

VANESSA TORALES PORTO

**ACURÁCIA DO TESTE NS1 PARA DENGUE NO CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO
BRASILEIRO.**

BRASÍLIA, 2014

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA**

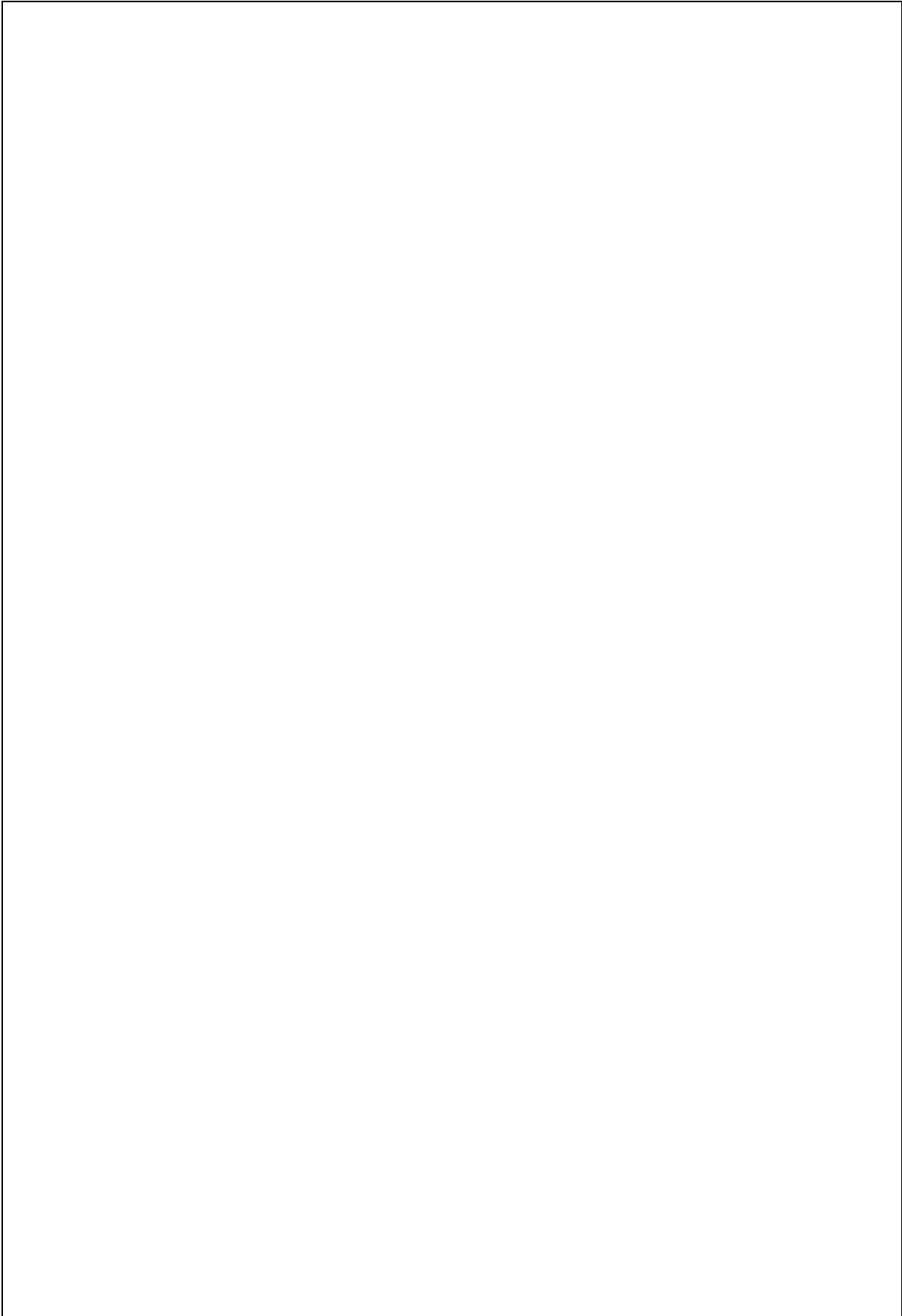
VANESSA TORALES PORTO

**ACURÁCIA DO TESTE NS1 PARA DENGUE NO CONTEXTO
EPIDEMIOLÓGICO BRASILEIRO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Saúde Coletiva pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade de Brasília.

Orientador: Vitor Laerte Pinto Junior

BRASÍLIA, 2014



VANESSA TORALES PORTO

**ACURÁCIA DO TESTE NS1 PARA DENGUE NO CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO
BRASILEIRO.**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de Mestre em
Saúde Coletiva pelo Programa de Pós-
Graduação em Saúde Coletiva da Universidade
de Brasília.**

Aprovado em 25 de julho de 2014

BANCA EXAMINADORA

Vitor Laerte Pinto Junior (Orientador)

Universidade de Brasília – UnB

Marcos Takashi Obara

Universidade de Brasília - UnB

Alessandro Pecego Martins Romano

Ministério da Saúde

Wildo Navegantes de Araújo (**Suplente**)

Universidade de Brasília – UnB

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, e aos meus pais por tudo que fizeram por mim até hoje, e por tudo que representam na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me iluminar em todos os caminhos da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Wilson e Maria, pelo dom mais precioso que me deram: a vida e por nunca medirem esforços em investir no meu crescimento educacional e profissional.

Aos meus pais e irmãos, agradeço também por estarem ao meu lado em todos os momentos, comemorando comigo meus sucessos e me aconselhando nos meus momentos de dificuldade, mostrando-me sempre os melhores caminhos a serem percorridos. Obrigada por tudo! Obrigada pelo carinho, amor, amizade e até pelas cobranças nos meus momentos de desânimo. Amo vocês!

Ao meu orientador, Vitor Laerte Pinto Junior (UnB) por todo o auxílio e paciência durante a minha monografia.

Aos meus amigos do Instituto Adolfo Lutz-SP: Akemi Suzuki, Ivani Bisordi e Renato Pereira, pela contribuição na análise dos dados do meu trabalho e pela amizade.

A Marli Tenório, pela contribuição na revisão da minha tese e pelo carinho que sempre teve comigo.

Ao amigo, Julio Carlyle, agradeço a contribuição na revisão do abstract.

Aos colegas da Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), e aos Laboratórios de Saúde Pública que fazem parte da rede de diagnóstico de dengue do Ministério da Saúde por encaminharem os dados analisados neste trabalho.

A minha chefe, Kátia Oliveira (ST-CIT/SGEP/DAI/MS), por compreender minhas ausências e me incentivar nessa nova etapa.

Enfim agradeço aos colegas e professores do mestrado por estarmos juntos, afinal nos bons momentos comemoramos juntos e nas dificuldades, não nos abalamos, estivemos sempre um com os outros, e agora estamos alcançando mais um sucesso juntos: nos tornamos Mestres!

“ A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada,
ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, a forma mais grave da doença é a dengue hemorrágica, fatal se não tratada. No mundo, ocorre em mais de 100 países e territórios – 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de contraí-la, e anualmente a taxa de incidência atinge 50 milhões de casos (Tauil, 2002). A dengue é uma enfermidade causada por um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui quatro tipos imunológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Um importante alvo dos anticorpos para DENV é a proteína NS1, uma glicoproteína conservada que parece ser essencial para a replicação do vírus. Recentemente, os testes para a detecção do antígeno NS1 no soro humano foram evoluindo. O antígeno NS1 é encontrado juntamente com endotélio, livre ou solúvel no soro de pacientes, a partir de um dia antes do início dos sintomas e pode ser detectado, pelo menos, até cinco dias após o início dos sintomas, o que permite um diagnóstico precoce da doença. **Objetivo:** Avaliar a acurácia diagnóstica para a detecção do antígeno NS1 Dengue pelo formato ELISA, quando utilizada por laboratórios de saúde pública. **Métodos:** estudo analítico retrospectivo dos exames de dengue oriundos das unidades sentinelas de dengue e laboratórios de referência nacional e estaduais no período de 2009 a 2010. Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. **Resultados:** A sensibilidade média do kit encontrada nos seis estados envolvidos no estudo foi de 94,5% e a especificidade média foi de 61,20%. O valor preditivo positivo de 81,48% no ano de 2009 e em 2010 o valor caiu para 66,17%, e o valor preditivo negativo no ano de 2009 foi de 89,91% e no ano de 2010 o valor aumentou para 94,43%. **Conclusão:** Considerando a sensibilidade de 94,50% encontrada podemos considerar que o teste é sensível, e raramente deixará de encontrar pessoas com a doença. Em relação a especificidade de 61,20%, considera-se um valor abaixo do esperado, podendo ocasionar resultados falsos negativos. O kit é sensível, porém pouco específico.

Palavras chaves: Dengue, Antígeno NS1, acurácia, ELISA, VPP e VPN

ABSTRACT

Introduction: Dengue fever is one of the main public health issues in the world. In its most severe form, dengue hemorrhagic fever, it causes gastrointestinal hemorrhaging which, if untreated, can lead to death. It has been detected in more than 100 countries and territories worldwide -approximately 2.5 billion people are at risk of contracting dengue fever and incidence rate is of 50 million cases per year (Tauil, 2002). Dengue fever is caused by an arbovirus of the family Flaviviridae and genus *Flavivirus* and includes four serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. An important target of antibodies against DENV is the protein NS1, a conserved glycoprotein that appears to be essential for viral replication. Recently, tests for the detection of NS1 antigen in human serum have evolved. This antigen is found in the endothelium, in a free form or soluble in serum of infected patients after one day before symptoms begin, which allows for early diagnosis of the disease. **Objective:** To evaluate the diagnostic accuracy in the detection of the NS1 antigen in an ELISA format in public health laboratories. **Methods:** A descriptive retrospective cohort study of dengue laboratory results from sentinel, state and national reference laboratories in 2009 and 2010. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were determined. **Results:** The mean sensitivity of the Elisa kit in the six states involved in this study was 94.5% and the mean specificity was 61.2%. Positive predictive value was 81.48% in 2009 and decreased to 66.17% in 2010, whereas the negative predictive value was 89.91% and increased to 94.43% in the years 2009 and 2010, respectively. **Conclusion:** Considering the mean sensitivity of 94.50%, it can be concluded that the test will rarely fail at detecting contaminated patients. The mean specificity was lower than expected and it can be concluded that mistakes can occur, particularly in assigning false negatives. The kit is sensitive, however non-specific.

Keywords: dengue; antigen NS1, accuracy, Brazil

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	2
1.1.1. Dengue nas Américas	4
1.1.2. Dengue no Brasil	5
1.2. Transmissão da Dengue	9
1.3. Agente Etiológico	12
1.4. Manifestações Clínicas	14
1.5. Vigilância Epidemiológica	15
1.6. Diagnóstico Laboratorial	17
1.6.1. Isolamento Viral	18
1.6.2. Elisa NS1	19
1.7. Unidades Sentinelas	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MÉTODOS	26
5. RESULTADOS	31
5.1 ARTIGO 01	31
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	45
8. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Ciclo de transmissão da dengue	10
Figura 2 - Vírus Dengue	13
Figura 3 - RNA Genômico do vírus da dengue	13
Figura 4 - Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag	20
ARTIGO	
Figura 1 Sensibilidade do Kit Elisa Platelia™ Dengue NS1 Ag. (Bio-Rad Laboratories) para os sorotipos de dengue circulantes no Brasil, no período de 2009 e 2010.	38
Figura 2 Incidência de dengue nos estados do estudo, no período de 2009 e 2010.	41

LISTA DE TABELAS

	Pág
Quadro 1 Unidades Sentinelas de monitoramento viral para dengue implantadas em 2009	22
Quadro 2 Avaliação da acurácia de um teste diagnóstico	28
 ARTIGO	
Tabela 1 Cálculo de sensibilidade e especificidade por estado, no período de 2009 e 2010	37
Tabela 2 Incidência de dengue por mês e estado, no período de 2009 e 2010.	40
Tabela 3 Valores de VPP e VPN, no período de 2009 e 2010.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae	Aedes
AcM	Anticorpos monoclonais de camundongos
Ag	Antígeno
C	Capsídeo
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CGPNCD	Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue
DC	Dengue Clássica
DCC	Dengue com complicações
DENERu	Departamento Nacional de Endemias Rurais
DENV	Dengue Vírus
E	Especificidade
Ev	Envelope
ECP	Efeito citopático
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	Fixação de complemento solúvel
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência Indireta
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
M	Membrana
MS	Ministério da Saúde
Nm	Nanômetro
PM	Peso molecular

prM	Pré-membrana
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
S	Sensibilidade
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
US	Unidade Sentinela
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

1. INTRODUÇÃO

A família *Flaviviridae* é formada por três gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus* que compartilham semelhanças quanto à morfologia do vírus, organização do genoma, e possivelmente, estratégia de replicação (Westaway, *et al.* 1985). O gênero *Flavivirus* é composto por cerca de 80 diferentes vírus, dentre eles o vírus da dengue (DENV), que representa uma ameaça para a saúde pública (Whitehead, 2007).

Por definição, os arbovírus são classificados como zoonoses que dependem de outra espécie animal além do homem para serem mantidos na natureza, requerendo no mínimo dois hospedeiros (Gubler, 1998). Os DENV, porém, se adaptaram completamente ao homem, embora o ciclo mosquito-macaco-mosquito ainda seja observado em algumas regiões da África e da Ásia (Gubler, 2002; Whitehead, 2007), sendo transmitido aos seres humanos por meio da picada do mosquito do gênero *Aedes* infectado (Rodhain & Rosen, 1997). *Ae. aegypti*, um mosquito altamente domesticado, é o principal vetor do DENV, mas a espécie *Ae. albopictus* também pode sustentar a transmissão (Effeler, 2005).

