Para Cts entre 1 e 37 a amostra foi considerada positiva e para amostras que não obtiveram Ct ou que apresentaram Cts superiores à 37 foram consideradas negativas.

4.10. Análise da acurácia do teste rápido

A tabulação, o gerenciamento e a análise dos dados brutos foram realizados usando o Microsoft Excel 2007, e a análise estatística por meio do programa SPSS versão 20.0.

A sensibilidade, especificidade, eficiência, razões de verossimilhança positiva e negativa (RVP e RVN), valores preditivos positivo e negativo (VPP e VPN) para os ensaios foram calculados baseados nas amostras verdadeiramente positivas (MAC ELISA e/ou isolamento viral e/ou RT-qPCR positivas), usando as seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = a / (a + c) \times 100\%$$

$$\text{Especificidade (\%)} = d / (b + d) \times 100\%$$

$$\text{Eficiência (\%)} = (a + d) / (a + b + c + d) \times 100\%$$

$$\text{VPP (\%)} = a / (a + b) \times 100\%$$

$$\text{VPN (\%)} = d / (c + d) \times 100\%$$

$$\text{RVP} = (a / a + c) / (b / b + d)$$

$$\text{RVN} = (c / a + c) / (d / b + d)$$

Onde:

a = número de verdadeiros positivos

b = número de falsos positivos

c = número de falsos negativos

d = número de verdadeiros negativos.

As estimativas pontuais dos parâmetros de acurácia se avaliados foram apresentadas em percentagens com os respectivos intervalos de 95% de confiança (IC95%) (Altman et al. 2000).

4.11. Análise da concordância do teste rápido

O estudo de concordância entre os resultados obtidos para o teste rápido da dengue nas unidades de saúde do Distrito Federal e o laboratório de referência LACEN-DF foi realizado com 401 amostras e mensurado pela porcentagem de concordância bruta e pelo coeficiente de Kappa(k) com o respectivo IC95%.

O Kappa é uma medida de concordância interobservador para variáveis dicotômicas e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Esta medida de concordância tem como valor máximo 1, que representa total concordância e como valor mínimo 0, que indica concordância nula.

A hipótese testada é se o Kappa é igual a 0 ($H_0: K = 0$), o que indicaria concordância nula, ou se ele é maior do que zero ($H_1: K > 0$), concordância maior do que o acaso. O valor de Kappa foi interpretado segundo Landis & Koch, onde $k = 0$ quase inexistente; $k = 0,01$ a $0,20$ pequena; $k = 0,21$ a $0,40$ insatisfatória; $k = 0,41$ a $0,6$ satisfatória; $k = 0,61$ a $0,8$ substancial e $k = 0,81$ a $1,0$ quase perfeita (Landis & Koch 1977).

4.12. Aspectos éticos

Para a avaliação prospectiva das amostras e cumprimento dos dois primeiros objetivos específicos da pesquisa, uma autorização por escrito,

representada pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi assinada pelo paciente ou pelo seu representante legal. Para o cumprimento do terceiro objetivo específico, estimar a especificidade do teste rápido em amostras de soro armazenadas na soroteca do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, com o objetivo de analisar as possíveis reações cruzadas do teste em estudo com outras doenças infecciosas de relevância no Distrito Federal, foi solicitado a dispensa do TCLE ao comitê de ética local. O projeto cumpre com os preceitos da Declaração de Hensinki (Declaration of Helsingi- Seoul 2008) e com a resolução do Conselho Nacional de Saúde 446 de 12 de dezembro de 2012. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, PARECER 459.771, e teve o consentimento de todos os dirigentes das unidades de saúde selecionadas para o projeto.

5 RESULTADOS

5.1. Fluxo de seleção e avaliação das amostras

Durante o período do estudo, 1.353 participantes cumpriram com a definição de caso suspeito de dengue e tiveram suas amostras de soro coletadas para avaliação da infecção por dengue por meio do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo nas seis unidades de saúde selecionadas. Os 1.353 soros coletados nas unidades de saúde participantes foram enviados ao LACEN-DF para a verificação de adequação da amostra para a inclusão no estudo. Cento e trinta e uma (131) amostras foram excluídas pelos seguintes motivos: 43 foram consideradas inadequadas para a realização dos testes de referência; 51 amostras, por não ser verificada a assinatura do participante no termo de consentimento livre e esclarecido e 37 amostras, por não ter registro do resultado do teste rápido.

Após a verificação de adequação das amostras e inclusão de 1.222 no estudo, as amostras foram testadas consecutivamente pelas metodologias de referência, MAC-ELISA, Isolamento Viral e por último o RT-qPCR. Das 1.222 amostras testadas para o MAC-ELISA, 159 foram positivas e 1063 negativas. Consecutivamente foram testadas 562 amostras para o Isolamento Viral, sendo 210 positivas (MAC-ELISA + e/ou Isolamento Viral +) e 352 negativas (MAC-ELISA - e Isolamento Viral -). As 660 amostras remanescentes, armazenadas em biobanco, não foram testadas para o isolamento viral, pois os quantitativos de amostras positivas e negativas já eram suficientes para avaliação da acurácia do teste rápido. Das 562 amostras testadas tanto pelo MAC-ELISA quanto pelo Isolamento Viral, 452 foram testadas também pelo RT-qPCR, resultando em 206 “casos” (MAC-ELISA + e/ou Isolamento Viral + e/ou RT-qPCR +) e 246 não casos (MAC-ELISA - , Isolamento Viral - e RT-qPCR -). Cento e dez amostras testadas no MAC-ELISA e Isolamento Viral não foram testadas pelo RT-qPCR, permanecendo em biobanco, pois o quantitativo de amostras analisadas já tinham sido suficiente para o estabelecimento dos “casos” e dos controles (Figura 11).

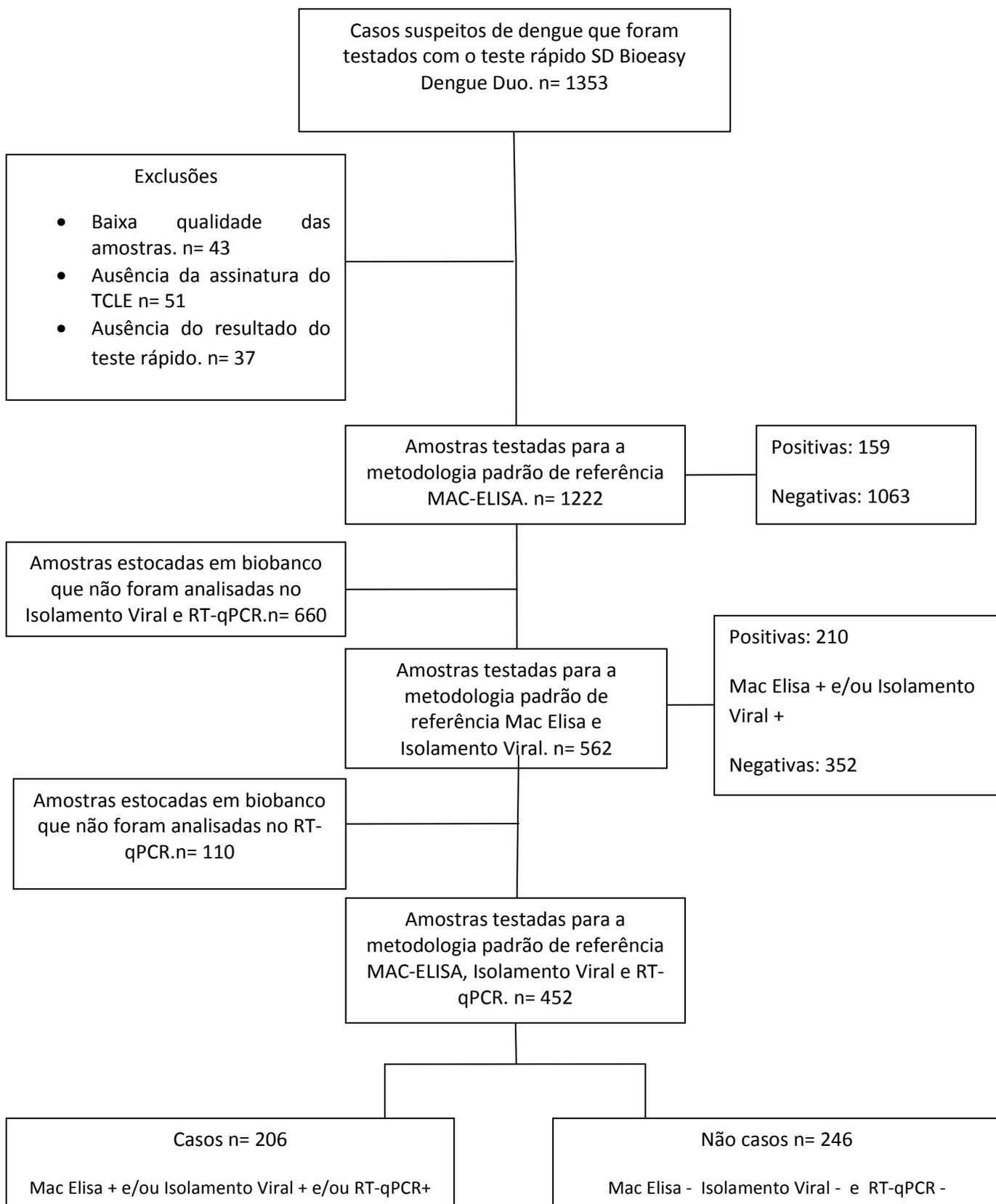


Figura 11: Diagrama de fluxo para o estudo de acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo. (Bossuyt et al. 2003).

5.2. Características clínicas e demográficas de todos os participantes do estudo

Dos 1.222 participantes do estudo, a maioria era do sexo feminino, representando 59,16% da amostra, e a média de idade foi 31,44 anos (DP=18,12 anos), sendo que a amplitude da variação da idade foi de 1 a 92 anos (Tabela 3).

A distribuição dos participantes de acordo com o início dos sintomas até a procura por assistência médica mostrou que a maior parte deles procurou assistência com até cinco dias após o início dos sintomas, 841 (68,82%). Outro dado que pode ser observado na tabela 3 é que mais de 90% dos participantes do estudo foram provenientes da unidade de saúde de Planaltina, demonstrando nitidamente que havia no momento do estudo uma predominância de casos suspeitos de dengue na região norte do Distrito Federal.

A maioria dos participantes relatou não ter tido episódios de dengue anteriores ao início do estudo (78,72%). A média de tempo entre o início dos sintomas e a realização do teste foi 4,6 dias (DP= 4,81). (Tabela 3).

Tabela 3: Características demográficas e clínicas de 1222 participantes com a síndrome suspeita de dengue no Distrito Federal, 2014.

Características	Valores (% ou DP)
Sexo (%)	
Masculino	499 (40,83)
Feminino	723 (59,16)
Idade (anos)	
Média (DP)	31,44 (18,12)
Variação	1 – 92
Mediana	36
Dias de sintomas (%)	
≤ 5 dias	841 (68,82)
> 5 dias	273 (22,34)
Não informado	108 (8,83)
Média (DP)	4,60 (4,81)
Mediana	2,5
Antecedente de episódio anterior de dengue (%)	
Sim	101 (8,26)
Não	962 (78,72)
Não informado	159 (13,01)
Unidades de Saúde (%)	
Sobradinho	61 (4,99)
Planaltina	1106 (90,50)
Guará	1 (< 1)
LACEN	1 (< 1)
Taguatinga	33 (2,70)
Ceilândia	20 (1,63)

Os resultados dos testes que compuseram o padrão de referência entre os casos (n= 206) demonstraram positividade em 143 amostras para o MAC-ELISA, 58 para o Isolamento Viral e 121 para RT-qPCR. A composição de resultados para as três diferentes metodologias padrão de referência estão demonstradas na tabela 4. Dentre os resultados positivos para a metodologia RT-qPCR, os sorotipos virais encontrados foram o dengue 1, 3 e 4, e a maior prevalência foi do sorotipo 1 em 95,04% das amostras. O sorotipo 1 foi o único identificado em todas as amostras positivas no isolamento viral.

Tabela 4: Composição de resultados para os 206 casos, referente às três metodologias padrão de referência: MAC-ELISA IgM, Isolamento Viral e RT-qPCR.

Padrão de Referência (Composição)	n (%)
Mac IgM + / Isolamento – / qPCR –	84 (40,77)
Mac IgM – / Isolamento + / qPCR –	1 (< 1)
Mac IgM – / Isolamento – / qPCR +	14 (6,79)
Mac IgM + / Isolamento + / qPCR –	0
Mac IgM + / Isolamento – / qPCR +	50 (24,27)
Mac IgM – / Isolamento + / qPCR +	48 (23,30)
Mac IgM + / Isolamento + / qPCR +	9 (4,36)
Total	206 (100)

5.3. Características clínicas e demográficas dos casos e não casos de dengue

Na Tabela 5 é demonstrada a comparabilidade entre casos e não casos em relação as variáveis demográficas e clínicas. Foi observado que o gênero predominante foi o feminino, com 59% para os casos e 63% para os controles. A idade dos participantes também foi semelhante entre os grupos, com média de 35,83 (DP=17,63) e 31,19 (DP=18,23) anos para os casos e não casos, respectivamente. A faixa etária com o maior número de casos confirmados de dengue pelos testes que compuseram o padrão de referência foi entre 21 e 40 anos (38%).

O tempo entre o início de sintomas até a realização do teste analisado de forma estratificada em ≤ 2 ; 3 a 4; 5 a 6; e ≥ 7 dias, revelou semelhança entre casos e controles. Observou-se que tanto para os casos quanto para os controles a faixa de dias de sintomas com maior predominância foi de três a quatro dias, com 26% e 31% respectivamente. Excluindo-se os

participantes para os quais não houve essa informação (“não informado”), a faixa de dias de sintomas com menor representatividade foi a de ≤ 2 dias (20%) para os casos; e a de ≥ 7 dias (12%) para os controles. Tabela 5.

Assim como para todos os participantes do estudo (Tabela 3), também para o grupo dos casos e dos não casos houve uma predominância de participantes da unidade de saúde de Planaltina, 90% para os casos e 84% para os controles. O mesmo pôde ser observado em relação aos participantes se casos ou controles já teriam tido dengue anteriormente ao início do estudo, sendo que a maioria informou que não tinham tido a doença: 71% e 76% para os casos e não casos, respectivamente (Tabela 5).

Em relação ao estado de evolução da síndrome suspeita de dengue os dados apresentados na tabela 5 foram estratificados em fase aguda (≤ 7 dias) ou fase convalescente (>7 dias). A maioria dos casos e não casos se encontravam na fase aguda da síndrome suspeita de dengue 81% e 79%, respectivamente.

Tabela 5. Características demográficas e clínicas dos casos e não casos para o estudo de acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, Brasília, Distrito Federal 2014.

Variáveis	Casos* n=206 Valores (%)	Não Casos** n=246 Valores (%)
Sexo		
Masculino	84 (40,77)	90 (36,58)
Feminino	122 (59,22)	156 (63,41)
Idade		
0 – 20	47 (22,81)	84 (34,14)
21 – 40	79 (38,34)	102 (41,46)
41 – 60	60 (29,12)	42 (17,07)
61 – 80	19 (9,22)	14 (5,69)
81 – 100	1 (< 1)	4 (1,62)
Média (DP)	35,83 (DP = 17,63)	31,19 (DP = 18,23)
Mediana	29,5	36
Dias de sintomas		
≤ 2	42 (20,38)	75 (30,48)
3 – 4	55 (26,69)	77 (31,30)
5 – 6	53 (25,72)	34 (13,82)
≥ 7	43 (20,87)	30 (12,19)
Não Informado	13 (6,31)	30 (12,19)
Unidade de Saúde		
Sobradinho	9 (4,36)	0
Planaltina	187 (90,77)	207 (84,14)
Guará	0	1 (< 1)
LACEN	0	1 (< 1)
Taguatinga	6 (2,91)	22 (8,94)
Ceilândia	4 (1,94)	15 (6,09)
Antecedente de episódio anterior de dengue		
Sim	21 (10,19)	19 (7,72)
Não	148 (71,84)	188 (76,42)
Não informado	37 (17,96)	39 (15,85)
Estado da Infecção		
Fase aguda (≤ 7 dias)	167 (81,06)	195 (79,26)
Fase convalescente (> 7 dias)	26 (12,62)	21 (8,53)
Não Informado	13 (6,31)	30 (12,19)

* Resultado positivo no MAC-ELISA e/ou no Isolamento Viral e/ou no RT-qPCR.

** Resultados negativo para todas as metodologias padrão de referência.

5.4. Acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo

Os dados brutos da acurácia do teste rápido foram expressos na tabela 6. Das 246 amostras negativas para as metodologias padrão de referência, que geraram a análise da especificidade do teste, quatro amostras obtiveram um resultado falso positivo para o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, sendo duas amostras positivas para NS1 e negativas para IgM e duas amostras negativas para NS1 e positivas para IgM. Os resultados da acurácia global do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo estão sintetizados na Tabela 7. Analisando em conjunto os componentes NS1/IgM, a especificidade do teste rápido foi de 98,37% (IC de 95%, 96,2% a 99,7%) (Tabela 6).

Para a verificação da sensibilidade do teste, foram utilizadas 206 amostras positivas confirmadas pelas metodologias de referência. Desse total, 49 amostras tiveram um resultado falso negativo para o teste rápido (Tabela 6), o que gerou uma sensibilidade de 76,21% (IC de 95%, 70,3% a 81,6%) quando analisamos em conjunto os componentes NS1/IgM (Tabela 7).

Para os componentes NS1/IgM o Valor Preditivo Positivo (VPP) calculado foi de 97,51% (IC_{95%}, 95,4% a 98,9%) e o Valor Preditivo Negativo (VPN) de 83,16% (IC_{95%} 79% a 86,9%). Os resultados encontrados demonstraram uma Razão de Verossimilhança Positiva (RVP) de 46 (IC_{95%} 14,3 a 100,6) e uma Razão de Verossimilhança Negativa (RVN) de 0,24 (IC_{95%} 0,09 a 0,63) (Tabela 7).

Tabela 6. Tabela 2x2 com os dados brutos da acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo. Brasília 2014

		Padrão de referência*		
		Positivo	Negativo	Total
NS1/IgM	Positivo	157	4	161
	Negativo	49	242	291
	Total	206	246	452

* MAC-ELISA, Isolamento viral ou na RT-qPCR

Tabela 7. Acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para o diagnóstico da dengue no Distrito Federal. Brasília 2014

Index Teste	Sensibilidade% (n=206) [IC 95%]	Especificidade% (n=246) [IC 95%]	VPP% [IC 95%]	VPN% [IC 95%]	RVP [IC 95%]	RVN [IC 95%]
SD Bioeasy Dengue Duo NS1/IgM	76,21 (157/206) [70,3 a 81,6]	98,37 (242/246) [96,2 a 99,7]	97,51 (157/161) [95,4 a 98,9]	83,16 (242/291) [79 a 86,9]	46 (0,7621/0,0163) [14,3 a 100,6]	0,24 (0,24/0,98) [0,09 a 0,63]
SD Bioeasy Dengue Duo NS1	67,96 (140/206) [61,1 a 72,8]	99,18 (244/246) [97,8 a 100]	98,58 (140/142) [96 a 99,9]	78,70 (244/310) [74 a 81,9]	82 (0,6756/0,0082) [25,2 a 177,4]	0,33 (0,33/0,99) [0,12 a 1,14]
SD Bioeasy Dengue Duo IgM	35,92 (74/206) [29,1 a 40,8]	99,18 (244/246) [97,8 a 100]	97,36 (74/76) [95 a 98,9]	64,89 (244/376) [60 a 67,9]	43 (0,3552/0,0082) [13,2 a 92,7]	0,65 (0,65/0,99) [0,24 a 1,72]

Na Tabela 8 foi demonstrado o comportamento dos testes de referência (MAC-ELISA IgM, Isolamento Viral e RT-qPCR) nos 49 participantes com resultados falsos negativos do teste rápido. Os resultados da Tabela 8 indicaram que para as 49 amostras falso negativas do teste rápido, a maior porcentagem era para a combinação MAC-ELISA +/ Isolamento -/ qPCR -, com 33 amostras (67,34%). Das 49 amostras com resultado falso-negativo, 38 tiveram resultado positivo para o MAC-ELISA e 15 tiveram resultado positivo para o RT-qPCR.