A dengue é hoje a mais importante arbovirose que afeta o homem, constituindo um sério problema de saúde pública no mundo, especialmente em países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem a proliferação dos seus vetores, os mosquitos do gênero *Aedes*. Atualmente, quase metade da população mundial vive em áreas de risco para a doença e, apesar de sua extensão e gravidade, vacinas ou tratamentos específicos ainda não estão disponíveis, por isso a importância de avaliarmos a acurácia de kits diagnósticos disponíveis no mercado, visando o diagnóstico precoce da doença, contribuindo para a redução das ações da vigilância epidemiológica da dengue (Tauil, 2002).

1.1. Histórico

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, a forma mais grave da doença é a dengue hemorrágica, fatal se não tratada. No mundo, ocorre em mais de 100 países e territórios – 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de contraí-la, e anualmente a taxa de incidência atinge 50 milhões de casos, com mais de 500 mil hospitalizações por febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque, das quais 20.000 evoluem para óbito (Tauil, 2002). As infecções pelos DENV são responsáveis por elevadas taxas de morbidade em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oceania, África e Américas (Gubler, 2002).

Os primeiros relatos de grandes epidemias de doença que possivelmente tratava-se de dengue datam de 1779 e 1780 e ocorreram em três continentes, Ásia, África e América do Norte, porém há registros da ocorrência desde o século III. Durante a Dinastia Chin, nos anos de 265 a 420 d.C., foram descritos os sintomas de uma enfermidade que os chineses chamaram de “veneno da água”, associando insetos voadores e água. Estes achados foram formalmente editados em uma enciclopédia médica chinesa durante a Dinastia Tang, no ano de 610 d.C., e Dinastia Norte Sung, no ano de 992 d.C. (Gubler, 1998; Gubler, 2006). Outros possíveis surtos de dengue ocorreram em 1635 nas Índias ocidentais e em 1699 no Panamá (McSherry, 1982). Portanto, é provável que a dengue já apresentasse uma ampla distribuição geográfica mesmo antes do século XVIII, quando grandes epidemias ocorreram por todo mundo. Porém, a dengue foi considerada, por muito tempo, uma doença benigna, com grandes epidemias acontecendo apenas em intervalos de 10 a 40 anos (Gubler & Clark, 1995).

Provavelmente, o termo dengue é derivado da frase swahili "ki denga pepo", que descreve os ataques causados por maus espíritos e, inicialmente, usado para descrever enfermidade que acometeu ingleses durante uma epidemia que afetou as Índias Ocidentais Espanholas em 1927-1928. Foi trazida para o Continente Americano a partir do Velho Mundo, com a colonização no final do século XVIII. Entretanto, não é possível afirmar, pelos registros históricos, que as epidemias

foram causadas pelos vírus da dengue, visto que seus sintomas são similares aos de várias outras infecções, em especial, a febre amarela (Tauil, 2002).

A transmissão do DENV por *Ae. aegypti* foi demonstrada em 1906 por Bancroft, sendo confirmado por estudos subsequentes (Siler *et al.*, 1926; Rosen *et al.*, 1954). O sucesso do estabelecimento urbano do DENV se deu, em grande parte, devido à expansão do mosquito africano *Ae. aegypti*. Esses mosquitos evoluíram de forma a se tornarem intimamente associados com os humanos, tornando-se eficientes vetores dos DENV e dos vírus da febre amarela (Gubler, 1997).

A partir do século XVIII, devido ao transporte de escravos oriundos da África, o *Ae. aegypti* foi levado para os demais continentes e as epidemias de dengue tornaram-se mais frequentes e disseminadas (Holmes *et al.*, 1998).

O vírus foi inicialmente isolado no Japão por meio da inoculação de material clínico em camundongo (Kimura & Hotta, 1944), na mesma ocasião amostras dos DENV foram isoladas em março de 1944 durante a Segunda Guerra Mundial, a partir de soros de soldados que contraíram a infecção em Calcutá (Índia), Nova Guiné e Havaí (Sabin, 1952). Os vírus provenientes da Índia, do Havaí e de uma das cepas de Nova Guiné foram antigenicamente semelhantes e denominados DENV-1. Atualmente, a cepa Havaí é considerada amostra protótipo. Outras cepas de Nova Guiné apresentaram características antigênicas diferentes, permitindo a identificação de outro sorotipo, que foi classificado com DENV-2, hoje considerado como protótipo. Posteriormente, dois novos vírus foram isolados durante uma epidemia ocorrida em Manila (1953). Estes vírus foram classificados como DENV-3 e DENV-4 (Hammon *et al.*, 1960).

Após a Segunda Guerra Mundial que ficou evidente a mudança no comportamento da doença. O crescimento populacional, a urbanização descontrolada, a falta de programas efetivos para o controle do vetor e o aumento das viagens comerciais contribuíram para a expansão geográfica do mosquito transmissor e do vírus, permitindo o estabelecimento de focos hiperendêmicos com potencial epidêmico em várias partes do Mundo (Gubler, 1997).

Apesar da elevada transmissão epidêmica e hiperendemicidade, a dengue manteve-se localizada no Sudoeste Asiático devido principalmente, ao programa de erradicação do *Ae. aegypti* nas Américas, para o controle da febre amarela urbana, exitosa nas décadas de 50 e 70 (Rigau-Pérez *et al.*, 1998; Gubler, 2002). Após a interrupção desse programa no final dos anos 70, o *Ae.aegypti* voltou a infestar a maioria dos países americanos (Gubler, 2002).

Durante os anos 80, verificou-se a expansão geográfica das epidemias de dengue envolvendo a região das Américas, bem como a África, China e a Austrália, tendo como distribuição mundial, as mudanças ocorridas no ambiente e no comportamento da população humana (Monath, 1994).

Na década de 50, somente nove países apresentavam a doença. Atualmente cerca de mais de 100 países no mundo já apresentaram registros da mesma. (Whitehead, 2007; Gómez-Dantés & Willoquet, 2009).

Nikos Vasilakis, da Universidade Texas Medical Branch (EUA) e um grupo de pesquisadores identificaram um novo tipo de vírus da dengue na Malásia, os dados sobre o sorotipo 5 da doença foram apresentados em uma conferência realizada no final de outubro, em Bancoc, na Tailândia. A descoberta se deu quando cientistas da Universidade do Texas receberam amostras de sangue de uma epidemia de dengue ocorrida em 2007, na Malásia, o micro-organismo era diferente dos quatro sorotipos conhecidos da dengue, o que foi confirmado por sequenciamento genético. A descoberta, portanto, impõe mais um desafio para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue, que teriam que abordar um quinto elemento.

1.1.1. Dengue nas Américas

A dengue tem sido relatada nas Américas há mais de 200 anos. Na década de 50, a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) foi descrita, pela primeira vez, nas Filipinas e Ásia. Após a década de 60, a circulação do vírus da dengue intensificou-se nas Américas. A partir de 1963, foi comprovada a circulação dos sorotipos 2 e 3, em diversos países. Em 1977, o sorotipo 1 foi introduzido nas Américas, inicialmente

pela Jamaica. A partir de 1980, epidemias foram notificadas em vários países, aumentando consideravelmente a magnitude do problema, como as ocorridas no Brasil (1982/1986/2002/2008/2010), Bolívia (1987), Paraguai (1988), Equador (1988), Peru (1990) e Cuba (1977/1981).

No ano de 1981, o DENV-4 foi introduzido no Continente Americano e, durante esta década, além da expansão da área de transmissão e do aumento do número de casos notificados, ocorreu em Cuba, a primeira epidemia de Febre Hemorrágica da Dengue/Síndrome do Choque da Dengue (FHD/SCD) das Américas. Nesta epidemia causada pelo DENV-2, foram notificados cerca de 344 mil casos com aproximadamente 116 mil internações e 158 óbitos (Kouri et al., 1986; Gubler, 2006). Entre 1981 e 1996 foram notificados 42 mil casos de FHD/SCD distribuídos em 25 países. Deste total, cerca de 22 mil casos ocorreram na Venezuela, onde foram isolados DENV-1, DENV-2 e DENV-4, o que a consagrou como a segunda maior epidemia de FHD/SCD das Américas (PAHO, 1997).

No ano de 1994, ocorreu a reintrodução do DENV-3 na Nicarágua, tendo este sorotipo isolado nos anos seguintes, em todos os países da América Central (Guzmán et al, 1996). Em 1998, o DENV-3 foi detectado em Porto Rico seguido pelo isolamento do DENV-4 (Rigau-Pérez et al, 2002).

Ocorre atualmente a circulação dos quatro sorotipos do DENV em vários países da América do Sul e Caribe (Guzmán & Kouri, 2002; Figueroa & Ramos, 2000).

1.1.2. Dengue no Brasil

Em 1955, houve a confirmação da erradicação do mosquito *Ae. aegypti* no Brasil, graças a uma campanha iniciada em 1904 por Oswaldo Cruz com objetivo de combater a febre amarela no então Distrito Federal, agora Rio de Janeiro. Esta provavelmente foi a razão para a ausência de surtos de dengue entre 1923 e 1981 (Figueiredo, 2000).

Nas décadas de 1930 e 1940, os países das Américas, incentivada pela Fundação Rockefeller, executaram campanhas de erradicação do mosquito *Ae. aegypti* e também nos anos de 1923 e 1940, essa Fundação atuou contra a febre amarela. Essa campanha, a partir de um acordo com o Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP), conferia àquela organização norte-americana a responsabilidade exclusiva pela eliminação do *Ae. aegypti* (Lowy I, 1999).

Em 1947, a Organização Pan-Americana da Saúde e a Organização Mundial da Saúde decidiram coordenar a erradicação do mosquito *Ae. aegypti* no continente, por intermédio do Programa de Erradicação do *Ae. aegypti* no Hemisfério Oeste (Donalisio M.R, 1999; Soper F.L, 1965). Eficientes programas contra o vetor foram implementados em todos os países latino-americanos, entre o final da década de 1940 e a década de 1950 (Lowy I, 1999). Essa espécie foi eliminada em quase toda a América, com exceção dos Estados Unidos da América, Suriname, Venezuela, Cuba, Jamaica, Haiti, República Dominicana e uma pequena parte da Colômbia (Soper F.L, 1965).

O Brasil participou da campanha de erradicação continental do mosquito *Ae. aegypti* e teve êxito na primeira eliminação desse vetor em 1955. O último foco do mosquito foi extinto no dia 2 de abril daquele ano, na zona rural do Município de Santa Terezinha, Bahia (Franco O, 1969). Em 1956, foi criado o Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu), órgão que assumiu as ações de combate à febre amarela e à malária, incorporando o Serviço Nacional de Febre Amarela e a Campanha de Erradicação da Malária (Diretrizes do Programa de Controle de febre amarela e dengue no Brasil, 1980).

Em 1958, na XV Conferência Sanitária Pan-Americana, em Porto Rico, foi oficialmente declarado que o País conseguira erradicar o vetor (Programa Nacional de Controle da Dengue, 2002). Porém, a re-introdução do *Ae. aegypti* no país na década de 70 foi inevitável, já que a campanha de erradicação do mosquito foi descontinuada (Schatzmayr, 2000).

No Brasil, a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista (RR), causada pelos sorotipos 1 e 4. Em 1986, ocorreram epidemias atingindo o Rio de Janeiro e algumas capitais da região

Nordeste. Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma endêmica intercalando-se com períodos de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes e/ou alteração do sorotipo predominante (Nogueira et al, 2000). Na epidemia de 1986, identificou-se a ocorrência da circulação do sorotipo DENV1, inicialmente no Estado do Rio de Janeiro, disseminando-se, a seguir, para outros seis estados até 1990. Nesse ano, foi identificada a circulação de um novo sorotipo, o DENV2, também no Estado do Rio de Janeiro (Nogueira et al, 2002). Durante a década de 90, ocorreu um aumento significativo da incidência, reflexo de ampla dispersão do *Ae. aegypti* no território nacional. A presença do vetor, associada à mobilidade da população, levou à disseminação dos sorotipos DENV1 e DENV2 para 20 dos 27 estados do país. Entre os anos de 1990 e 2000, várias epidemias foram registradas, sobretudo nos grandes centros urbanos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, responsáveis pela maior parte dos casos notificados. As regiões Centro-Oeste e Norte foram acometidas mais tardiamente, com epidemias registradas a partir da segunda metade da década de 90. (Diretrizes Nacionais do Controle da Dengue, 2009)

A circulação do sorotipo 3 do vírus foi identificada, pela primeira vez, em dezembro de 2000, também no Estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, no Estado de Roraima, em novembro de 2001. Em 2002, foi observada a maior incidência da doença, quando foram confirmados cerca de 697.000 casos no país, refletindo a introdução do DENV-3. Essa epidemia levou a uma rápida dispersão do sorotipo DENV-3 para outros estados, sendo que em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (Diretrizes Nacionais do Controle da Dengue, 2009).

No Brasil, os adultos jovens foram os mais atingidos pela doença desde a introdução do vírus. No entanto, a partir de 2006, alguns estados apresentaram a recirculação do sorotipo DENV2 após alguns anos de predomínio do sorotipo DENV3. Esse cenário levou a um aumento no número de casos, de formas graves e de hospitalizações em crianças, principalmente no Nordeste do país. Em 2008, foram notificados 585.769 casos e novas epidemias causadas pelo sorotipo DENV2 ocorreram em diversos estados do país, marcando o pior cenário da doença no Brasil considerando-se o total de internações e número de óbitos até a ocasião.

Essas epidemias foram caracterizadas por um padrão de migração de gravidade para as crianças, que representaram mais de 50% dos pacientes internados nos municípios de maior contingente populacional. Mesmo em municípios com menor população, mais de 25% dos pacientes internados por dengue eram crianças, o que ressalta que todo o país vem sofrendo, de maneira semelhante, essas alterações no perfil da doença (Diretrizes Nacionais do Controle da Dengue, 2009).