Tabela 8: Distribuição dos resultados falsos negativos e verdadeiros positivos do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo entre as categorias definidas pela composição de resultados dos testes que compuseram o padrão de referência (MAC-ELISA IgM, Isolamento Viral e RT-qPCR). Brasília 2014

Padrão de Referência (Composição)	Falsos negativos n (%)	Verdadeiros positivos n (%)
Mac IgM + / Isolamento - / qPCR -	33 (67,34)	84 (40,77)
Mac IgM - / Isolamento + / qPCR -	1 (2,04)	1 (<1)
Mac IgM - / Isolamento - / qPCR +	4 (8,16)	14 (6,79)
Mac IgM + / Isolamento + / qPCR -	0	0
Mac IgM + / Isolamento - / qPCR +	5 (10,24)	50 (24,27)
Mac IgM - / Isolamento + / qPCR +	6 (12,24)	48 (23,30)
Mac IgM + / Isolamento + / qPCR +	0	9 (4,36)
Total	49 (100)	206 (100)

Realizando-se a comparação entre as metodologias de referência e os componentes do teste rápido, observamos que para as 143 amostras de soro positivas para a metodologia MAC-ELISA apenas 72 amostras (50,34%) foram positivas para o componente IgM do teste rápido, enquanto que para o componente NS1 podemos observar 90 amostras (62,93%) positivas (Tabela 9).

Para as 121 amostras positivas para a metodologia RT-qPCR, o melhor desempenho do teste foi para o componente NS1 com 101 amostras (83,47%) positivas. O melhor desempenho do teste rápido, quando analisamos os componentes separadamente, foi observado para o NS1 quando o comparamos com as amostras positivas para o Isolamento Viral, com 51 amostras (87,93%) positivas. O pior desempenho do teste foi para o componente IgM quando o comparamos com as amostras positivas para o Isolamento Viral, com três amostras (5,17%) positivas. Para todas as metodologias padrão de referência o melhor desempenho do teste foi quando analisamos os componentes IgM e NS1 do teste rápido em conjunto, com 73,42%, 87,60% e 87,93% de concordância entre o teste rápido e as amostras positivas de MAC-ELISA, RT-qPCR e isolamento viral respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9: Comparação entre o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo e as metodologias que compuseram o padrão de referência (MAC-ELISA, RT-qPCR e Isolamento viral). Brasília 2014

Categoria de amostras	Número (n)	Número de amostras com teste positivo n (%)			
		SD IgM	SD NS1	SD IgG	SD NS1/IgM
MAC-ELISA positivo	143	72 (50,34)	90 (62,93)	50 (34,96)	105 (73,42)
RT-qPCR positivo	121	30 (24,79)	101 (83,47)	16 (13,22)	106 (87,60)
Isolamento viral positivo	58	3 (5,17)	51 (87,93)	1 (1,72)	51 (87,93)

Foi analisado também o desempenho do teste rápido em diferentes cenários da infecção por dengue; infecção aguda, convalescente e em participantes que informaram ter antecedente de episódio anterior de dengue (Tabelas 10 e 11).

Para a fase da infecção o teste rápido demonstrou uma melhor acurácia para a infecção aguda, com 131 amostras (78,44%) positivas de

167 amostras positivas para os testes de referência, isso quando analisamos os componentes NS1 e IgM em conjunto, enquanto que para a infecção convalescente o desempenho foi de apenas 57,69%. Ainda, ao analisar o desempenho do teste na fase aguda da doença pode-se observar que o componente NS1 obteve um melhor desempenho, quando comparado com o componente IgM, tanto na fase aguda quanto na convalescente. Apenas 26 amostras verdadeiramente positivas se encontravam na fase convalescente, e destas, apenas 13 amostras (50%) foram positivas para o componente IgM do teste rápido, e 14 amostras (53,84%) foram positivas para NS1(Tabela 10).

Para os componentes NS1/IgM a especificidade do teste também obteve um melhor desempenho na fase aguda com 98,46%, contra 95,23% para a fase convalescente. O melhor desempenho para a especificidade foi encontrado para o componente NS1 na fase convalescente. (Tabela 10).

Tabela 10: Acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo em cenários de infecção aguda e convalescente. Brasília 2014

Categoria de amostras	Número (n)	Sensibilidade %			Especificidade %		
		[IC 95%]			[IC 95%]		
		SD IgM	SD NS1	SD IgM/NS1	SD IgM	SD NS1	SD IgM/NS1
Infecção aguda (≤ 7 dias)	362	34,73 (58/167) [28,1 a 39,8]	68,86 (115/167) [62,1a 73,8]	78,44 (131/167) [72,1 a 83,8]	99,48 (194/195) [97,6 a 100]	98,97 (193/195) [96 a 99,9]	98,46 (192/195) [96 a 99,9]
Infecção Convalescente (> 7 dias)	47	50 (13/26) [32,2 a 67,6]	53,84 (14/26) [35,3 a 70,6]	57,69 (15/26) [39,3 a 74,6]	95,23 (20/21) [87,1 a 100]	100 (21/21) [21 a 100]*	95,23 (20/21) [87,1 a 100]

*(Altman et al. 2000)

Para a análise de reinfeção, do total de amostras positivas para as metodologias de referência (casos), 148 foram classificadas como dengue primária e 21 como dengue secundária. A sensibilidade do teste rápido mostrou-se melhor na dengue primária do que na dengue secundária, tanto na análise dos componentes separadamente como na análise conjunta de NS1/IgM/IgG. Para a dengue primária o desempenho foi de 37,83%, 70,27% e 24,32% para IgM, NS1 e IgG respectivamente, enquanto que para NS1/IgM/IgG foi de 77,70%. Nas amostras de pacientes com dengue secundária o componente IgG apresentou 7 amostras (33,33%) positivas, e mais uma vez a combinação entre os componentes do teste (NS1/IgM/IgG) demonstrou um melhor resultado com 66,66% (Tabela 11).

Tabela 11: Sensibilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para os casos com ou sem antecedente de infecção por dengue. Brasília 2014

Categoria de amostras	Número (n)	Sensibilidade			
		[IC 95%]			
		SD IgM	SD IgG	SD NS1	SD NS1/IgM/IgG
Participante sem antecedente de infecção por dengue	148	37,83 (56/148) [31,1 a 42,8]	24,32 (36/148) [18,1 a 29,8]	70,27 (104/148) [64,1 a 75,8]	77,70 (115/148) [71,1 a 82,8]
Participante com antecedente de infecção por dengue	21	38,09 (8/21) [18,4 a 57,6]	33,33 (7/21) [13,4 a 52,6]	38,09 (8/21) [18,4 a 57,6]	66,66 (14/21) [64 a 67,9]

5.5. Acurácia de cada componente do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo

A acurácia do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo também foi avaliada para cada componente do teste separadamente, no intuito de verificar se haveria diferenças no desempenho dos componentes NS1 e IgM do teste. Para esta análise foi utilizado o mesmo painel de amostras testadas para as metodologias referência, sendo 206 amostras verdadeiramente positivas e 246 amostras verdadeiramente negativas, totalizando 452 soros (Tabela 6).

Verificou-se que para o quesito sensibilidade, o componente NS1 demonstrou um melhor desempenho, com 67,96% (IC_{95%}, 61,1% a 72,8%), comparado ao componente IgM que apresentou uma sensibilidade de apenas 35,92% (IC_{95%}, 29,1% a 40,2%). Já para o quesito especificidade ambos os componentes, NS1 e IgM, apresentaram bons resultados com 99,18% (IC_{95%}, 97,8% a 100%) ambos (Tabela 7).

Os componentes NS1 e IgM apresentaram VPP altos, acima de 95% e VPN mais baixos, com 78,70% para NS1 e 64,89% para IgM.

5.6. Descrição do comportamento do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo em subgrupos definidos pelo tempo de sintomas, absorvância ou DO do MAC-ELISA e Ct do RT-qPCR

Quando se realizou a análise da sensibilidade do teste rápido em relação ao tempo entre a coleta da amostra de soro e o início dos sintomas (Figura 12), observou-se que a sensibilidade do componente IgM melhorou gradualmente conforme aumentava o intervalo de dias entre o início dos sintomas e a coleta da amostra. Para amostras com menos de dois dias de início dos sintomas o resultado encontrado foi 7%, entretanto, houve uma

melhoria entre o terceiro e quarto dias e o quinto e sexto dias, 29% e 49%, respectivamente. O melhor resultado encontrado para a sensibilidade do componente IgM foi para as amostras coletadas após o sétimo dia de início dos sintomas, com 62%.

A sensibilidade do componente NS1 também apresentou melhores resultados conforme o aumento do tempo de sintomas, os resultados se apresentaram melhores do que para o componente IgM. Com a menor sensibilidade verificada para amostras coletadas com dois dias ou menos de sintomas (35%) e a melhor, para amostras com sete dias ou mais de sintomas 72%. Para os componentes analisados em conjunto NS1/IgM, independente do tempo de início dos sintomas, todos os resultados de sensibilidade foram superiores aos encontrados na análise dos componentes IgM e NS1 separadamente. O melhor desempenho foi para o quinto e sexto dias, com sensibilidade de 83% e o menor para o terceiro e quarto dias com 71% (Figura 13).