No Brasil, houve reintrodução do sorotipo 4, ao final do ano de 2009 nos estados de Roraima e Amazonas e posteriormente se disseminou para os demais estados, hoje a maior parte dos estados brasileiros tem a circulação do sorotipo 4, segundo informações do Ministério da Saúde do Brasil.

Segundo o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos, uma nova vacina tetravalente de vírus atenuados está se revelando bastante promissora (Tetra Vax-DV), foi testada em 112 voluntários com idades diferentes e que nunca tiveram dengue. A proteção foi de 90% dos participantes contra os vírus 1, 3 e 4 e forneceu bons resultados contra os 4 tipos em 45% dos participantes. A vacina será testada no Brasil pelo Instituto Butantã em parceria com a Faculdade Nacional de Medicina da USP, assim que obtiver autorização Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Um estudo com 300 voluntários vai avaliar a imunidade produzida pela vacina e a segurança da mesma em relação a eventos adversos. Estes voluntários serão acompanhados durante 5 anos para observar como a proteção se mantém e o número de doses necessárias. Há várias formulações de vacina contra dengue em vários estágios de desenvolvimento, porém, todas enfrentam dificuldades. A vacina criada pelo laboratório Sanofi Pasteur é que se encontra em estágio mais adiantado, dados preliminares dão conta que ela teve bom desempenho para os vírus 1, 3 e 4, mas não mostrou eficácia para o vírus 2. Os resultados de estudos em andamento no Brasil como os de outros na América e na Ásia deverão estar disponíveis no final de 2014, segundo o diretor do Projeto Internacional “Dengue Vaccine Initiative” (<http://prophylaxis.com.br>)

As epidemias de dengue determinam uma importante carga de serviços de saúde e à economia dos países. Apesar de poucos estudos existentes sobre o tema, um recente trabalho realizado em oito países do continente americano e asiático,

incluindo o Brasil, demonstrou que o custo das epidemias nesses locais foi cerca de U\$ 1,8 bilhão, somente com despesas ambulatoriais e hospitalares, sem incluir os custos com as atividades de vigilância, controle de vetores e mobilização da população (Diretrizes Nacionais do Controle da Dengue, 2009).

O quadro epidemiológico do país aponta para a vulnerabilidade à ocorrências de epidemias, bem como para um aumento das formas graves, podendo ocasionar o aumento de óbitos e da letalidade. Outro fator de preocupação é o aumento de casos na faixa etária mais jovem, inclusive crianças, cenário já observado em outros países (Diretrizes Nacionais do Controle da Dengue, 2009).

1.2. Transmissão da dengue

A transmissão da doença se faz pela picada dos mosquitos *Ae.aegypti*, no ciclo humano-*Ae. aegypti*-humano (Figura 1). Após o repasto de sangue infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. A transmissão mecânica também é possível, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta num hospedeiro suscetível próximo. Não há transmissão por contato direto de um doente ou se suas secreções com uma pessoa sadia, nem por intermédio de fontes de água ou alimento. Há relatos de transmissão vertical (gestante-bebê) do vírus DENV2, ocorridos na Tailândia e Malásia (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2009).

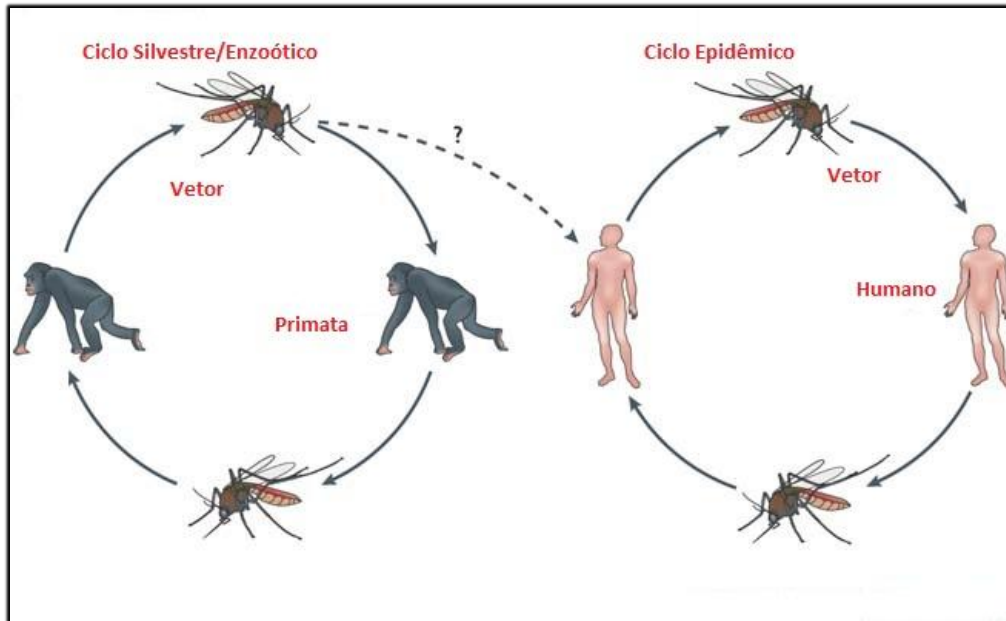


Figura 1: Ciclo de transmissão da dengue (adaptado de Whitehead, 2007)

O período de transmissibilidade da doença compreende dois ciclos: um intrínseco, que ocorre no ser humano, e outro extrínseco, que ocorre no vetor. A transmissão do ser humano para o mosquito ocorre enquanto houver presença de vírus no sangue do ser humano (período de viremia). Esse período começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o 6º dia da doença. No mosquito, após um repasto de sangue infectado, o vírus vai se localizar nas glândulas salivares da fêmea do mosquito, onde se multiplica depois de 8 a 12 dias de incubação, a partir desse momento, é capaz de transmitir a doença e assim permanece até o final de sua vida (de 6 a 8 semanas) (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2009).

Há ocorrência da transmissão vertical do vírus da dengue em populações de *Ae. albopictus*, em condições de laboratório. Foram utilizadas cinco populações geograficamente distintas, sendo três americanas (Indianapolis, Houston, New Orleans) e duas asiáticas (Cingapura e Japão). Como controles, foram empregadas uma população de *Ae. albopictus* de laboratório (OAHU) e uma de *Ae. aegypti*. A variação na transmissão foi grande entre as populações e maior ainda, entre as famílias de uma mesma população. Análises estatísticas, no entanto, demonstraram que as diferenças observadas não eram significantes. A via vertical de transmissão do vírus DEN no *Ae. albopictus* foi considerada não muito importante na natureza e

até rara. Entretanto, *Ae. albopictus* mostrou-se vetor vertical competente, sendo capaz de fornecer ao vírus DEN-1 mecanismo para ultrapassar o período de inverno e manter o ciclo de vida em períodos inter-epidemias. A transmissão horizontal do vírus DEN pelo *Ae. albopictus* é variável (Bosio e col, 1992).

Em relação à transmissão sexual, observou-se que mosquitos machos podem contaminar fêmeas, principalmente se albergarem o vírus por mais de 7 dias e a fêmea tiver recebido repasto sangüíneo pelo menos 2 dias antes do acasalamento, o que é raro em ambiente natural. Sem o repasto, a taxa de contaminação é baixa. As fêmeas, provavelmente, não são capazes de transmitir o agente infeccioso por via sexual e, se o fazem, a taxa é baixa (Rosen L, 1987).

A replicação dos quatro sorotipos de vírus de dengue em *Ae. albopictus* machos e fêmeas, infectados por via parenteral, obtiveram títulos altos em ambos os sexos (Rosen e Gubler, 1974). Quando comparados os títulos atingidos após a infecção parenteral (machos e fêmeas) e oral (fêmeas) observou-se que os títulos em fêmeas eram cinco vezes mais altos que em machos, e naquelas infectadas por via oral, os títulos foram mais tardios e mais altos que por infecção parenteral (Gubler e Rosen, 1977).

A sensibilidade de várias espécies e populações de mosquitos aos quatro sorotipos de dengue, notou-se que, surpreendentemente, várias espécies comuns de *Aedes* eram mais susceptíveis à infecção oral para cada um dos 4 sorotipos de dengue que o próprio *Ae. aegypti*, incluindo dentre eles, o *Ae. albopictus*. Quase todas as espécies de *Aedes* testadas eram uniformemente susceptíveis à infecção parenteral. Os vírus DEN replicaram normalmente na mesma extensão em mosquitos infectados, tanto por via oral como por via parental. (Rosen e col.,1985).

A importância de barreiras intrínsecas à infecção e transmissão devem ser consideradas no estudo da capacidade vetorial, principalmente na avaliação do papel que determinada população pode desempenhar na transmissão de vírus na natureza. Entretanto, até o momento, nenhum estudo tem avaliado essas barreiras intrínsecas em relação à transmissão de dengue.

1.3. Agente Etiológico

A dengue é uma enfermidade causada por um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui quatro tipos imunológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que não conferem ao indivíduo infectado imunidade duradoura entre si, podendo, o mesmo indivíduo contrair até quatro vezes a doença. No momento em que uma pessoa é infectada com o vírus da dengue, este vírus pode ser encontrado no soro ou no plasma, nas células que circulam no sangue e em tecidos selecionados, especialmente os do sistema imunológico. O período de viremia da doença varia de 2 à 7 dias. A infecção por um dos sorotipos dá proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três. Atualmente no Brasil, há circulação dos quatro sorotipos. (Pires Neto RJ *et al*, 2005)

O DENV exibe considerável diversidade antigênica, sendo que critérios sorológicos foram utilizados para classificar os quatro sorotipos do DENV, os quais divergem, em aproximadamente, 30% em suas sequências protéicas (Mackenzie *et al.*, 2004; Holmes, 2006).

O vírus tem formato esférico, diâmetro entre 40 e 60 nanômetros (nm) e genoma RNA (ácido ribonucléico) de fita simples e polaridade positiva (Figura 2). O genoma é infeccioso, comportando-se como um RNA mensageiro (RNAm) (Chambers, 1990). O nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, composto por uma proteína, a proteína C (capsídeo) está envolvido por uma bi-camada lipídica a qual constitui o envelope. Embebidas na bi-camada do envelope, encontram-se a proteína E (envelope) e a proteína M (membrana), que também poder ser encontrada em sua forma não processada prM (pré-membrana) (Chen *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 2003).

Anticorpos para a proteína E inibem a ligação do vírus à célula e neutralizam o vírus. Esses anticorpos apresentam graus variáveis de reação cruzada entre os sorotipos dos DENV.

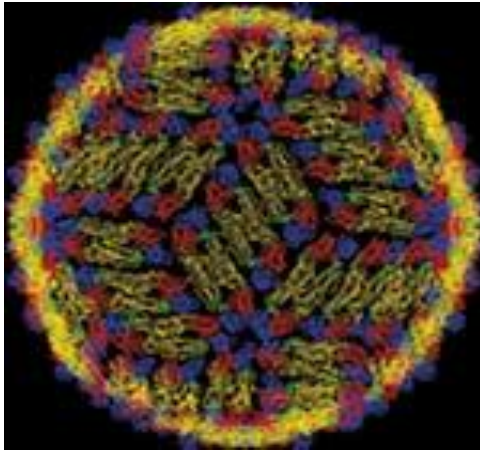


Figura 2: Vírus Dengue (Fonte: combatedengue.com.br)

Conforme figura 3, o DENV tem sete outras proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) que estão relacionadas com a infecção viral. As proteínas não estruturais são importantes na replicação, na transmissão pelo vetor, na virulência e outras funções no hospedeiro. Um importante alvo dos anticorpos para DENV é a proteína NS1, uma glicoproteína conservada que parece ser essencial para a replicação do vírus. Essa proteína é expressa na superfície das células infectadas e se encontra na circulação como uma substância solúvel. (Deubel V *et al*, 1992).

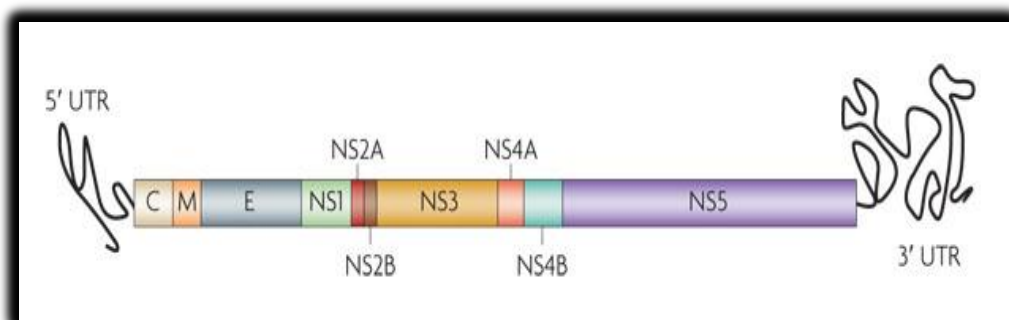


Figura 3: RNA Genômico do vírus da dengue (Fonte: www.nature.com)

A NS1 foi reconhecida primeiramente como antígeno pela fixação de complemento solúvel (FSC) em cultura de células infectadas pelo DENV (Brandt *et al.*, 1970). Dentre as proteínas não estruturais é a mais conservada apresentando elevado grau de reação cruzada entre os quatro sorotipos (Zainah *et al.*, 2008).

A função da NS1 na infecção pelo DENV ainda não é totalmente conhecida. Porém alguns estudos, além de avaliarem a detecção de NS1 como ferramenta para diagnóstico também identificaram uma correlação entre a gravidade da doença e a quantidade desse antígeno no soro (Young *et al.*, 2000; Libraty *et al.*, 2002). A detecção precoce em altas concentrações de NS1 como ferramenta para prever a evolução clínica da doença tem sido postulada, mas não avaliada (Libraty *et al.*, 2002). De acordo com Avirutnan e colaboradores (2006) níveis séricos aumentados da proteína NS1 solúvel podem ativar o sistema complemento com a expressão de NS1 nas células infectadas resultando na ligação de anticorpos não-neutralizantes, além de criar focos de complexos imunes, dano endotelial e extravasamento capilar. Falconar e colaboradores (1997) associaram a formação de imunocomplexos com a NS1 e sua ligação nas células endoteliais como um fator de gravidade, contribuindo para o extravasamento de plasma.