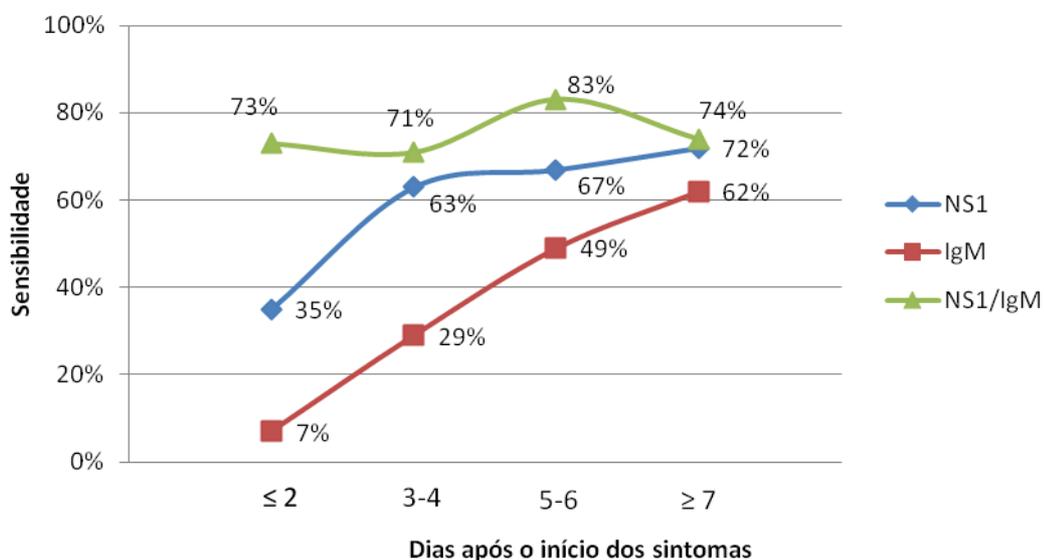


Figura 12: Sensibilidade do SD Bioeasy Dengue Duo Kit. Avaliação da sensibilidade do componente NS1, IgM e a combinação dos dois componentes NS1/IgM de acordo com o tempo de início dos sintomas até o momento da coleta da amostra de soro. Brasília 2014

Outra avaliação que fizemos para o teste SD Bioeasy Dengue Duo foi medir a sensibilidade dos componentes do teste rápido, em relação ao resultado de absorvância (DO) do teste padrão de referência MAC-ELISA. Os resultados foram aferidos para quatro grupos, divididos pela intensidade da absorvância (DO); 0,200 a 0,299; 0,300 a 0,399; 0,400 a 0,499 e $\geq 0,500$ (Figura 13).

Como esperado, o componente IgM do teste rápido obteve um melhor desempenho para intensidades de absorvância maiores, passando de uma sensibilidade de 19% para níveis de absorvância entre 0,200 a 0,299, para uma sensibilidade de 75% para absorvâncias $\geq 0,500$. Já para o componente NS1 os resultados de sensibilidade novamente se apresentaram melhores do que o componente IgM, e foi observada uma tendência ascendente na sensibilidade do componente NS1 conforme o

aumento dos níveis de absorvância, sendo 81% a melhor sensibilidade aferida, isso para resultados de absorvância $\geq 0,500$ (Figura 13).

Ainda conforme demonstrado na figura 13, para os componentes NS1 e IgM analisados em conjunto, o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo apresentou resultados satisfatórios de sensibilidade, para índices de absorvância $>0,400$. Para absorvâncias entre 0,400 a 0,499 a sensibilidade verificada foi de 87%, e sensibilidade ainda maior (94%) foi verificada a partir de absorvâncias $\geq 0,500$.

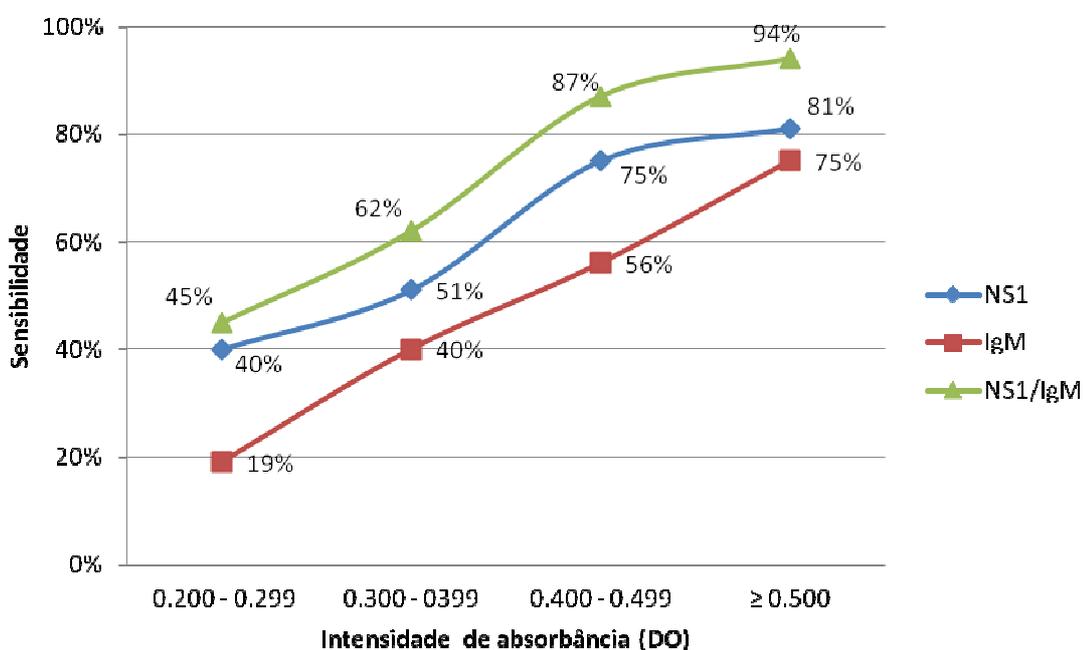


Figura 13: Sensibilidade do SD Bioeasy Dengue Duo Kit. Avaliação da sensibilidade do componente NS1, IgM e a combinação dos dois componentes NS1/IgM, de acordo com a intensidade da absorvância (DO) do teste padrão de referência MAC-ELISA. Brasília 2014

Na figura 14 demonstra-se o comportamento da sensibilidade dos componentes do teste rápido em relação ao Ct do teste padrão de referência RT-qPCR. Os resultados foram medidos em intervalos de 10 a 20, 21 a 30 e 31 a 37 Cts.

Os resultados dessa análise demonstraram um comportamento diferente entre os componentes NS1 e IgM. Enquanto a sensibilidade do IgM aumentou conforme aumentava o Ct da reação do RT-qPCR, para o componente NS1 a tendência da sensibilidade foi de redução com o aumento do Ct. Podemos observar na figura 14, que a sensibilidade do IgM variou de 10% para Ct entre 10 a 20 para 42% em Ct de 31 a 37, enquanto o NS1 apresentou uma queda expressiva de 86% para Ct de 21 a 30 para 68% em Ct de 31 a 37.

A tendência da sensibilidade para os componentes NS1/IgM demonstrada na figura 14 foi a mesma tendência do componente NS1. Com um pequeno aumento na sensibilidade do Ct entre 10 a 20 (88%) para o Ct 21 a 30 (90%), e logo depois apresentou uma queda marcante para Ct 31 a 37, com 78% de sensibilidade.

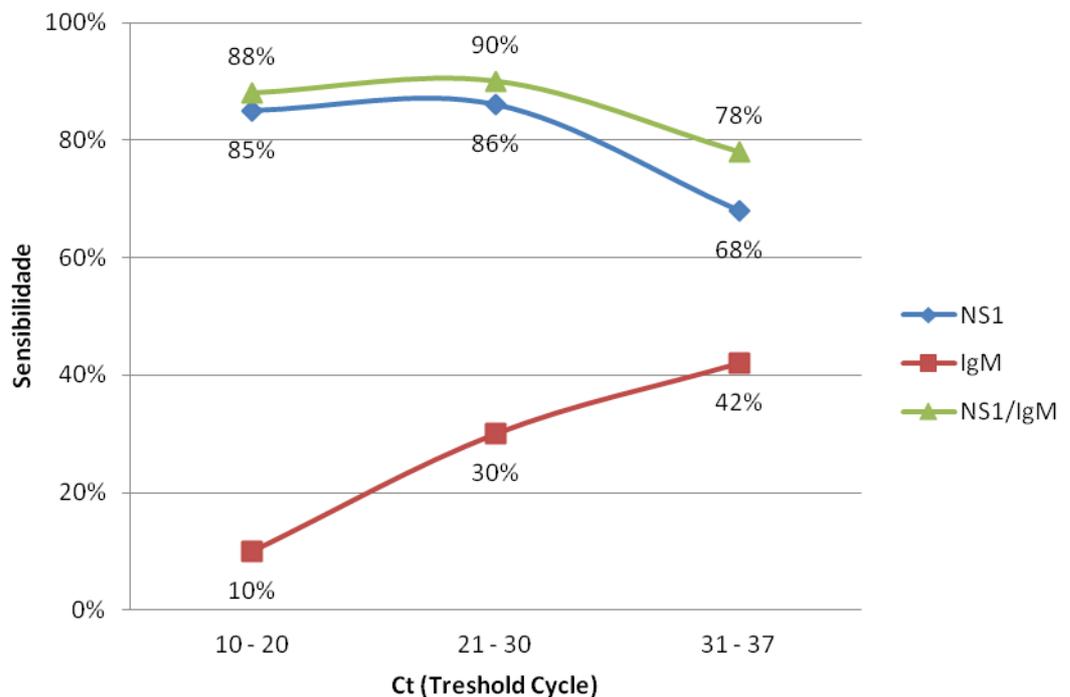


Figura 14: Sensibilidade do SD Bioeasy Dengue Duo Kit. Avaliação da sensibilidade do componente NS1, IgM e a combinação dos dois componentes NS1/IgM, de acordo com o Ct do teste padrão de referência RT-qPCR. Brasília 2014

5.7. Especificidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para amostras armazenadas na soroteca do LACEN-DF

Um total de 29 amostras de soro, comprovadamente positivas para HIV (10 amostras), HCV (10 amostras), rubéola (1 amostra), leishmaniose (5 amostras), malária (2 amostras) e leptospirose (1 amostra), armazenadas na soroteca do LACEN-DF, foram utilizadas para a verificação da especificidade do teste rápido.