A proteína NS1, juntamente com as proteínas NS3 e E, estimulam a ação citotóxica dos linfócitos, restando, após a primoinfecção, uma quantidade decrescente de anticorpos subneutralizantes e a presença das células de memória sensibilizadas especificamente para os DENV (Guimarães, 1999).

Estudos recentes sugerem que a proteína NS1 poderia contribuir para a imunopatologia da dengue. Níveis plasmáticos elevados de NS1 em crianças foram associados com a dengue grave, refletindo possivelmente no aumento de carga viral nesses pacientes (Libraty *et al.*, 2002; Avirutnan *et al.*, 2006).

1.4. Manifestações Clínicas

A dengue é uma doença febril aguda, que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresente: infecção inaparente, dengue

clássica , febre hemorrágica da dengue ou síndrome do choque da dengue (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2009). A partir de janeiro de 2014 o Brasil adotou uma nova classificação de caso de dengue revisada da Organização Mundial de Saúde: descartado, dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave (SVS, 2014).

1.5. Vigilância Epidemiológica

Caso suspeito é toda pessoa que viva ou tenha viajado nos últimos 14 dias para área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue ou tenha a presença de *Ae. aegypti*, que apresenta febre, usualmente entre 2 e 7 dias, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações: náusea, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaleia, dor retro orbital, petéquias ou prova do laço positiva, leucopenia (SVS, 2014).

Caso suspeito de dengue com sinais de alarme é todo caso de dengue que, no período da febre apresente um ou mais dos seguintes sinais de alarme: Dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdômen, vômitos persistentes, acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural (lipotímia), hepatomegalia maior do que 2 cm ou aumento progressivo do hematócrito (SVS, 2014).

Caso suspeito de dengue grave é todo caso de dengue que apresenta um ou mais dos seguintes resultados: choque, sangramento grave ou comprometimento grave de órgãos (SVS, 2014).

Caso confirmado é todo caso suspeito de dengue confirmado laboratorialmente (sorologia IgM, NS1 teste rápido ou ELISA, isolamento viral, PCR, Imunohistoquímica) (SVS, 2014).

Caso descartado é todo caso suspeito de dengue que possui um ou mais dos seguintes critérios: diagnóstico laboratorial negativo (deve-se confirmar se as amostras foram coletadas no período adequado) não tenha critério de vínculo clínico-epidemiológico, tenha diagnóstico laboratorial de outra entidade clínica ou seja um caso sem exame laboratorial, cujas investigações clínica e epidemiológica são compatíveis com outras patologias (SVS, 2014).

A infecção pelo vírus dengue pode apresentar diferentes quadros clínicos, desde a infecção assintomática, a febre indiferenciada ou a clássica dengue febril, até formas mais graves como a dengue hemorrágica e a dengue com síndrome do choque, para as quais se observam taxas elevadas de morbidade e de mortalidade (SVS, 2014).

A dengue clássica caracteriza-se por uma febre com duração de 3 a 5 dias, dores de cabeça, dores musculares e articulares, com bom prognóstico. A dengue hemorrágica e a dengue com síndrome do choque encontram-se, sobretudo em doentes anteriormente infectados pelo vírus. Os sintomas são semelhantes aos da dengue clássica, mas fazem-se acompanhar de um aumento da permeabilidade vascular e sinais hemorrágicos que levam a hipotensão, hipovolemia, colapso vascular e morte (SVS, 2014).

Alguns indivíduos podem ser infectados e não apresentar sintomas, em razão das características de baixa virulência do vírus, ou do estado imunológico do indivíduo. É a forma clínica mais comum, e estima-se que, durante as epidemias, ocorra um caso sintomático para cada cinco assintomáticos. Na forma oligossintomática não se pode diferenciar clinicamente a dengue de outras viroses. Apresenta-se como febre indiferenciada, assemelhando-se à síndrome gripal (Souza *et al.*, 2008).

O principal desafio associado ao tratamento de doentes infectados é a rapidez e a especificidade da detecção do vírus da dengue durante a fase aguda, de forma a instituir um tratamento eficaz, o mais rapidamente possível. O isolamento e a identificação do vírus ou a detecção de ácido nucléico viral permitem um diagnóstico precoce durante a fase febril, mas estes métodos requerem um ambiente de laboratório especializado e não é possível obter resultados imediatos (Diretrizes Nacionais do Controle da Dengue, 2009).

A detecção de anticorpos específicos dirigidos contra o vírus da dengue é o método classicamente utilizado na rotina. No entanto, estes anticorpos surgem apenas após o aparecimento dos primeiros sintomas. Na infecção primária, os anticorpos de tipo IgM e IgG elevam-se respectivamente cerca de 5 a 14 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas. Na infecção secundária, as taxas de IgM são fracas ou até indetectáveis, enquanto que as de IgG se elevam, 1 a 2 dias após o

aparecimento dos sintomas, com taxas muito superiores às observadas durante uma infecção primária (Diretrizes Nacionais do Controle da Dengue, 2009).

Mais recentemente, a detecção da proteína viral não estrutural NS1 no soro de doentes foi descrita como um método alternativo para diagnóstico precoce da infecção. NS1 é uma glicoproteína altamente conservada que está presente em altas concentrações no soro dos pacientes infectados por dengue durante o estágio inicial da doença. O antígeno NS1 encontra-se na circulação desde o primeiro até ao nono dia seguinte ao aparecimento da febre, e as taxas observadas são comparáveis nas formas primárias e secundárias de infecção (Libraty *et al*, 2002).

1.6. Diagnóstico Laboratorial

A importância do diagnóstico laboratorial da dengue não se limita à assistência médica, mas também é uma ferramenta essencial para a investigação epidemiológica dos casos e no controle da doença. A metodologia clássica para o diagnóstico laboratorial envolve técnicas imunoenzimáticas de detecção de anticorpos, tendo como principal desvantagem o seu caráter retrospectivo. Novas alternativas vêm sendo investigadas visando à minimização do tempo e custos, possibilitando o monitoramento e identificação dos vários sorotipos circulantes de forma mais efetiva.

O diagnóstico da doença também pode ser feito por exames específicos (isolamento viral, detecção do RNA viral, ou métodos sorológicos que demonstram a presença de anticorpos da classe IgM, em uma única amostra de soro, ou aumento do título de anticorpo IgG em amostras pareadas) ou inespecíficos (hematócrito e plaquetometria são os mais importantes para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com manifestações hemorrágicas e para pacientes em situações especiais) (Gubler & Sather, 1988).

Um dos fatores mais importantes e necessários para o diagnóstico clínico e para a vigilância epidemiológica da dengue é a disponibilidade de métodos rápidos, sensíveis e específicos para detectar a infecção viral. Neste contexto, vários testes comerciais têm sido desenvolvidos tendo como princípio a pesquisa de anticorpos

específicos (Wu *et al.*, 1997; Kuno *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 2000; Cuzzubbo *et al.*, 2001).

1.6.1. Isolamento Viral

O estabelecimento da cultura de células de mosquito no sistema de isolamento viral representou um grande avanço aos métodos virológicos utilizados no diagnóstico do dengue (Gubler & Sather, 1988). O clone C6/36 de células de mosquito *Ae. albopictus*, (Igarashi, 1978) tem sido o mais utilizado nas últimas décadas, pois demonstrou ser altamente sensível à infecção pelos DENV, além de sua fácil manutenção, já que pode ser mantida à temperatura ambiente (Nogueira *et al.*, 1988; Miagostovich *et al.*, 1993).

O isolamento viral em cultura de células é a principal técnica utilizada pelos laboratórios da rede nacional para o monitoramento viral e tem como objetivo detectar precocemente os sorotipos circulantes em uma determinada área, sendo de fundamental importância para vigilância da dengue. O isolamento viral é o método mais específico (padrão ouro) para identificação do sorotipo do DENV responsável pela infecção. Pode ser realizada em amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) e fragmentos de vísceras (fígado, baço, coração, pulmão, rim e cérebro). A coleta da amostra de sangue deverá ser feita no período de viremia da doença (até o 5º dia de doença do início dos sintomas). Para a identificação viral, utiliza-se a técnica de imunofluorescência, que se baseia na reação de um anticorpo marcado com um fluorocromo (anticorpos fluorescentes) com antígenos homólogos (Igarashi, 1978).

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

O percentual de positividade das amostras de isolamento viral enviadas para realização no Brasil vinha se mantendo abaixo de 14%. Diante da situação

epidemiológica da dengue no Brasil, com circulação de quatro sorotipos e alternância de predomínio entre eles, houve a necessidade de aumentar o percentual de positividade do isolamento viral em cultura de células C6/36, garantindo um monitoramento mais efetivo da doença (SVS, 2009).

1.6.2. Ensaios Imuno- Enzimático para detecção da proteína NS1

Um dos fatores mais importantes e necessários para o diagnóstico clínico e para a vigilância epidemiológica da dengue é a disponibilidade de métodos rápidos, sensíveis e específicos para detectar a infecção viral. Neste contexto, vários testes comerciais têm sido desenvolvidos para o diagnóstico das infecções por DENV para pesquisa de anticorpos específicos (Wu *et al.*, 1997; Kuno *et al.*, 1998). Vários testes de captura de IgM e IgG encontram-se disponíveis comercialmente, possibilitando a análise rápida e reprodutível de um grande número de amostras, sem a necessidade de equipamentos sofisticados (Vaughn *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2000). Com o objetivo, de detectar a doença em sua fase inicial, alguns ensaios imuno-enzimáticos para a captura da proteína viral solúvel NS1 vêm sendo desenvolvidos com sucesso (Zainah *et al.*, 2009).

Ensaios imunoenzimáticos e imunocromatográficos para detecção da proteína NS1 estão disponíveis no mercado (Alcon *et al.*, 2002). Como o antígeno NS1 está presente no soro dos indivíduos infectados desde o primeiro dia de doença, permanecendo na forma solúvel até o quinto ou sexto dia, seu uso vem sendo estudado como ferramenta de detecção precoce da dengue (Shu PY *et al.*, 2009).

É um método, a princípio, bastante sensível e específico, devendo ser utilizado em pesquisas e nos casos graves. O Ministério da Saúde disponibiliza kits para detecção do NS1 para triagem das amostras destinadas ao isolamento viral em Unidades Sentinelas.

Os testes para a detecção do antígeno NS1 no soro humano foram evoluindo. O antígeno NS1 é encontrado juntamente com endotélio, livre ou solúvel no soro de pacientes, a partir de um dia antes do início dos sintomas e pode ser detectado, pelo

menos, até cinco dias após o início dos sintomas, o que permite um diagnóstico precoce da doença (Alcon *et al*, 2002).

A principal vantagem da detecção da proteína NS1 é a rapidez do resultado, aproximadamente duas horas. O NS1 apresenta vantagem também sobre a técnica de detecção de anticorpos da classe IgM (imunoglobulina M) antidengue, chamada MAC-Elisa, pois esta não pode ser utilizada na fase aguda da doença, pois o IgM só se torna detectável entre cinco e dez dias depois do aparecimento da febre em casos de infecção primária e, em alguns casos, é de difícil detecção em infecções secundárias. Por isso, costuma ser utilizada somente a partir do sexto dia da doença. (Castro, L.A,2008)

Existem dois formatos de ensaio: NS1 imunocromatográfico e ELISA. O teste utilizado nesse contexto é o Platelia™ Dengue NS1 Ag (Figura 4), sendo um método imunoenzimático em uma fase, em formato microplaca, para detecção qualitativa ou semi-quantitativa do antígeno NS1 do DENV no soro ou plasma humano. Os testes utilizam anticorpos monoclonais de camundongo (AcM) para a captura e a revelação.(Bisordi *et al*, 2011)

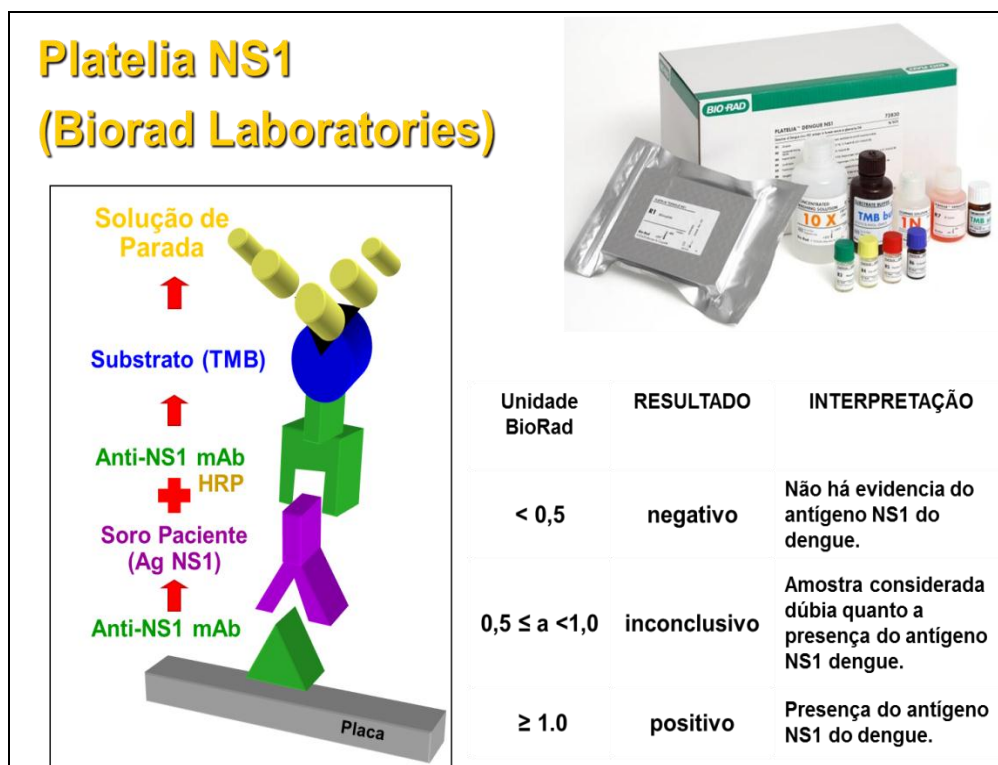


Figura 4: Kit Platelia™ Dengue NS1 Ag

1.7. Unidades Sentinelas

No Brasil, as atividades de monitoramento da circulação do vírus da dengue foram reforçadas com a implantação de unidades sentinelas (US) nos municípios estratégicos, com o propósito de aumentar o percentual de positividade na técnica de isolamento viral e/ou biologia molecular, onde as amostras suspeitas de dengue foram triadas pelo teste ELISA NS1, capaz de detectar a presença do vírus nos primeiros dias de doença.

Unidades Sentinelas são unidades de saúde com capacidade para identificar, investigar e notificar os casos de doenças/agravos relacionados à saúde pública. Essas unidades têm como atribuições: identificar o caso de dengue; realizar a investigação epidemiológica; confirmar ou descartar o caso, segundo critérios estabelecidos e notificar o caso confirmado.

Os critérios adotados pelo Ministério da Saúde para seleção das UFs e municípios para implantação das Unidades Sentinela foram: Potenciais portas de entrada do sorotipo DENV4; Circulação de DENV2; Registro de casos graves e casos graves em crianças; Documento de adesão do Secretário Municipal e Estadual para a implantação.

A dengue é um agravo de notificação compulsória (Portaria GM/MS nº1271 de 06 de junho de 2014) e, portanto, todos os casos suspeitos (sendo ou não confirmados) devem ser, obrigatoriamente notificados à Vigilância Epidemiológica do município. As unidades de saúde são as principais fontes de detecção dos casos suspeitos de dengue e, também fontes de dados para os serviços de vigilância. A rápida coleta de informações nas unidades de saúde e a qualidade destes dados são essenciais para o desencadeamento oportuno de ações de controle e prevenção no nível local. Dessa forma, é fundamental a boa comunicação entre as equipes destas unidades, a vigilância epidemiológica, entomológica e o laboratório.

As Unidades Sentinelas de monitoramento viral para dengue, com estratégia de triagem pelo ELISA-NS1, foram implantadas no ano de 2009 em 16 Unidades Federativas - UF e 25 municípios, com previsão inicial de 68 Unidades de Saúde

para atuarem como sentinelas. Destas, foram implantadas 48 Unidades Sentinela pelas Vigilâncias Epidemiológicas Estaduais e Municipais, que foram avaliadas *in loco* pela Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue (CGPNCD), conforme observado no quadro 1.

Estado	MUNICÍPIO	UNIDADE SENTINELA
AC	Rio Branco	C.S. Claudia Vitorino
		Hosp. Urg, Emerg. Rio Branco
		UPA Barral Y Barral
AP	Macapá	U.B.S Marcelo Candia
BA	Salvador	5º Centro de Saúde - Barra/Rio Vermelho
		PA Rodrigo Argolo - Itapoã
		PA Adroaldo Albergaria
		PA Hélio Machado - Cabula Beiru
CE	Fortaleza	Hospital São José
		Hospital José Walter
ES	Vitória	PA Enseada do Suá
		PA São Pedro
	Viana	UPA Central
GO	Goiânia	CAIS Novo Horizonte*
		CAIS Urias Magalhães
		CAIS Cândida de Moraes
		CAIS Chácara do Governador
		CAIS Bairro Goiá
MG	Belo Horizonte	SMSA/BH
		PA São Benedito
	Santa Luzia	PA Sede Santa Luzia
MS	Campo Grande	CRS Moreninha
		CRS Aero Rancho
		CRS Vila Almeida
		UPA Cel. Antonino
PB	João Pessoa	Mangabeira
		Mandacaru
PE	Recife	IMIP
		Hospital Universitário Osvaldo Cruz
		Hospital Otávio Freitas
		Hospital Jaboatão
PR	Foz do Iguaçu	PA Av. Paraná
	Maringá	Hospital Municipal
SE	Aracaju	PA Nestor Piva
		PA Fernando Franco

SP	Santos	Pronto Socorro Zona Leste
	Ribeirão Preto	UBDS Central
	São José do Rio Preto	Pronto Socorro Central
	São Paulo	Hospital Storopoli
RJ	Rio de Janeiro	HM Lourenço Jorge
		HM Salgado Filho
	Cabo Frio	Laboratório Municipal de Saúde
		Hospital Otime Cardoso dos Santos
		Hospital Tamoios
Nova Iguaçu	Hospital Geral de Nova Iguaçu	
RO	Porto Velho	UPA Ana Adelaide
RR	Boa Vista	Hospital Santo Antônio
		Policlínica Cosme e Silva

Quadro 1 – Unidades Sentinelas de monitoramento viral para dengue implantadas em 2009, no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Diante da atual situação epidemiológica da dengue no Brasil, com circulação dos quatro sorotipos e alternância de predomínio entre eles, há necessidade de aumentar a sensibilidade do isolamento viral em cultura de células C6/36, garantindo um monitoramento mais efetivo da doença. Com esse intuito o Ministério da Saúde identificou algumas unidades sentinelas no Brasil, para realizar a detecção do antígeno NS1 como um teste de triagem para o teste padrão ouro, o isolamento viral.

O presente trabalho tem como finalidade avaliar a acurácia do teste Elisa Platelia™ Dengue NS1 Ag utilizado como triagem para o diagnóstico de dengue na rede de laboratórios de saúde pública do Ministério da Saúde do Brasil, garantindo assim um monitoramento efetivo da dengue no país, auxiliando os programas de controle da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a acurácia diagnóstica para a detecção do antígeno NS1 Dengue pelo formato ELISA, quando utilizada por laboratórios de saúde pública, no período de 2009 a 2010.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os resultados obtidos nos ensaios de NS1 com resultados obtidos pela técnica de isolamento do vírus;
- Avaliar a sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste;
- Avaliar a sensibilidade do teste para os quatro sorotipos de dengue;
- Avaliar o funcionamento das Unidades Sentinelas implantadas no Brasil;
- Comparar o valor preditivo positivo do teste com a incidência da doença por mês.

4. MÉTODOS

Delineamento do estudo

O referido trabalho trata-se de um estudo analítico retrospectivo, utilizando-se os resultados laboratoriais para dengue oriundos das unidades sentinelas e laboratórios de referência nacional e estaduais no período de 2009 a 2010.

Critérios de Inclusão e Exclusão

População do estudo:

Foram incluídos os casos de dengue notificados no período de 2009 e 2010 de acordo com critério definido pelo Programa Nacional de Controle da Dengue/Ministério da Saúde, isto é, todo paciente que apresente doença febril aguda com duração máxima de até sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro orbitária, mialgia, artralgia, prostração ou exantema associados ou não à presença de hemorragias. Além desses sintomas, o paciente deve ter circulado, nos últimos quinze dias, em área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue ou tenha a presença do vetor *Ae. aegypti*. (Dengue: Diagnóstico e manejo clínico, 2002).

Foram excluídas amostras que não estavam no período de viremia da doença (0 à 3 dias de doença) e amostras que não foram submetidas aos dois testes laboratoriais: Elisa NS1 e isolamento viral.

Estados Incluídos

Dos 16 estados que tiveram as unidades sentinelas implantadas em 2009, foram selecionados seis estados que atenderam os critérios do estudo, isso é, testaram as amostras tanto no ELISA NS1 como submeteram as amostras ao isolamento viral. Os estados selecionados foram: São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo e Goiás. Os demais estados foram excluídos,

pois submeteram as amostras apenas ao teste de ELISA NS1, ou não submeteram as amostras negativas no teste NS1 ao teste de isolamento viral.

Coleta de amostras

Para avaliar o kit diagnóstico, os estados selecionaram amostras de rotina de pacientes que atendiam a definição de caso suspeito de dengue e que estavam preferencialmente até o **terceiro** dia do início dos sintomas. Foram coletadas amostras de sangue e soro dos pacientes elegíveis atendidos nas unidades sentinelas distribuídas no território dos estados selecionados, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010. As amostras envolvidas neste trabalho são oriundas da rotina de trabalho das unidades sentinelas, não foram coletadas amostras para fins de realização deste estudo.

Na avaliação foram consideradas apenas as amostras que tenham sido submetidas aos dois testes, tanto ao NS1 Elisa como o isolamento viral, tendo em vista que um dos objetivos do trabalho é avaliar a acurácia do teste NS1 quando comparado a metodologia padrão ouro, o isolamento viral.

Indicadores epidemiológicos

Para a construção dos indicadores epidemiológicos de incidência foram utilizados os casos notificados de dengue no período de 2009 e 2010 e a população brasileira retirada das bases de dados do IBGE construídas a partir de censos e estimativas censitárias para o ano de 2010, e considerou-se o número de casos novos por 100.000 habitantes.

Considerando que a dengue é uma doença aguda utilizou-se no referido trabalho a prevalência como sendo igual a incidência, e a partir desses valores foram calculados o VPP e VPN por ano.

Determinação da Acurácia

A acurácia de um teste diagnóstico leva em conta como esse teste pode identificar corretamente as pessoas com uma determinada doença e excluir as pessoas que não têm a doença. Essa acurácia pode ser estimada por meio de comparação dos resultados de um teste, chamado de teste índice, no caso o teste Elisa NS1, com os resultados de um teste padrão de referência, neste caso, o isolamento viral. Os participantes de um estudo de teste diagnóstico devem submeter-se tanto ao teste índice quanto ao teste padrão, para que em seguida, os resultados dos testes sejam comparados.

No quadro 2, temos as relações entre os resultados de um teste e o diagnóstico verdadeiro.

RESULTADOS DO TESTE	ISOLAMENTO (PADRÃO OURO)		TOTAL
	PRESENTES	AUSENTES	
POSITIVO	VERDADEIRO POSITIVO (A)	FALSO POSITIVO (B)	TOTAL DE TESTES POSITIVOS (A+B)
NEGATIVO	FALSO NEGATIVO (C)	VERDADEIRO NEGATIVO (D)	TOTAL DE TESTES NEGATIVOS (C+D)
TOTAL	TOTAL DE TESTES POSITIVOS (A+C)	TOTAL DE TESTES NEGATIVOS (B+D)	TOTAL (A+B+C+D)

Quadro 2: Avaliação de acurácia de um teste diagnóstico.

Com o objetivo de realizar uma análise de desempenho, as amostras foram separadas em 4 grupos: verdadeiros positivos, falsos positivos, falsos negativos e verdadeiros negativos de acordo com o padrão ouro definido.

Quando um novo teste para uma doença está sendo avaliado é realizado o teste com dois grupos de pacientes selecionados: doentes e não doentes. Os resultados do teste podem ser expressos dicotomicamente como “positivo” e “negativo”, ou de algumas unidades ao longo de uma escala numérica (Mosenthal, *et al.*, 1950; Unger *et al.*, 1958).

A capacidade de um teste em distinguir doentes e não doentes é definida pela sua sensibilidade e especificidade. A sensibilidade é a capacidade de um teste dar um resultado positivo quando a pessoa testada realmente tem a doença estudada e especificidade é a capacidade do teste de dar um resultado negativo quando o paciente testado está livre da doença em estudo (Thorner *et al*, 1961).

Quando um teste é utilizado em uma grande população, não selecionada, é importante saber o que é o seu valor preditivo - isso é, qual é a probabilidade de que um indivíduo com resultado positivo realmente ter a doença? Por outro lado, qual é a probabilidade do indivíduo com resultado negativo não ter a doença? Este risco não pode ser calculado diretamente a partir de sensibilidade e especificidade obtidas no teste preliminar, uma vez que está relacionado com a prevalência real da doença na população total (Chiang *et al.*, 1956).

A população total é constituída por uma proporção (p) de doentes, e o restante de não doentes (1-p). A proporção desses doentes produzindo um teste positivo, onde (a) é a proporção de indivíduos com doença conhecida rendendo teste positivo no estudo preliminar (sensibilidade), mais (1-p) (1-b), em que (b) é a proporção de indivíduos controles normais produzindo um teste negativo no estudo preliminar (especificidade). Segue-se que a proporção de indivíduos na população total obtendo-se um teste negativo consistirá de p (1-a) mais (1-p) b.

Os resultados dos testes analisados neste estudo foram obtidos a partir das planilhas em Excel encaminhadas pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) mensalmente para a Coordenação Geral de Saúde Pública/Ministério da Saúde (CGLAB/MS).

A partir desses dados foram calculados para o período do estudo os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

Para avaliarmos a acurácia do teste de Elisa de detecção do NS1, foi necessário avaliarmos a sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do mesmo.

Os cálculos foram realizados de acordo com as seguintes fórmulas:

$S = \text{capacidade de reconhecer os verdadeiros positivos } (S=a/a+c)$, em que (a) representa o número de verdadeiros positivos e (c) o número de falsos negativos.

$E=$ é a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença, isto é avalia a capacidade do teste afastar a doença quando ela está ausente ($E=d/c+d$), sendo (c) o número de falsos negativos e (d) o número de verdadeiros negativos.

VPP = probabilidade de que cada positivo do teste, seja um caso ou verdadeiro positivo ($VPP=a/a+b$), em que (a) representa o número de verdadeiros positivos e (b) o número de falsos positivos.