Todas as 29 amostras positivas para as outras doenças foram testadas pelas três metodologias que constituíram o padrão de referência para o diagnóstico da dengue e apresentaram resultado negativo. Em nenhuma das amostras o teste rápido apresentou resultados positivos.

5.8. Confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo em cenários de atenção a saúde de diferentes níveis de complexidade

O estudo da confiabilidade foi realizado entre observadores de unidades do sistema de saúde com características de complexidade diferentes. Quatrocentas e uma amostras que foram testadas para o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo nas unidades de saúde de Sobradinho, Planaltina, Guará, Ceilândia e Taguatinga foram testadas novamente, por profissionais do laboratório de referência LACEN-DF. O estudo de concordância foi realizado para os componentes IgM, NS1 e IgG do teste rápido, sendo analisada também a concordância para amostras classificadas como infecção aguda, ou seja, aquelas amostras que tiveram resultados reagentes para NS1 e/ou IgM.

Os dados brutos da confiabilidade do teste rápido foram expressos nas tabelas 12, 13, 14 e 15.

Tabela 12. Tabela 2x2 com os dados brutos da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Componente NS1). Brasília 2014.

		UNIDADES DE SAÚDE		
		Positivo	Negativo	Total
LACEN	Positivo	79	4	83
	Negativo	2	316	318
	Total	81	320	401

Tabela 13. Tabela 2x2 com os dados brutos da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Componente IgM). Brasília 2014.

		UNIDADES DE SAÚDE		
		Positivo	Negativo	Total
LACEN	Positivo	5	3	8
	Negativo	3	390	393
	Total	8	393	401

Tabela 14. Tabela 2x2 com os dados brutos da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Componente IgG). Brasília 2014.

		UNIDADES DE SAÚDE		
		Positivo	Negativo	Total
LACEN	Positivo	5	0	5
	Negativo	3	393	396
	Total	8	393	401

Tabela 15. Tabela 2x2 com os dados brutos da confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo (Componente IgM/IgG). Brasília 2014.

		UNIDADES DE SAUDE		
		Positivo	Negativo	Total
LACEN	Positivo	82	5	87
	Negativo	2	312	314
	Total	84	317	401

A concordância bruta encontrada para os componentes NS1, IgM e IgG do teste rápido foi de 98%, 98% e 99% respectivamente. Para as amostras classificadas como aguda a concordância global foi de 98%.

Para os valores de kappa o melhor resultado, quando comparamos os componentes do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, foi encontrado para o componente NS1 seguido do componente IgG e com o menor resultado o componente IgM. No subgrupo de amostras classificadas como infecção aguda, o Kappa foi maior (Tabela 16).

Tabela 16: Concordância bruta, índice de prevalência e valor de Kappa para cada componente do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo. Brasília 2014.

		Concordância Bruta (%)	Índice de Prevalência	Valor Kappa (IC _{95%})
Componente NS1		98 (395/401)	0,59	0,93 (0,89 a 0,96)
Componente IgM		98 (395/401)	0,96	0,5 (0,15 a 0,84)
Componente IgG		99 (398/401)	0,96	0,75 (0,50 a 0,99)
Infecção (NS1/IgM)	Aguda	98 (394/401)	0,57	0,94 (0,90 a 0,97)

6 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o avanço tecnológico ocorrido no século XX tenha resultado em uma variedade de técnicas laboratoriais que significaram importante contribuição ao diagnóstico de doenças em geral, e das infecciosas, em particular, o diagnóstico da dengue continua sendo um grande desafio para a maioria dos governos da América Latina e Ásia, onde o número de casos da doença permanece em patamares elevados, caracterizando anualmente um problema de saúde pública.

No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), coordenado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, recomenda que o diagnóstico da dengue seja realizado por métodos sorológicos, preferencialmente o exame MAC-ELISA com a pesquisa do anticorpo IgM, moleculares pela PCR, e mais recentemente a introdução da possibilidade da utilização de métodos imunocromatográficos para a detecção da dengue. Embora não tenha preconizado oficialmente nenhum teste imunocromatográfico específico.

Frente à complexidade do diagnóstico da dengue, métodos laboratoriais de fácil realização e interpretação e que forneçam resultado rápido são cada vez mais comuns no país. Testes de imunocromatografia para o diagnóstico da dengue, utilizando a pesquisa do antígeno NS1 e os anticorpos IgM/IgG têm sido avaliados em diversos países, com sensibilidade e especificidade variáveis.

Enfatizando a importância que os testes rápidos podem desempenhar, em relação ao período entre o dia de início dos sintomas e a procura do paciente pelo atendimento médico, os resultados mostraram que mais de 50% dos participantes procuraram a assistência com menos de cinco dias de sintomas. Esses dados reforçam a necessidade cada vez maior de desenvolver metodologias diagnósticas capazes de detectar com acurácia a doença ainda no início dos sintomas, pois a maioria dos pacientes procura assistência ainda na fase aguda da doença. Uma dificuldade diagnóstica associada a essa informação, é que até o quinto dia de início dos sintomas as principais metodologias diagnósticas consideradas como referência detectam apenas o vírus ou os antígenos virais. As principais metodologias são a PCR ou o isolamento viral em cultura celular, duas metodologias caras e no caso do isolamento viral com média de liberação de resultado acima de 15 dias, além de não serem amplamente acessíveis nos cenários de atenção primária.

A experiência brasileira em relação aos RDTs ainda é reduzida, em função de que há o reconhecimento nacional (Ministério da Saúde) de que sua introdução nos protocolos de vigilância deva ser detalhadamente avaliada, principalmente em relação aos efeitos que esses testes ocasionarão nas ações de vigilância e controle da doença, atualmente desenvolvidas, e os seus custos de implantação, entre outros aspectos. Dessa forma, antes de adquirir testes rápidos imunocromatográficos para o diagnóstico da dengue, para a sua incorporação aos protocolos técnicos, é imprescindível o processo de avaliação da sua acurácia e confiabilidade diagnóstica para fundamentar as necessárias avaliações de custo-efetividade.

Nesse contexto, o nosso estudo é o primeiro a realizar no Brasil, a validação ampla de um teste rápido imunocromatográfico para o diagnóstico da dengue, diferenciando-se dos outros estudos já realizados que tratavam apenas de uma avaliação diagnóstica, sem a dimensão e desenho

metodológico que permitisse avaliar a acurácia e reprodutibilidade dos testes com o menor viés possível.

No intuito de minimizar os possíveis vieses o presente estudo de validação foi realizado prospectivamente, em larga escala, com a participação de mais de mil pessoas que se apresentaram espontaneamente com a síndrome suspeita de dengue e tiveram amostras de soro coletadas e imediatamente testadas com o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo. A maioria dos estudos de avaliação de acurácia já realizados no país, em diversos centros de pesquisa, utilizaram amostras armazenadas (congeladas) em biorrepositórios ou biobancos, o que pode interferir diretamente no desempenho do teste a ser validado, principalmente pelo efeito do viés da triagem prévia com testes sorológicos para a sua devida classificação nas sorotecas. Outro ponto relevante dos estudos já realizados é o não cumprimento com as exigências do manual do fabricante da maioria dos testes rápidos, que pressupõe a aplicação do teste em beira de leito, logo após a coleta do material biológico.

Vale ressaltar no presente estudo a forma de seleção dos participantes, que não passaram por nenhuma análise sorológica prévia, tendo apenas que se enquadrar na definição de caso suspeito e pertencer à população alvo da aplicação do teste. Portanto, sem artificializar o contexto usual da realidade de atenção nas unidades de saúde onde o teste foi aplicado.

A análise da tabela 3 sugere que dentre a população participante do estudo a população feminina encontra-se mais exposta à doença e com idade média de 31 anos. Quanto à distribuição geográfica dos participantes do estudo, em relação às seis unidades de saúde, houve uma predominância expressiva de amostras enviadas da unidade de saúde de Planaltina. As prováveis explicações para essa predominância podem estar ligadas tanto à ocorrência de uma epidemia na região norte do Distrito

Federal bem como um maior engajamento e comprometimento dos profissionais dessa unidade de saúde em relação ao estudo de validação do teste rápido que estava sendo realizado.

Em relação à análise das características demográficas e clínicas dos casos, demonstrada na tabela 5, observou-se que a idade média foi 35 anos. Outros estudos realizados no Brasil, nos estados de Minas Gerais e Rondônia apresentaram o mesmo perfil demográfico e clínico para os casos confirmados de dengue (Teixeira et al. 2010) (Borges et al. 2014), sugerindo a possibilidade de maior vulnerabilidade desses grupos à infecção pelo vírus da dengue ou que a população feminina está mais sensibilizada para procurar assistência médica quando apresenta os sintomas característicos da infecção pela dengue.

É importante ressaltar que a maior parte dos participantes declarou não ter tido dengue anteriormente ao estudo, portanto, o nosso estudo de validação foi realizado em um cenário onde provavelmente há baixa exposição a infecções prévias por dengue. Ou seja, na maioria das amostras os anticorpos IgM só começariam a ser detectados a partir do sétimo dia de sintomas e o IgG a partir do décimo quinto dia, o que pode refletir diretamente na acurácia dos testes diagnósticos para esta doença.