VPN = probabilidade de que cada negativo seja um sadio ($VPN=d/c+d$), em que (d) representa o número de verdadeiros negativos e (c) o número de falsos negativos.

Análise estatística

Para a tabulação e análise dos dados foi utilizado o Microsoft Excel 2010.

Considerações éticas

O estudo foi realizado com base em banco de dados secundários. Não foram acessados dados nominais dos doentes ou qualquer outro dado que propiciasse a identificação destes, sendo respeitadas as legislações/recomendações sobre ética em pesquisa no País.

5. RESULTADOS

Acurácia do teste NS1 para dengue no contexto epidemiológico brasileiro

Accuracy of the NS1 dengue fever test in a brazilian epidemiological context

**Vanessa Torales Porto^{1,2}; Akemi Suzuki³,
Ivani Bisordi³, Renato Pereira³ Vitor Laerte Pinto Junior⁴**

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília-DF

²Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, Ministério da Saúde, Brasília-DF

³ Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP

⁴ Laboratório de Epidemiologia e Vigilância em Saúde, Fiocruz, Brasília-DF

Contato: Vanessa Torales Porto – vanyporto@gmail.com

RESUMO

Introdução: A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, a forma mais grave da doença é a dengue hemorrágica, fatal se não tratada. No mundo, ocorre em mais de 100 países e territórios – 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de contraí-la, e anualmente a taxa de incidência atinge 50 milhões de casos (Tauil, 2002). A dengue é uma enfermidade causada por um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui quatro tipos imunológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Um importante alvo dos anticorpos para DENV é a proteína NS1, uma glicoproteína conservada que parece ser essencial para a replicação do vírus. Recentemente, os testes para a detecção do antígeno NS1 no soro humano foram evoluindo. O antígeno NS1 é encontrado juntamente com endotélio, livre ou solúvel no soro de pacientes, a partir de um dia antes do início dos sintomas e pode ser detectado, pelo menos, até cinco dias após o início dos sintomas, o que permite um diagnóstico precoce da doença. **Objetivo:** Avaliar a acurácia diagnóstica para a detecção do antígeno NS1 Dengue pelo formato ELISA, quando utilizada por laboratórios de saúde pública. **Métodos:** estudo analítico retrospectivo dos exames de dengue oriundos das unidades sentinelas de dengue e laboratórios de referência nacional e estaduais no período de 2009 a 2010. Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. **Resultados:** A sensibilidade média do kit encontrada nos seis estados envolvidos no estudo foi de 94,5% e a especificidade média foi de 61,20%. O valor preditivo positivo de 81,48% no ano de 2009 e em 2010 o valor caiu para 66,17%, e o valor preditivo negativo no ano de 2009 foi de 89,91% e no ano de 2010 o valor aumentou para 94,43%. **Conclusão:** Considerando a sensibilidade de 94,50% encontrada podemos considerar que o teste é sensível, e raramente deixará de encontrar pessoas com a doença. Em relação a especificidade de 61,20%, considera-se um valor abaixo do esperado, podendo ocasionar resultados falsos negativos. O kit é sensível, porém pouco específico.

Palavras chaves: Dengue, Antígeno NS1, acurácia, ELISA, VPP e VPN

ABSTRACT

Introduction: Dengue fever is one of the main public health issues in the world. In its most severe form, dengue hemorrhagic fever, it causes gastrointestinal hemorrhaging which, if untreated, can lead to death. It has been detected in more than 100 countries and territories worldwide -approximately 2.5 billion people are at risk of contracting dengue fever and incidence rate is of 50 million cases per year (Tauil, 2002). Dengue fever is caused by an arbovirus of the family Flaviviridae and genus *Flavivirus* and includes four serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. An important target of antibodies against DENV is the protein NS1, a conserved glycoprotein that appears to be essential for viral replication. Recently, tests for the detection of NS1 antigen in human serum have evolved. This antigen is found in the endothelium, in a free form or soluble in serum of infected patients after one day before symptoms begin, which allows for early diagnosis of the disease. **Objective:** To evaluate the diagnostic accuracy in the detection of the NS1 antigen in an ELISA format in public health laboratories. **Methods:** A descriptive retrospective cohort study of dengue laboratory results from sentinel, state and national reference laboratories in 2009 and 2010. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were determined. **Results:** The mean sensitivity of the Elisa kit in the six states involved in this study was 94.5% and the mean specificity was 61.2%. Positive predictive value was 81.48% in 2009 and decreased to 66.17% in 2010, whereas the negative predictive value was 89.91% and increased to 94.43% in the years 2009 and 2010, respectively. **Conclusion:** Considering the mean sensitivity of 94.50%, it can be concluded that the test will rarely fail at detecting contaminated patients. The mean specificity was lower than expected and it can be concluded that mistakes can occur, particularly in assigning false negatives. The kit is sensitive, however non-specific.

Keywords: dengue; antigen NS1, accuracy, Brazil

Introdução

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo considerada uma doença reemergente em vários países tropicais e subtropicais (Tauil, 2002). A dengue é a arbovirose que apresenta a maior expansão do número de casos no mundo, sendo estimados cerca de 50 milhões de casos por ano e que, aproximadamente, 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. Trata-se de um vírus RNA de cadeia simples compreendendo quatro sorotipos (DENV 1 ao 4) pertencentes à família Flaviviridae e ao gênero Flavivirus (Burke & Monath, 2001).

A doença é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* sendo a espécie *Ae. Aegypti* o principal vetor. A dengue se manifesta após um período de incubação de 3 a 15 dias apresentando como sintomas febre alta, mialgia, cefaléia e artralgia. Formas graves podem ocorrer principalmente ligada à hemoconcentração e evolução para choque (SVS, 2009).

O diagnóstico precoce das infecções pelo vírus dengue (DENV) é de grande importância para direcionar as ações das equipes de controle, minimizando a ocorrência de surtos e epidemias. Os exames específicos para diagnóstico de dengue têm finalidade de orientar ações de vigilância epidemiológica (Poersch CO, 2007).

Um importante alvo dos anticorpos para DENV é a proteína NS1, uma glicoproteína conservada que parece ser essencial para a replicação do vírus. Recentemente, os testes para a detecção do antígeno NS1 no soro humano foram evoluindo. O antígeno NS1 é encontrado juntamente com endotélio, livre ou solúvel no soro de pacientes, a partir de um dia antes do início dos sintomas e pode ser detectado, pelo menos, até cinco dias após o início dos sintomas, o que permite um diagnóstico precoce da doença. O método de Elisa NS1 é bastante sensível e específico, devendo ser utilizado em pesquisas e nos casos graves. Recentemente, os testes para a detecção do antígeno NS1 no soro humano foram evoluindo.

O isolamento viral seguido de imunofluorescência indireta é a técnica considerada padrão ouro para identificação do vírus DENV, porém esse teste requer laboratórios apropriados e com a devida biossegurança. Além de ser um exame

demorado, cerca de 7 a 10 dias para ser concluído. E após o terceiro dia de doença o nível de anticorpos começa a subir, interferindo no resultado e na sensibilidade do isolamento (Young PR *et al*, 2000).

A dengue representa o principal problema de saúde pública ligado às doenças infecciosas no Brasil e novos exames para diagnóstico vêm sendo introduzidos na assistência à saúde. O objetivo desse estudo foi testar a acurácia do teste NS1 Elisa em estados brasileiros em períodos interepidêmicos e epidêmicos.

Metodologia

Desenho do estudo

Foi realizado um estudo analítico retrospectivo dos exames de dengue oriundos das unidades sentinelas de dengue e laboratórios de referência nacional e estaduais no período de 2009 a 2010.

Procedimentos

Do total de 16 estados, foram selecionados seis (São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul) que realizavam tanto o NS1 Elisa quanto o isolamento viral das amostras coletadas. Foram selecionadas as amostras dos pacientes considerados casos suspeitos de dengue com manifestações clínicas até o terceiro dia de doença e tenham sido testadas com o NS1 Elisa e isolamento viral. As amostras compreendem tanto ao período interepidêmico como ao período epidêmico.

Os estados selecionaram amostras de rotina de pacientes que atendiam a definição de caso suspeito de dengue e que estavam preferencialmente até o **terceiro** dia do início dos sintomas. As amostras envolvidas neste trabalho são oriundas da rotina de trabalho das unidades sentinelas dos seis estados envolvidos no estudo no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010, não foram coletadas amostras para fins de realização deste trabalho.

Análise dos dados

Foi utilizado o software Excell 2010 para construção de uma planilha com os dados das amostras analisadas encaminhadas mensalmente pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) para a Coordenação Geral de Saúde Pública/Ministério da Saúde (CGLAB/MS). Para o cálculo da taxa de incidência foram utilizados os casos notificados de dengue para o período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010 retirados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde do Brasil e os dados da população brasileira foi retirada das bases de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE – www.ibge.gov.br) do censo de 2010.

A sensibilidade e a especificidade do teste NS1 Elisa foi calculada considerando-se os resultados obtidos com esse teste com os resultados do isolamento viral, considerado como padrão ouro. O cálculo do valor preditivo positivo e negativo foi executado a partir da incidência da dengue nos estados selecionados; para fins deste estudo e por se considerar a dengue uma doença aguda a prevalência foi tida como igual a incidência.

Questões Éticas

O estudo foi realizado com base em banco de dados secundários. Não foram acessados dados nominais dos doentes ou qualquer outro dado que propiciasse a identificação destes, sendo respeitadas as legislações/recomendações sobre ética em pesquisa no País. As amostras envolvidas neste trabalho são oriundas da rotina de trabalho das unidades sentinelas, não foram coletadas para fins da realização deste trabalho.

Resultados

A sensibilidade do kit Platélia NS1 (Bio-Rad) variou entre os estados envolvidos no estudo, entre 78,54% à 100%, foi feita uma média entre os seis estados durante os dois anos do estudo e o valor encontrado foi de 94,5%.

A especificidade variou entre 8,47% no estado do Mato Grosso do Sul à 81,93% no estado de São Paulo, apresentando uma especificidade média no valor de 61,20% entre os seis estados envolvidos no estudo, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Cálculo de sensibilidade e especificidade do antígeno NS1 Dengue por estado, no período de 2009 e 2010.

Estado	NS1 + com isolamento	NS1 - com isolamento	NS1+ com isolamento +	NS1+ com isolamento -	NS1 - com isolamento +	NS1 - com isolamento -	Sensibilidade	Especificidade
MINAS GERAIS	323	571	205	118	56	515	78,54%	81,36%
PARANÁ	423	241	221	202	2	239	99,10%	54,20%
M.GROSSO DO SUL	393	21	220	173	5	16	97,78%	8,47%
GOIÁS	378	13	341	37	9	4	97,43%	9,76%
ESPIRITO SANTO	135	7	115	20	2	5	98,29%	20,00%
SÃO PAULO	307	143	277	30	7	136	97,54%	81,93%
BRASIL	1959	996	1379	580	81	915	94,45%	61,20%

Foram analisadas 1460 amostras com isolamento viral positivo, quanto a positividade para os diversos sorotipos, notou-se que 76,37% das amostras foram positivas para DENV1; 17,12 % das amostras foram positivas para DENV2 e 6,64% das amostras foram positivas para DENV3 (Figura 1). Não houve positividade para o sorotipo DENV4, pois nesse período segundo informações oficiais publicadas no site do Ministério da Saúde, não houve detecção deste sorotipo no Brasil no período de 2009 e 2010 nestes estados que fazem parte do estudo.

Analisando a sensibilidade do kit diagnóstico para os quatro sorotipos existentes, verificamos uma maior sensibilidade para os sorotipos DENV1 e DENV2 e uma queda da sensibilidade para o sorotipo DENV3.

Segundo dados oficiais do Ministério da Saúde, no ano de 2009 não houveram relatos de circulação do DENV4 no Brasil e no ano de 2010, houve circulação deste sorotipo apenas na Região Norte, nos estados de Roraima, Amazonas e Pará.

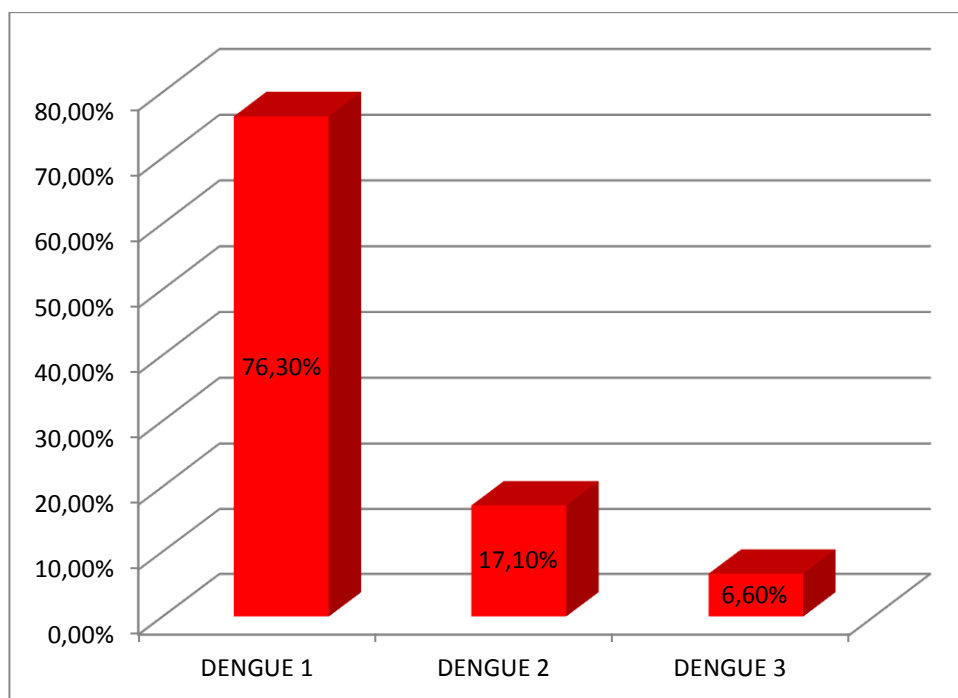


Figura 1: Sensibilidade do Kit Elisa Platelia™ Dengue NS1 Ag. (Bio-Rad Laboratories) para os sorotipos de dengue circulantes no Brasil, no período de 2009 e 2010.