Nesse contexto, para essa população alvo, os resultados da acurácia global do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo no presente estudo, não apresentou uma sensibilidade adequada. O melhor desempenho observado para a sensibilidade foi 76% (Tabela 7), com a análise conjunta dos componentes NS1/IgM, portanto, um valor moderado. Em outros estudos, desenvolvidos fora do país, a sensibilidade do teste apresentou melhores resultados de sensibilidade, 85% (Andries et al. 2012), 92% (Blacksell et al. 2011). Os dados reforçam a importância cada vez maior da avaliação da acurácia dos RDTs na população-alvo, onde o teste será aplicado. Esta consideração é relevante pois, alterações de ordem genética, epidemiológica, cultural, dentre outras, podem afetar diretamente o

desempenho desses testes. Outra possibilidade para a baixa sensibilidade do teste observada no presente estudo, comparada com os dados obtidos em outros cenários, pode refletir o fato das amostras analisadas não terem sido pré-triadas com nenhuma ferramenta sorológica antes da validação.

Já para os valores da especificidade verificou-se um bom desempenho (98%), inclusive assemelhando-se com outros estudos recentes (Blacksell et al. 2011; Wang & Sekaran 2010). Este dado foi reforçado com a ausência de reações cruzadas na análise da especificidade utilizando amostras sabidamente negativas para dengue e positivas para HIV, HCV, leptospirose, malária, rubéola e leishmaniose. Embora os resultados sejam promissores em relação à especificidade do teste, quando analisado em amostras sabidamente positivas para outras doenças, reconhece-se a necessidade da ampliação do painel de amostras para outras doenças causadas por vírus do grupo flavivírus tais como, febre amarela, vírus do Nilo ocidental, Zika vírus e Rocio vírus, dentre outros (Wang & Sekaran 2010).

O elevado VPP e um moderado VPN encontrados no estudo são válidos para um cenário onde a prevalência da infecção na população estudada é elevada (45,6%) que corresponde à positividade detectada pelo padrão de referência entre os pacientes que procuraram as unidades de saúde selecionadas para o estudo com quadro suspeito de dengue e são válidos para essas condições de atenção à saúde. Os dados devem ser interpretados com cautela, não devendo ser extrapolados para situações de levantamentos epidemiológicos ou para pacientes que não apresentem quadros clínicos compatíveis com dengue.

Levando em consideração a acurácia global encontrada no presente estudo, pode-se sugerir que o teste SD Bioeasy Dengue Duo é útil para confirmar o diagnóstico da dengue, mas não é suficiente para descartar o diagnóstico, dado corroborado com a análise refinada do diagnóstico através do cálculo da razão de verossimilhança, sendo a RVP acima de 10 e a RVN

acima de 0.1(Grimes & Schulz 2005). Esse resultado enfatiza ainda mais a importância da avaliação prévia para que o teste rápido possa ser implementado nos serviços de saúde de forma adequada. Atualmente, a maioria dos testes rápidos em uso no país para o diagnóstico da dengue, é utilizada na atenção primária, em beira de leito, como testes de triagem e até confirmatórios. Com isso, a implementação de testes diagnósticos sem a sua devida validação pode trazer novos desafios para o sistema de saúde, se não tiverem a acurácia adequada para a detecção oportuna dos casos e a subsequente intervenção para evitar a gravidade e os desfechos letais. Um exemplo desse tipo de análise poderia ser aplicado ao cenário do Distrito Federal, onde após a implementação do teste rápido para o diagnóstico de dengue, sem a devida validação prévia, houve um aumento considerável no número de casos graves e óbitos durante o período em que o teste rápido de dengue estava disponibilizado na rede pública de saúde. Embora os determinantes da gravidade e letalidade por dengue sejam múltiplos (Moraes et al. 2013) (Guzmán et al. 2000), uma possibilidade para explicar o fenômeno observado seria o diagnóstico inadequado dos casos associados ao resultado falso negativo pelo teste rápido, não permitindo ao profissional de saúde um manejo clínico oportuno e adequado ao paciente. Portanto o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, deve ser aprimorado em relação à sua sensibilidade, diminuindo assim, os resultados falsos negativos e conseqüentemente os riscos inerentes a um diagnóstico inadequado da síndrome suspeita de dengue.

Quanto aos resultados falsos negativos apresentados pelo teste rápido (Tabela 8), pode-se notar que a principal discordância ocorreu nas amostras que apresentaram resultados positivos para o teste MAC-ELISA, e negativos para o RT-qPCR e isolamento viral. Esse resultado corrobora com a baixa sensibilidade (35%) encontrada para o componente IgM do teste SD Bioeasy Dengue Duo (Tabela 7). Já para o componente NS1 o teste apresentou melhores resultados de sensibilidade (67%), refletindo em um menor número de amostras falso negativas para a combinação dos testes

padrão de referência MAC-ELISA e isolamento viral negativo e RT-qPCR positivo.

A construção de um padrão de referência adequado para o estudo de validação só foi possível, pela combinação das três metodologias de referência adotadas. Devido ao fato da dengue apresentar uma dinâmica de infecção peculiar aliada ao tipo de diagnóstico para cada período da doença é imprescindível que os estudos de validação para o diagnóstico da dengue sejam compostos por exames de referência capazes de detectar tanto os antígenos virais (período virêmico) quanto os anticorpos IgM (período pós virêmico).

Fazendo a comparação entre as três metodologias de referência e os componentes do teste rápido (Tabela 9) observamos um padrão inesperado no desempenho do componente IgM. Os resultados encontrados mostraram que para as amostras positivas para a metodologia padrão de referência MAC-ELISA, houve uma maior concordância entre os resultados para o componente NS1 do que para o componente IgM do teste. Esse resultado não expressa o desempenho esperado para o teste rápido, pois a metodologia MAC-ELISA faz a pesquisa dos anticorpos IgM nas amostras de soro, os quais deveriam ser detectados também pelo componente IgM do teste rápido. Esse fator pode estar associado à baixa sensibilidade do componente IgM do teste rápido detectado no estudo, com 35% e aponta para a necessidade urgente de melhorar esse componente (Tabela 7).

Tendo como referência as metodologias RT-qPCR e isolamento viral (Tabela 9), como esperado, o melhor desempenho foi para o componente NS1, pois ambas são utilizadas para a detecção da doença ainda na sua fase inicial, sendo o mesmo período em que há circulação da proteína NS1. Os melhores resultados apresentados na tabela 9 foram observados na comparação das amostras positivas para as metodologias padrão de referência e os componentes juntos NS1/IgM do teste rápido, corroborando

com outros estudos já realizados para a avaliação do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo em outros países (Wang & Sekaran 2010).

A avaliação da acurácia do teste em diferentes cenários da infecção por dengue também apresenta sua importância, o Ministério da Saúde preconiza a utilização de metodologias diagnósticas para a pesquisa de antígenos virais em pacientes que apresentem menos de sete dias de sintomas (infecção aguda) e metodologias diagnósticas para a pesquisa de anticorpos IgM para os pacientes com mais de 7 dias de sintomas (fase convalescente).

Observando a tabela 10, que compara a acurácia do teste rápido em cenários de infecção aguda (≤ 7 dias de sintomas) e convalescente (> 7 dias de sintomas) para a sensibilidade, apenas o componente IgM obteve um melhor resultado para amostras de pacientes em fase convalescente, já para os componentes NS1 e NS1/IgM a sensibilidade para amostras de infecção aguda foi maior com 68% e 78% respectivamente. Em um estudo publicado em 2010 por Wang & Sekaran, dados semelhantes foram observados, sendo que para o componente NS1 a sensibilidade para a infecção aguda e convalescente foi 100% e 70%, respectivamente. Já para o componente IgM a sensibilidade para as amostras agudas e convalescentes foi 90% e 100%, respectivamente (Wang & Sekaran 2010).

Na análise da acurácia do teste em relação ao cenário de exposição prévia por dengue (Tabela 11), apenas os componentes IgG e IgM apresentaram melhor sensibilidade em participantes que informaram já terem apresentado infecções por dengue anterior ao estudo. Esse resultado pode estar refletindo a dinâmica da infecção pelo vírus da dengue, pois é comum que em pessoas com uma reinfecção pelo vírus da dengue apresentem níveis mais baixos do antígeno NS1, pois em uma segunda infecção haveria produção mais rápida de anticorpos específicos anti-NS1. Já para os níveis de anticorpos, espera-se que em uma reinfecção os níveis de IgM sejam menores e os níveis de IgG cresçam consideravelmente logo

no início da infecção, refletindo portanto uma melhor sensibilidade do componente IgG em amostras de participantes que apresentam uma reinfeção (Bäck & Lundkvist 2013).

Para a análise da sensibilidade do teste rápido em subgrupos definidos pelo tempo de sintomas até o momento da coleta, o comportamento do componente IgM foi bastante coerente com a dinâmica da infecção pelo vírus da dengue, apresentando sensibilidades menores, quanto menor era o intervalo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra (Figura 12). O fabricante do teste garante a identificação do anticorpo IgM, para uma infecção primária, a partir do terceiro e quinto dia após o início dos sintomas. Talvez por esse motivo a sensibilidade do componente IgM foi menor para os casos com períodos de infecção menores do que quatro dias e sensibilidade maior para períodos de infecção maiores do que cinco dias.

Para o componente NS1 (Figura 12), a maior variação verificada para a sensibilidade do teste foi para amostras colhidas com dois dias ou menos de infecção (35%) e amostras colhidas entre o terceiro e o quarto dia de infecção (63%), representando uma melhoria de 28% na sensibilidade do componente NS1. Estudo realizado no Cambódia observou um comportamento diferenciado para a sensibilidade do componente NS1, com valores de 80% para período de infecção igual ou menor do que dois dias (Andries et al. 2012). A diferença nesses resultados pode estar relacionada com a metodologia padrão de referência utilizada em cada estudo. Enquanto os estudos conduzidos por Andries (2012) utilizaram a metodologia de PCR convencional, o presente estudo utilizou uma metodologia mais sensível, o PCR Tempo Real.