Analisando o total de 2.955 amostras dos seis estados incluídos no estudo foram analisadas por meio da técnica de NS1 Elisa, destas 1.959 foram positivas e 996 negativas. Esses resultados foram comparados com os obtidos por meio do teste de isolamento viral, onde foram criados quatro grupos distintos.

Considerando o total de 1.959 amostras de NS1 Elisa positivo, e avaliando as 1.379 amostras do grupo 1, com o NS1 positivo e isolamento viral positivo, identificamos uma concordância de 70,4% entre as técnicas, demonstrando o percentual de amostras verdadeiramente positivas.

Entre as 580 amostras do grupo 2, que tiveram resultado positivo no NS1 Elisa, e isolamento viral negativo, nota-se que apenas 29,6% das amostras foram discordantes nas duas técnicas, isto é, foram amostras falso positivas.

Considerando o total de 996 amostras negativas no teste NS1 Elisa, e avaliando as 81 amostras do grupo 3, com NS1 negativo e isolamento viral positivo, notamos uma discordância de 8,13%, isto é, foram amostras falso-negativas.

Avaliando as 915 amostras do grupo 4, notamos uma concordância de 91,87% entre as técnicas, significa que as amostras foram verdadeiramente negativas em sua grande maioria.

Avaliando o funcionamento das Unidades Sentinelas distribuídas no Brasil, verifica-se que o protocolo proposto pelo Ministério da Saúde, não está sendo cumprido pela maioria dos estados (62,5%), tendo em vista que apenas seis dos dezesseis estados apresentaram dados suficientes para este estudo.

Os principais fatores para não considerarmos o funcionamento adequado das unidades sentinelas são: não realizaram isolamento viral nas amostras negativas no NS1 Elisa ou submeteram as amostras a somente um teste diagnóstico, no caso a sorologia.

Para a avaliação dos indicadores epidemiológicos de incidência utilizou-se os casos notificados de dengue no período de 2009 e 2010 e a população brasileira retirada das bases de dados do IBGE, e considerou-se o número de casos novos de dengue por 100.000 habitantes, esses dados foram calculados por mês e por ano para os estados envolvidos no estudo, conforme apresentado na Tabela 2.

Considerando a incidência dos seis estados no ano de 2009, o mês com maior incidência foi abril, onde houve 36 novos casos por 100.000 habitantes e a menor incidência foi no mês de setembro com a média de 2,76 casos novos por

100.00 habitantes. No ano de 2010, a maior incidência ocorreu no mês de março com 771,49 novos casos e a menor incidência ocorreu no mês de setembro com a média de 4,52 novos casos por 100.000 habitantes. O ano de 2010 foi considerado um ano epidêmico.

Na tabela 2, observa-se a nítida variação sazonal da dengue, principalmente nos meses quentes, onde há um aumento no número de casos da doença.

Tabela 2: Incidência de dengue por mês e estado, no período de 2009 e 2010.

Ano	Estado	População	Incidência											
			Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
2009	Minas Gerais	19.597.330	14,49	33,01	9,58	63,23	43,21	13,06	3,57	1,11	0,92	1,57	5,73	15,37
2009	Paraná	10.444.526	1,21	1,43	4,14	2,99	1,70	0,56	0,33	0,22	0,26	0,24	0,56	0,99
2009	Mato Grosso do Sul	2.449.024	3,59	24,99	123,11	113,60	68,84	16,25	5,76	4,12	8,21	13,27	59,04	131,97
2009	Goiás	6.003.788	36,61	59,86	109,85	85,81	59,00	38,01	19,44	26,10	25,85	33,03	78,75	150,75
2009	Espirito Santo	3.514.952	80,74	163,19	260,09	201,97	218,44	100,43	21,85	12,49	5,55	2,48	6,94	11,10
2009	São Paulo	41.262.199	1,91	2,22	6,34	5,61	4,09	1,48	0,52	0,32	0,35	0,62	1,27	4,36
2009	TOTAL	83.271.819	10,66	20,99	28,44	36,09	27,91	11,34	3,63	2,98	2,76	3,58	9,75	21,12
2010	Minas Gerais	19.597.330	99,31	175,14	2731,66	300,06	196,55	23,40	7,22	3,71	2,56	2,67	4,74	6,29
2010	Paraná	10.444.526	10,44	47,60	108,12	117,67	54,78	6,82	1,86	1,16	1,41	2,18	3,51	9,94
2010	Mato Grosso do Sul	2.449.024	599,71	736,13	638,99	372,19	144,06	24,87	10,29	9,60	9,35	11,72	18,01	18,74
2010	Goiás	6.003.788	531,38	350,88	252,89	189,20	134,91	35,23	18,52	24,13	29,03	40,42	45,49	48,02
2010	Espirito Santo	3.514.952	28,45	44,69	86,49	123,22	165,12	76,50	46,57	43,73	20,37	24,44	39,06	43,36
2010	São Paulo	41.262.199	39,48	110,02	150,10	118,14	66,38	8,46	2,71	1,75	1,03	1,16	1,49	2,26
2010	TOTAL	83.271.819	101,40	150,54	771,49	173,70	106,95	17,05	6,88	5,75	4,52	5,77	7,75	9,69

A incidência dos casos de dengue está associada a sazonalidade da doença comumente associada às mudanças e flutuações climáticas, que incluem: aumento da temperatura, variações na pluviosidade e umidade relativa do ar, condições estas que favorecem maior número de criadouros disponíveis e conseqüentemente o desenvolvimento do vetor.

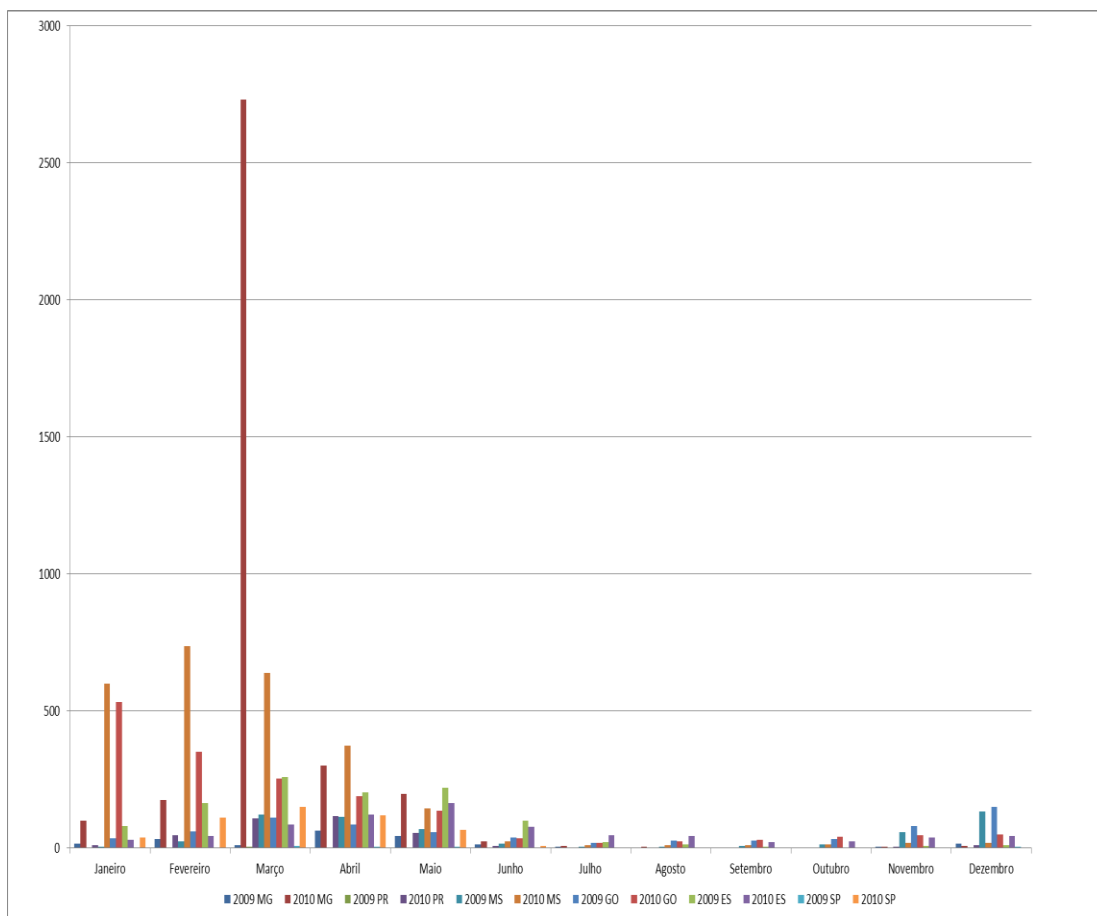


Figura 2: Incidência de dengue nos estados do estudo, no período de 2009 e 2010.

Os valores preditivos de um teste são variáveis, dependem da prevalência da doença na população, porém o valor da sensibilidade e especificidade não são alterados, conforme apresentado na Tabela 3.

No estudo, encontramos o valor preditivo positivo de 81,48% no ano de 2009, já no ano de 2010 o valor caiu para 66,17%, e o valor preditivo negativo no ano de 2009 foi de 89,91% e no ano de 2010 o valor aumentou para 94,43%.

Tabela 3: Valores de VPP e VPN, no período de 2009 e 2010.

ANO	verdadeiros positivos	falsos positivos	falsos negativos	verdadeiros negativos	VPP	VPN
2009	440	100	57	508	81,48	89,91
2010	939	480	24	407	66,17	94,43

Comparando os valores de incidência com os valores de VPP e VPN, nota-se que no ano de 2010 que tivemos epidemias em alguns estados, os casos realmente sadios não eram casos de dengue, pois o valor de VPN apresentado foi alto. Porém considerando o valor de VPP, não podemos afirmar que todos os casos de dengue foram considerados como positivos para a doença, tendo em vista que no ano de epidemia os valores decaíram. Então seriam necessários exames complementares inespecíficos para fecharmos os casos, tais como hemograma, onde o aumento do hematócrito confirma a presença de hemoconcentração, tendo importância prognóstica e terapêutica e o leucograma que pode revelar leucopenia com linfocitose e as plaquetas podem estar normais ou diminuídas (implica maior gravidade).

6.DISCUSSÃO

A acurácia de um teste é a proporção de acertos, isto é, o total de verdadeiros positivos e o total de verdadeiros negativos, em relação ao número de amostras estudadas. Quanto maior for o valor preditivo negativo, mais confiável o teste será, tendo em vista que os indivíduos não doentes realmente serão considerados não doentes para a doença, isso é, um caso verdadeiramente negativo não precisará de tratamento e diminuirá os gastos públicos com internações no Sistema Único de Saúde.

Os cálculos do Valor Preditivo Positivo, isso é a chance do caso ser realmente positivo, foi baseada na fórmula ($VPP=a/a+b$), onde (a) representa o número de verdadeiros positivos e (b) o número de falsos positivos e o cálculo do Valor Preditivo Negativo, isso é a chance de um caso negativo ser sadio, foi baseada na fórmula ($VPN=d/c+d$), onde (d) representa o número de verdadeiros negativos e (c) o número de falsos negativos.

Se avaliarmos uma doença cuja prevalência é baixa, mesmo com um teste muito específico, a chance de obtermos resultados falsos positivos é alta, devido ao elevado número de indivíduos não doentes na população. Se a prevalência da doença for alta, como no caso da dengue, é esperado um número maior de resultados falsos negativos, na aplicação do teste com boa sensibilidade. Portanto, quanto menor a prevalência da doença, menor será o valor preditivo positivo e maior valor preditivo negativo e o inverso, no caso da prevalência seja alta.

Considerando o grupo 1, dos verdadeiros positivos, onde houve 70,4% de concordância entre as técnicas de NS1 Elisa e isolamento viral e ainda o grupo 4 dos verdadeiros negativos, onde o resultado da concordância foi de 91,87% entre as técnicas, podemos considerar que o Elisa PlateliaTM Dengue NS1 Ag. Kit é um bom método para triagem dos casos de dengue no país.

A sensibilidade média encontrada foi de 94,5% e a especificidade média encontrada foi de 61,20%.

Analisando a sensibilidade do kit diagnóstico para os quatro sorotipos existentes, verificamos uma maior sensibilidade para os sorotipos DENV1 e DENV2 e uma queda da sensibilidade para os sorotipos DENV3. A variação da sensibilidade do kit pode ter sido ocasionada por diversas causas, tais como a coleta,

armazenamento e transporte da amostra. O sorotipo com maior sensibilidade no período do estudo, foi o DENV1 (76,30%).

Segundo o Ministério da Saúde, o percentual de identificação dos sorotipos virais no período de 2002 a 2009 foi de 11,5%, havendo a necessidade de se implantar e descentralizar novas técnicas confiáveis que permitissem maior precisão e rapidez na liberação do diagnóstico, possibilitando o desenvolvimento de ações de combate e controle da dengue nos estados e municípios, tendo em vista o isolamento viral ser um exame demorado, onde o resultado sai após 10 dias de realização do teste, em condições ideais, porém na realidade dos laboratórios do Brasil, o resultado chega muitas vezes a sair em 30 dias após a coleta, o que impossibilita ações imediatas por parte da vigilância epidemiológica.