Para a análise conjunta entre NS1/IgM (Figura 12), não houve grandes variações na sensibilidade do teste em relação ao período de infecção, sendo a maior sensibilidade encontrada para o quinto e o sexto dia de infecção (83%).

A resposta imunológica de uma pessoa a uma infecção por dengue, também pode ser um fator crítico na acurácia de um teste. As formas clínicas podem evoluir desde uma dengue assintomática até os casos graves, com formas hemorrágicas. A concentração de antígenos e anticorpos pode variar entre pessoas que apresentam uma infecção pelo vírus da dengue, e essa diferença de concentração pode refletir na sensibilidade de um teste diagnóstico. (Rodenhuis-Zybert et al. 2010). Nesse contexto, o presente estudo verificou a influência da concentração de anticorpos IgM e RNA viral na sensibilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, para os 206 casos.

Na figura 13, que analisa o comportamento da sensibilidade dos componentes do teste SD Bioeasy Dengue Duo em relação à concentração de anticorpos IgM do paciente, tanto para os componentes NS1, IgM e NS1/IgM há uma melhora da sensibilidade do teste quanto maior for a concentração dos anticorpos IgM na amostra do paciente. Os resultados para o componente IgM do teste foram bastante consistentes, demonstrando que para um DO entre 0,200 a 0,299 a sensibilidade foi muito baixa (19%). Já para DO igual ou acima de 0,500 a sensibilidade foi 75%. Esses resultados demonstram que a dinâmica de infecção no indivíduo interfere diretamente no desempenho do teste. Para indivíduos que apresentam uma concentração maior de anticorpos no sangue, há uma maior probabilidade de terem resultados positivos para o teste rápido, e indivíduos com uma menor concentração de anticorpos tem uma menor probabilidade de serem detectados pelo teste SD Bioeasy Dengue Duo.

Interessante notar que para o componente NS1 (Figura 13), os resultados encontrados também seguem a mesma dinâmica do componente IgM, com resultados melhores para a sensibilidade, quanto maior a concentração de anticorpos IgM na amostra do paciente. Podemos sugerir com esses resultados que os anticorpos detectados pela metodologia MAC-ELISA, não são anticorpos neutralizantes para a proteína NS1, pois se

fossem, esperaríamos que a sensibilidade do componente NS1 do teste rápido diminuísse com o aumento gradativo dos anticorpos IgM.

A aferição da sensibilidade dos componentes do teste rápido em relação à concentração de RNA viral (Figura 14) nas amostras dos pacientes verdadeiramente positivos demonstrou uma tendência de queda do componente NS1 para Ct maiores. Esse resultado corresponde perfeitamente com a dinâmica da infecção pelo vírus da dengue. Ct menores refletem uma maior concentração de vírus nas amostras dos pacientes, e conseqüentemente uma maior concentração de antígenos virais, como a proteína NS1.

Para o componente IgM a dinâmica na sensibilidade foi totalmente oposta, com tendência ascendente para a sensibilidade do teste (Figura 14). Esse resultado reforça ainda mais a dinâmica da infecção viral, demonstrando que para Ct maiores existe uma baixa concentração de vírus e antígenos virais e um aumento na concentração de anticorpos. Refletindo, portanto, o aumento natural da sensibilidade do componente IgM do teste rápido para Ct maiores, sendo o melhor resultado de sensibilidade do IgM foi para Ct entre 31 -37 com 45%.

No estudo de confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, os resultados de Kappa obtidos para os componentes IgM, NS1 e para as amostras classificadas em infecção aguda, variaram desde a classificação de bom para IgM, até excelente para o componente NS1.

Os resultados insatisfatórios para o Kappa do componente IgM (0,5) e IgG (0,75), podem estar expressando a influência da prevalência da doença, refletindo o fenômeno conhecido como paradoxo do Kappa. O efeito de prevalência existe quando a proporção de concordância bruta para a classificação positiva difere da concordância bruta para a classificação negativa. E isto pode ser expresso pelo índice de prevalência. Quando o índice de prevalência for alto, a concordância devida ao acaso aumenta e conseqüentemente o valor do Kappa será menor (Sim & Wright 2005). Para

o componente NS1 e para as amostras agudas (NS1/IgM), o índice de prevalência foi de 0,59 e 0,57 respectivamente, resultando em um Kappa satisfatório. Já para os componentes IgM e IgG isolados o índice de prevalência foi de 0.96, provocando um valor de Kappa menor.

Os resultados demonstram, portanto, uma elevada reprodutibilidade do teste entre o ponto de cuidado do paciente e o laboratório de referência, quando utilizamos os componentes NS1/IgM juntos. Reforçando a potencial utilidade do teste no contexto da atenção primária.

Vale mencionar que durante o estudo não se verificou a circulação do sorotipo 2 do vírus da dengue, portanto, os resultados são válidos para cenários onde predomina a circulação do sorotipo 1. Este ponto é relevante para enfatizar a necessidade da ampliação dos estudos de acurácia do teste SD Bioeasy Dengue Duo para os outros sorotipos virais da dengue. Outra limitação do estudo foi que, embora o fabricante do teste garanta a possibilidade da utilização de soro, plasma ou sangue total como material biológico para o diagnóstico da dengue, no estudo utilizou-se apenas soro, pois era o único material biológico capaz de ser utilizado em todas as outras metodologias de referência.

Embora as metodologias de referência utilizadas sejam as mais preconizadas nacionalmente e internacionalmente para o diagnóstico da dengue, são metodologias imperfeitas e que em alguns casos, como o do MAC-ELISA, podem apresentar reações cruzadas com outros vírus e causar a classificação equivocada de não-casos como casos. No laboratório de referência LACEN-DF, já foram verificadas para a metodologia MAC-ELISA reações cruzadas entre o diagnóstico da dengue e da febre amarela, entretanto a cobertura vacinal para a febre amarela é bastante satisfatória no Distrito Federal, diminuindo assim o risco dessas reações cruzadas em indivíduos que apresentam a síndrome febril aguda.

São grandes os desafios para a efetivação de um estudo de validação de grade impacto, pois faltam recursos, profissionais capacitados,

laboratórios equipados e capazes de realizarem as metodologias de referência. As maiores dificuldades observadas no presente estudo de validação foi a implementação e padronização da metodologia RT-qPCR no LACEN-DF, pois no início essa metodologia ainda não tinha sido padronizada. A reação multiplex, preconizada pelo CDC, embora seja uma metodologia bastante sensível, é de difícil manejo, pois exige pessoas qualificadas e o ajuste da concentração das sondas e dos iniciadores levou aproximadamente dois meses para ser concluído. Outra dificuldade foi o financiamento, pois grande parte dos recursos para o projeto não vieram de órgãos de fomento à pesquisa e sim da Secretaria de Saúde por processos regulares de compra, seguindo os ritos burocráticos usuais.

Considerando os objetivos da vigilância epidemiológica, melhores resultados poderiam ser obtidos para a confirmação de casos de dengue pelo teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, repetindo-se o teste após o sétimo dia de início dos sintomas, para aqueles pacientes que tiveram um resultado negativo, quando testados antes do quinto dia de sintomas

Mesmo frente aos grandes desafios que os estudos de validação possam representar, a experiência aqui registrada demonstra que é possível desenvolver no cenário do serviço público do Distrito Federal estudos de validação em larga escala para o diagnóstico da dengue.

Espera-se que a consistência dos resultados aqui apresentados seja aprimorada em estudos posteriores, e que a informação gerada possa servir de auxílio para a tomada de decisão quanto a introdução de um teste rápido imunocromatográfico para o diagnóstico da dengue no país.

7 CONCLUSÃO

Em relação ao objetivo de estimar a sensibilidade, especificidade, razões de verossimilhança positiva e negativa e valores preditivos positivo e negativo do teste rápido em população com a síndrome suspeita de dengue na rede de saúde pública do Distrito Federal conclui-se que:

- O teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, apresenta alta especificidade e sensibilidade moderada.
- Os valores das razões de verossimilhança observadas sugerem que o teste é útil para confirmar o diagnóstico de dengue, mas não é suficiente para descartar o diagnóstico e deve ser aprimorado em relação à sensibilidade.
- Em todas as análises o componente NS1 apresentou uma acurácia melhor que o componente IgM.
- A combinação dos dois componentes, NS1 e IgM obteve o melhor resultado para a acurácia do teste, quando comparada à acurácia dos componentes NS1 e IgM, utilizados separadamente.
- Considerando os objetivos da vigilância epidemiológica, melhores resultados poderiam ser obtidos para a confirmação de casos de dengue pelo teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo, repetindo-se o teste após o sétimo dia de início dos sintomas, para aqueles pacientes que tiveram um resultado negativo, quando testados antes do quinto dia de sintomas.
- Em relação à dinâmica da infecção pelo vírus da dengue e os aspectos imunológicos desencadeados por cada paciente, pode-se concluir que os pacientes que desencadearam uma maior resposta imunológica, liberando uma maior quantidade de IgM no sangue, têm uma maior probabilidade de terem resultados positivos para o teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo.

- Um melhor desempenho na sensibilidade do teste rápido foi verificado para pacientes que apresentaram uma maior carga viral, sugerindo, portanto, que a quantidade de RNA viral no sangue do paciente desempenha um papel crucial na acurácia do teste.

Em relação ao objetivo de estimar a especificidade do teste rápido em amostras de soro armazenadas na soroteca do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal conclui-se que:

- O teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo apresentou elevada especificidade, não apresentando reações cruzadas com os agentes microbiológicos causadores do HIV, HCV, Rubéola, Malária, Leptospirose e Leishmaniose..

Em relação ao objetivo de avaliar a reprodutibilidade do teste rápido em cenários de atenção a saúde de diferentes níveis de complexidade conclui-se que:

- A reprodutibilidade entre os observadores das unidades de saúde selecionadas e os observadores do laboratório de referência LACEN-DF demonstrou que para as amostras agudas (NS1/IgM) a concordância medida pelo Kappa foi satisfatória, reforçando a utilidade do teste no contexto da atenção primária.

- Para os componentes NS1 e IgM analisados separadamente, tivemos uma concordância global idêntica, entretanto com resultados de Kappa bastante diferentes, sugerindo portanto a influência do paradoxo de Kappa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):376–81.

Altman GD, Machin D, Bryant TN, Gardner MJ. *Statistics with confidence.* 2nd edition. 2000; BMJ Books.

Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, et al. Field Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detects Dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12).

Banerjee, M. & Fielding, J. Interpreting kappa values for two-observer nursing diagnosis data. *Research in nursing & health.* 1997;20(5), pp.465–470.

Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol* [Internet]. 2013;3:1–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3759171&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Blacksell SD. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: Recent evaluations and future needs? *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012.

Blacksell SD, Jarman RG, Gibbons R V., Tanganuchitcharnchai A, Mammen MP, Nisalak A, et al. Comparison of Seven Commercial Antigen and Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Acute Dengue Infection. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2012. p. 804–10.

Blacksell SD, Jarman RG, Bailey MS, Tanganuchitcharnchai A, Jenjaroen K, Gibbons R V., et al. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: The need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(12):2095–101.

Blacksell SD, Newton PN, Bell D, Kelley J, Mammen MP, Vaughn DW, et al. The comparative accuracy of 8 commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection. *Clin Infect Dis.* 2006;42(8):1127–34.

Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi SH, Hailu A, Mondal D, et al. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2007 Nov;5(11):S30–9. Available from:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1766>

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: Explanation and elaboration. *Clin Chem*. 2003;49(1):7–18.

Fauquet CM, Fargette D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology*. 2005;2:64.

Fonseca BAL, Fonseca SNS. Dengue virus infections. *Curr Opin Pediatr*. 2002;14(1):67–71.

Grimes DA, Schulz KF. Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *Lancet*. 2005;365(9469):1500–5.

Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*. 2011. p. S3–11.

Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp*. 2006;277:3–16; discussion 16–22, 71–3, 251–3.

Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1984;33(1):158–65.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7–16.

Guzmán MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2002 Jan;2(1):33–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309901001712>

Guzmán MG, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*. 2004. p. 69–80.

Guzmán MG, Kourí G. & Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet*. 2000; 355(9218), pp.1902–1903.

Horstick O, Martinez E, Guzman MG, Martin JLS, Ranzinger SR. WHO dengue case classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2015;109(1):19–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25630344>

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):4977–83.

Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(1):153–9.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159–74.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):6986–91.

Moraes GH, Duarte EDF, Duarte, EC. Determinants of mortality from severe dengue in Brazil: A population-based case-control study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2013; 88(4), pp.670–676.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med journal, Armed Forces India [Internet].* 2015;71(1):67–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609867>

Paudel D, Jarman R, Limkittikul K, Klungthong C, Chamnanchanunt S, Nisalak A, 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. *N Am J Med Sci.* 2011;3(10):478–85.

De Paula SO, Fonseca BAL da. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(6):390–8.

Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam A V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 1998;352(9132):971–7.

Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2010. p. 2773–86.

Schilling S, Ludolfs D, Van An L, Schmitz H. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *J Clin Virol.* 2004;31(3):179–84.

Schwartz E, Mileguir F, Grossman Z, Mendelson E. Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. *J Clin Virol.* 2000;19(3):169–73.

Sierra B, García G, Pérez AB, Morier L, Rodríguez R, Alvarez M, et al. Long-term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. *Int J Infect Dis.* 2002;6(2):125–8.

Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 2005;85(3):257–68.

Tauil PL. Critical aspects of dengue control in Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 2002; vol.18 no.3 Rio de Janeiro.

Teixeira L de AS, Lopes JSM, Martins AG da C, Campos FAB, Miranzi S de SC, Nascentes GAN. [Persistence of dengue symptoms in patients in Uberaba, Minas Gerais State, Brazil]. *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica.* 2010;26(3):624–30.

Wang SM, Sekaran SD. 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.* 2010;83(3):690–5.

WHO. Geneva: WHO; 1997. Dengue haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control; pp. 12–23.

WHO. Vol. 29. New Delhi: World Health Organization, Regional Publication; 1999. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Comprehensive Guidelines.

WHO-World Health Organization /TDR; 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Report. Geneva; 3rd edition.

9 APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado a participar do projeto intitulado, **“Validação e confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para o diagnóstico da dengue na rede de saúde pública do Distrito Federal”**, que vai tentar saber qual seria o grau de confiabilidade e precisão do novo teste rápido para o diagnóstico da dengue, comparado com outros exames que se usam para diagnosticar a dengue no LACEN-DF. Este estudo tem como objetivo principal melhorar o diagnóstico da dengue na rede de saúde pública do Distrito Federal. Os exames que serão realizados para comparar se o novo teste é bom são os recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da dengue.

A sua participação será voluntária. O material biológico, composto por soro, sangue ou plasma, será coletado por punção com agulha em uma veia do braço, o sangue extraído servirá para a realização imediata do teste rápido na unidade onde você está sendo atendido e poderá detectar se você tem dengue. Após a realização do teste rápido, o restante do sangue será encaminhado ao laboratório de referência, LACEN-DF, onde serão realizados os outros exames para confirmar se você tem dengue. Serão também feitos testes especiais chamados de testes de biologia molecular, conhecidos como PCR, com a finalidade de diagnosticar qual é o tipo mais específico de vírus da dengue que está causando sua doença. Todos os procedimentos a serem realizados neste estudo são recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil e pela Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Todos os resultados dos exames realizados lhe serão entregues durante o acompanhamento na unidade de saúde na qual você buscou atendimento.

Os exames que serão feitos em você são os seguintes: Pesquisa direta do vírus por meio do isolamento em meio de cultura onde o vírus da dengue pode se reproduzir e ser também identificado ou isolado; pesquisa de anticorpos contra os vírus da dengue que são substâncias que o corpo produz para se defender do micróbio e que estão presentes no sangue dos pacientes que tem contato com o vírus da dengue; e por último a pesquisa do material genético do vírus que também está presente no sangue dos pacientes com dengue.

Como participante do estudo você ou a sua família não obterão quaisquer benefícios além dos já citados, que serão: diagnóstico específico

para a sua infecção ou doença e o acompanhamento pelos especialistas na unidade de saúde na qual você foi atendido. Não há previsão de pagamento de nenhuma espécie pela participação no estudo. No entanto, a sua participação será muito importante, pois você estará contribuindo para o conhecimento e esclarecimento das diferentes formas de diagnóstico realizadas atualmente para a dengue, podendo desta forma beneficiar outras pessoas. Mesmo não concordando em participar do estudo, você terá a mesma assistência que os pacientes que participem da pesquisa.

Como participante do estudo você tem o direito de se retirar deste estudo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo; o direito de manter em seu poder cópia assinada deste documento; e no caso em que ocorra algum prejuízo decorrente de sua participação neste estudo você terá direito a pleitear indenizações, pagamentos ou ressarcimento de gastos.

O material biológico coletado (soro, sangue ou plasma) se destina à pesquisa descrita acima, porém, solicitamos a sua autorização para que o material excedente, devidamente protegido por um código para evitar que você seja identificado, seja armazenado na soroteca do Núcleo de Virologia do LACEN-DF, sob a guarda e responsabilidade do pesquisador, seja utilizado para novos estudos que permitam melhorar o diagnóstico da dengue e outras doenças infecciosas ou entender melhor o comportamento dessas doenças nas pessoas.

O projeto poderá ser encerrado caso ocorram eventos que tornem o estudo sem a suficiente segurança para os participantes.

Os pesquisadores responsáveis pela pesquisa garantem que a sua identidade permanecerá sempre em sigilo (ou seja, não será revelada), assim como os dados que permita de algum modo sua identificação. Os resultados do estudo serão apresentados em eventos de divulgação científica como congressos e em revistas científicas, mas em momento algum sua identidade será revelada.

A sua participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados apenas aos participantes e aos representantes da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, bem como a autoridades normativas estaduais ou nacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos.

Você e seus familiares têm direitos aos esclarecimentos que julgarem necessários a qualquer período do desenvolvimento deste estudo e será notificado sobre qualquer nova informação relacionada. O Dr. Paulo Sousa Prado do Núcleo de Virologia do LACEN-DF telefone: (61) 3321-2772 dispõe-se para atender e esclarecer possíveis dúvidas dos participantes;

Sendo assim, por estar devidamente esclarecido sobre o conteúdo deste _____ termo, _____ eu,

(nome do paciente ou responsável) expresso livremente o meu consentimento (e/ou do seu responsável) para ser incluído como participante nesta pesquisa. Ainda, :

() Aceito que o material biológico seja armazenado para outros objetivos de pesquisa relacionados ao diagnóstico das doenças infecciosas e não há necessidade de me contactar para novo termo de consentimento.

() Aceito que o material biológico seja armazenado para outros objetivos de pesquisa relacionados ao diagnóstico das doenças infecciosas, mas desejo ser contactado para assinar novo termo de consentimento quando o material for reutilizado.

() Não aceito que o material biológico seja armazenado após o uso na presente pesquisa.

Data da Coleta: ___/___/___ Data de Início dos Sintomas: ___/___/___

Já teve dengue confirmada laboratorialmente? Sim () Não ()

Data de Nascimento do participante: ___/___/___ Sexo: M () F ()

Assinatura do paciente ou responsável:

RG do paciente ou responsável:

Impressão digital (participante analfabeto)

Nome, RG e assinatura da testemunha (participante analfabeto)

Data: ____/____/____