Para se obter o isolamento do vírus é necessário que a amostra em estudo contenha a partícula íntegra. A detecção da proteína NS1 não indica necessariamente que a partícula viral esteja íntegra ou infectante. Esse fato, associado à manipulação e armazenamento das amostras, pode ter contribuído com o menor número de resultados positivos no isolamento viral em relação ao kit avaliado.

A incidência dos seis estados no ano de 2009, esta variou entre 2,76 a 36,09 e no ano de 2010, esta variou entre 4,52 e 771,49. Segundo o Ministério da Saúde, o ano de 2010 foi marcado por grandes epidemias.

A estratégia de implantação das unidades sentinelas de monitoramento viral para dengue, com triagem pelo NS1 ELISA, a princípio era para ocorrer em 16 Unidades Federativas - UF e 25 municípios, com previsão inicial de 68 US, destas apenas 48 (70,6%) foram realmente implantadas.

Neste estudo consideramos os dados 6 estados, 12 municípios e 21 US (30,9%) com o funcionamento correto conforme o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde, percentual bem abaixo do ideal.

7. CONCLUSÃO

Nas amostras analisadas nos seis estados do estudo, verifica-se uma sensibilidade de 94,50% no Elisa Platelia™ Dengue NS1 Ag. Kit (Bio-Rad Laboratories), isto é, trata-se de um teste sensível, onde raramente deixará de encontrar pessoas com a doença. Em relação a especificidade, foi encontrado um valor de 61,20%, um valor abaixo do esperado (acima de 90%), o que poderá ocasionar erros de diagnóstico, considerando que o teste não é tão específico, e poderá considerar que pessoas saudáveis são doentes.

Avaliando essas informações, podemos concluir que as pessoas doentes realmente estão doentes, porém nem todos considerados não doentes são realmente saudáveis.

Neste estudo, um total de 2.955 amostras dos seis estados incluídos no estudo foram analisadas por meio da técnica de NS1 Elisa, destas 1.959 foram positivas e 996 negativas. Esses resultados foram comparados com os obtidos por meio do teste de isolamento viral. Essas amostras foram separadas em dois grupos, os verdadeiros positivos, onde 1.379 amostras foram positivas no isolamento viral, atingindo uma concordância de 70,4% entre as técnicas laboratoriais e o grupo de verdadeiros negativos, onde 996 amostras negativas no NS1 foram submetidas ao isolamento viral e destas 915 foram negativas, gerando uma concordância de 91,87% entre as técnicas.

Analisando a sensibilidade do kit diagnóstico para os quatro sorotipos existentes, verificamos uma maior sensibilidade para os sorotipos DENV1 e DENV2 e uma queda da sensibilidade para o sorotipo DENV3. A sensibilidade para o sorotipo 4 não pode ser avaliada, tendo em vista que este sorotipo não circulou no período e nos estados envolvidos no estudo.

Neste estudo, encontramos o valor preditivo positivo de 81,48% no ano de 2009 e em 2010 o valor caiu para 66,17%, e o valor preditivo negativo no ano de 2009 foi de 89,91% e no ano de 2010 o valor aumentou para 94,43%.

Os valores preditivos de um teste sofrem variações e dependem da prevalência da doença na população, e considerando a dengue como uma doença de alta prevalência no país, espera-se um número elevado de resultados falsos negativos, na aplicação do teste com boa sensibilidade.

A implantação das unidades sentinelas de monitoramento viral para dengue, com triagem pelo NS1 ELISA, não atingiu o objetivo proposto pelo Ministério da Saúde, tendo em vista que no estudo foram considerados os dados de apenas 6 estados, 12 municípios e 21 US (30,9%) que atenderam ao protocolo corretamente. O ideal seria que os 16 estados, 25 municípios e as 48 US estivessem em pleno funcionamento. Para isso, recomenda-se uma supervisão do Ministério da Saúde aos estados, para redefinir as unidades sentinelas que tenham condições de atender ao protocolo proposto.

8.REFERÊNCIAS

1. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich YA, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JS, Russell PK, Trent DW. Flaviviridae. *Intervirology*. 1985. 24:183-192.
2. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2007. 5:518-528.
3. Gubler, DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol*. 1998.
4. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002. 33: 330-42.
5. Rodhain F, Rosen L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. 1997. 45-60. In: Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 1997*. CAB International, New York, New York, USA.
6. Effeler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, Elm J, Tom T, Reiter P, Rigau-Perez JG, Hayes JM, Mills K, Napier M, Clark GG, Gubler DJ. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005. 11:742-749.
7. Tauil PL. Aspectos críticos do controle de dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2002. 18(3): 867-871.
8. Gubler DJ. Dengue/dengue hemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp*. 2006. 277:3 3-16.
9. McSherry JA. Some medical aspects of the Darien scheme: was it dengue? *Scott Med J*. 1982. 27: 183-184.
10. Gubler DJ & Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1995. 1:55-7.
11. Siler J, Hal M, Hitchens A. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine Journal of Science*. 1926. 29:1-302.
12. Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am J Trop Med Hyg*. 1954. 3:878-882.
13. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International, New York, New York, USA. 1997.

14. Holmes EC, LM Bartley & GP Garnett. The emergence of dengue: past, presente, and future. In: Krause, RM. Emerging infections, London: Academia Press. 1998. p 301-25.
15. Kimura, R.; Hotta, S. Studies on dengue vírus (VI). On the inoculation of dengue with vírus into mice. **Nippon Igaku**, 1944 v. 3379, p. 629-633.
16. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952. 1:30-50.
17. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science.* 1960. 131:1102-1103.
18. Rigau-Perez, JG, GG Clark, DJ Gubler, P Reiter, EJ Sanders & Vorndam. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Lancet .* 1988 . 352: 971-977.
19. Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. 91:2395-2400.
20. Gómez-Dantés H & Willoquet JR. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad Saúde Pública.* 2009. 25 Suppl 1:S19-31.
21. http://sites.uai.com.br/app/noticia/saudeplena/noticias/2013/10/28/noticia_saudeplena,146162/identificado-novo-virus-da-dengue.shtml
22. Kouri G, Guzman MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bull Pan Am Health Organ.* 1986. 20:24-30.
23. PAHO (Organização Panamericana de Saúde). Resurgimiento del dengue en las Américas. *Boletín Epidemiológico.* 1997. 18: 1-6.
24. Guzman MG, Rosario D, Mune M, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G. Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994. *Revista Cubana Medicina Tropical.* 1996. 48:114-117
25. Rigau-Perez JG, Ayala-Lopez A, Garcia-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, Cano MP, Clark GG. The reappearance of dengue-3 and a subsequepte dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg.* 2002. 67:355-362.
26. Guzman MG & Kouri G. Dengue: na update. *Lancet Infect Dis.* 2002. 2:33-42.
27. Figueroa R & Ramos C. Dengue vírus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Arch Med Res.* 2000. 31:429-30.
28. Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2000. 2:1643-9.

29. Löwy I. Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil. *História, Ciências, Saúde Manguinhos* 1999; 5 (3): 647-677.
30. Donalísio MR. O dengue no espaço habitado. São Paulo: Hucitec. 1999.
31. Soper FL. The 1964 status of *Ae. aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 1965;14 (6): 887-891.
32. Franco O. Reinfestação do Pará por *Ae. aegypti*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. 1969. 21 (4): 729-731.
33. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Diretrizes do Programa de Controle da Febre Amarela e Dengue no Brasil. Brasília: Sucam; 1980.
34. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília: Funasa; 2002.
35. Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000. 95 Suppl 1:179-181.
36. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2000. 16:205-1.
37. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: cocirculation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect*. 1993. 111:163-170.
38. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.160 p. – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos).
39. <http://prophylaxis.com.br/vacina-contra-dengue-%E2%80%93-atualidades/>
40. Guia de Vigilância Epidemiológica, 7ª edição - Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde – Brasília-DF, 2009.
41. Bosio CF, Thomas RE, Grimstad PR, Rai KS. Variation in the efficiency of vertical transmission of dengue-1 virus by strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1992. 29(6): 985-9.
42. Rosen L. Sexual transmission of dengue viruses by *Ae. albopictus*. *Am Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 1987; 37(2): 398-402.

43. Rosen L, Gubler D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1974. 23(6): 1153-60.
44. Gubler DJ, Rosen L. Quantitative aspects of replication of dengue viruses in *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) after oral and parenteral infection. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 13(4-5): 469-72.
45. Rosen L, Roseboom LE, Gubler DJ, Lien JC, Chaniotis BN. Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34(3): 603- 15.
46. Pires Neto RJ, Lima DM, Paula SO, Lima CM, Rocco IM, Fonseca BAL. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005.
47. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004. 10:S98-109.
48. Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Found Symp.* 2006. 277:177-87; discussion 187-92, 251-253.
49. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.
50. Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol.* 1996. 70:8765-72.
51. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO Journal.* 2003. 22 (11): 2604-2613.
52. Deubel V, Laille M, Hugnot J-P, Chungue E, Guedson J-L, Drouet MT, Bassot S, Chevrier D 1990. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J Virol Meth* 30: 41-54.
53. Brandt WE, Chiewslip D, Harris DL, Russel PK. Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. *J Immunol.* 1970. 105:1565-8.
54. Zainah S, Wahab AH, Mariam M, Fauziah MK, Khairul AH, Roslina I, Sairulakhma A, Kadimon SS, Jais MS, CHUA KB. Performance of a commercial rapid dengue

- NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. *J Virol Methods*. 2009. 155:157-160.
55. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:1053-7.
56. Libraty DH, Endy TP, Hough HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. Differing influences of virus burden and immune activation of disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis*. 2002. 185:1213-1221.
57. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul SN, Yenchitsomanus PT, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanaawathana S, Bhakdi S, Malasit P. Vascular leakage in severe Dengue virus infections: a potential role for the non-structural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis*. 2006. 193:1078-1088.
58. Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells : potencial implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol*. 1997. 142 (5): 897-916.
59. Guimarães R. Princípios de imunopatogenia da dengue hemorrágica. *J Bras de Medicina*. 1999. 77(1).
60. www.saude.gov.br/svs
61. Souza JS, Zagne SMO, Siqueira EWS, Bastos DA, Gonçalves PA, Zagne LO. Aspectos Clínicos, Manifestações Típicas e Atípicas e Dengue na Gravidez. In: Souza LJ. *Dengue-Diagnóstico, Tratamento e Prevenção*. 2008. 2ªed. Rio de Janeiro: Rubio. 44-65.
62. Wu SJ, Hanson B, Paxton H, Nisalak A, Vaughn DW, Rossi C, Henchal EA, Porter KR, Watts DM, Hayes CG. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997. 4 (4):452-7.
63. Kuno G, Cropp CB, Wong-Lee J, Gubler DJ. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998. 59(5):757-62.

64. Lam SK, Ew CL, Mitchell JL, Cuzzubbo AJ, Devine PL. Clin Diagn Lab Immunol. 2000. 7(5):850-852.
65. Cuzzubbo AJ, Endy TP, Nisalak A, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Ogata SA, Clements DE, Devine PL. Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay. Clin Diagn Lab Immunol. 2001. 8(6):1150-5.
66. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell culture and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg. 1984.33:158-65.
67. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. J Gen Virol. 1978. 40:531-544.
68. Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MFDB, Farias Filho JC. Virological Study of a Dengue Type 1 Epidemic at Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988. 83 (2):219-25.
69. Miagostovich MP, Nogueira RMR, Cavalcante SMB, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the State of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1993.35:149-54.
70. Alcon S, Talarmin A, Dedruyne M, Falconar A, Deubel V, Falmand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. J Clin Microbiol. 2002;40:376-81.
71. Shu PY, Yang CF, Kao JF, Su CL, Chang SF, Lin CC, et al. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at Airports. Clin Vaccine Immunol. 2009.16:589-91.
72. Castro, L.A. Avaliação da detecção da proteína NS1 no diagnóstico da infecção pelo vírus dengue-3 em comparação a outros métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico da dengue. 2008 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
73. Bisordi I, Rocco IM, Suzuki A, Katz G, Silveira VR, Maeda AY, SOUZA RP, Bassi MG, Del Tedesco EF, Freitas E, Bessa TAF. Evaluation of dengue NS1 antigen detection for diagnosis in public health laboratories, São Paulo State, 2009. Revista Inst. Med Tropical, 2011. 53(6):315-320

74. Portaria GM/MS nº1271 de 06 de junho de 2014.
75. Dengue: diagnóstico e manejo clínico. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.
76. Mosenthal H O, and Barry E. Criteria for and interpretation of normal glucose tolerance tests. *Ann. Int. Med* 1950. 33: 1175-1194.
77. Unger, R.H., and Madison, L.L. New diagnostic procedure for mild diabetes mellitus: evaluation of intravenous tolbutamide response test. *Diabetes*, 1958 7:455-461.
78. Thorner, R. M, and Remein, Q.R. Principles and Procedures in the Evaluation of Screening for Disease. 24 pp. Washington, D.C.: Government Printing Office, 1961.
79. Chiang, C.L., Hodges, J.L., Jr., and Yerushalmy, J. Statistical problems in medical diagnosis. In *Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Contributions to Biology and Problems of Health: Proceedings of Third Berkeley Symposium of Mathematical Statistics and Probability*, v. 4: Held at Statistical Laboratory, University of California, December, 1954, July and August 1955. 187 pp. Berkeley: Univ. of California Press, 1956.

ARTIGO

1. Tauil, PL. 2002. Aspectos críticos do controle de dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública* 18(3): 867-871.
2. Burke DS, Monath TP. 2001. Flaviviruses, p.1043-1126. In a. PMHDM knipe (ed.), *Fields Virology*, 4th ed, vol.1, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
3. www.saude.gov.br/svs
4. Poersch CO. Desenvolvimento e avaliação de métodos moleculares para o diagnóstico da dengue. [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2007.
5. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1053-7.