

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**OCORRÊNCIA DO VÍRUS DENGUE EM CRIANÇAS DE 0 A
10 ANOS NO MUNICÍPIO DE MANAUS, AMAZONAS, 2008**

GRECILANE PALHETA FAÇANHA

**MANAUS
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GRECILANE PALHETA FAÇANHA

**OCORRÊNCIA DO VÍRUS DENGUE EM CRIANÇAS DE 0 A
10 ANOS NO MUNICÍPIO DE MANAUS, AMAZONAS, 2008.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração “Diagnóstico e Controle”.

Orientador: Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa

**MANAUS
2010**

Façanha, Grecilane Palheta

F137o Ocorrência do vírus dengue em crianças de 0 a 10 anos no município de Manaus, Amazonas, 2008. / Grecilane Palheta Façanha. 2010
82f.: 31cm.

Orientador: Cristóvão Alves da Costa
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Dengue. 2. Epidemiologia. 3. Crianças. 4. Rt-pcr I. Costa, Cristóvão Alves da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título.

GRECILANE PALHETA FAÇANHA

**OCORRÊNCIA DO VÍRUS DENGUE EM CRIANÇAS DE 0 A
10 ANOS NO MUNICÍPIO DE MANAUS, AMAZONAS, 2008.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração Promoção da Saúde na Amazônia.

Aprovada em 03 de maio de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristovão Alves da Costa, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof^ª Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Dra. Regina Maria Pinto de Figueiredo, Membro Externo
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas



Dedicatória

- ◆ *A Deus pela inspiração e força nos momentos difíceis.*
- ◆ *Ao meu esposo Cléber Façanha pelo estímulo e encorajamento.*
- ◆ *Aos meus filhos Bruno e Felipe, a quem dedico especialmente esta conquista. Certamente vocês tiveram muita responsabilidade nesta jornada, pois é por vocês que luto por dias melhores, tento ser um bom exemplo e ser motivo de orgulho em suas vidas.*
- ◆ *À minha mãe Leonor Palheta pelo apoio, amor e dedicação em cuidar dos meus filhos nos momentos de minha ausência.*
- ◆ *Aos meus avós Manoel Palheta Filho e Geny Lobo Palheta (in memoriam).*

Agradecimentos

- ◆ **Primeiramente a minha família, pelo apoio necessário, sem o qual não seria possível a conclusão dessa pesquisa.**
- ◆ **Ao meu orientador, Dr. Cristóvão Alves da Costa.**
- ◆ **Às minhas colegas do Laboratório de Pesquisa do INPA: Érica, Gláucia, Regina e Kimura**
- ◆ **Ao Diretor Presidente da Fundação de Vigilância em Saúde (FVS) Dr. Bernardino Albuquerque.**
- ◆ **À Diretora do LACEN-AM, Dra. Tirza Mattos.**
- ◆ **Aos colegas do laboratório de Virologia/LACEN-AM, principalmente Mirianice Barbosa, pelo apoio logístico na obtenção das amostras do estudo.**

RESUMO

Durante a segunda metade do século XX a dengue se propagou através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, ameaçando a saúde de 1/3 da população mundial. Atualmente a doença causa cerca de 50 a 100 milhões de casos por ano, incluindo-se mais de 500 mil casos notificados de dengue hemorrágico (FHD) e síndrome do choque do dengue (SCD), formas graves da doença. Na América Latina, ao contrário da Àsia, a forma grave é mais prevalente em adultos, apesar de estudos recentes mostrarem que está ocorrendo um deslocamento da gravidade para faixas etárias mais jovens, principalmente em menores de 15 anos. Nesse estudo foram investigadas amostras de sangue de crianças na faixa etária de 0 a 10 anos, nas quais se estabeleceu através da técnica de RT-PCR os sorotipos virais infectantes circulantes no espaço urbano de Manaus/AM durante o ano de 2008 com o intuito de apresentar aspectos epidemiológicos da ocorrência do vírus na infância. Das 94 crianças da casuística, dezesseis (17,0%) foram positivas para dengue e o DENV-3 foi o único sorotipo viral identificado. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa do resultado da RT-PCR em relação ao sexo ($p=0,315$). O tempo médio de diagnóstico foi de 2,8 dias ($Dp \pm 0,98$). Todas as amostras positivas grassaram no primeiro trimestre de 2008. Todas as zonas e onze bairros foram positivos para o DENV-3. Em ordem decrescente, os bairros que se destacaram foram: Alvorada (18,75%), Compensa e São José Operário (12,50% cada). No presente estudo 83,0% das crianças analisadas apresentaram resultado negativo para dengue através do RT-PCR sugerindo a ocorrência de outras doenças febris que necessitam ser esclarecidas.

Palavras chave: vírus dengue, RT-PCR, crianças, Manaus, Amazonas.

ABSTRACT

During the second half of the twentieth century dengue spread through the tropical and subtropical regions of the planet, threatening the health of 1/3 of world population. Currently, the disease causes about 50 to 100 million cases per year, including more than 500 thousand reported cases of dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS), severe disease. In Latin America, unlike Asia, the severe form is most prevalent in adults, although recent studies show that it is occurring a shift of gravity to younger age groups, especially in children under 15 years. In this paper we investigate blood samples from children aged 0 to 10 years, in which was established by RT-PCR infectious virus serotypes circulating within the city of Manaus / AM during 2008 in order to Epidemiological aspects of the occurrence of the virus in childhood. Of the 94 children in the study, sixteen (17.0%) were positive for dengue and DENV-3 was the only viral serotype identified. There was no statistically significant association of the result of RT-PCR in relation to sex ($p = 0.315$). The average time to diagnosis was 2.8 days ($SD \pm 0.98$). All positive samples wreaked havoc in the first quarter of 2008. All areas and eleven districts were positive for DENV-3. In descending order, the neighborhoods that stood out were: Alvorada (18.75%), Compensa and São José Operário (12.50% each). In this study 83.0% of children examined showed negative for dengue by RT-PCR suggesting the occurrence of other febrile illnesses that need to be clarified.

Keywords: dengue virus, RT-PCR, children, Manaus, Amazonas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do vírus dengue	18
Figura 2 - Organização do genoma viral do DENV.....	19
Figura 3 - Cinética da resposta imune durante a infecção pelo vírus dengue	24
Figura 4 - Área em risco dengue em nível global	32
Figura 5 - Incidência da dengue na América e Brasil, 1999-2008	35
Figura 6 - Distribuição espacial por sorotipo circulante isolado, de acordo com a unidade federada, Brasil, 2009	35
Figura 7 - Resumo dos procedimentos realizados no estudo	49
Figura 8 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% de Nested-PCR para dengue	54
Figura 9 - Distribuição segundo a média de idade e o intervalo de confiança das amostras positivas na RT-PCR para dengue, segundo o RT - PCR, Manaus-AM, 2008	56
Figura 10 - Distribuição segundo a média de idade e o intervalo de confiança das amostras positivas na RT-PCR para dengue, segundo o sexo, Manaus-AM, 2008.....	56
Figura 11 - Distribuição da frequência de amostras positivas para dengue em crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS por unidade de procedência, Manaus-Am, 2008	58
Figura 12 - Distribuição dos casos positivos de dengue entre as crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS, segundo dias de doença. Manaus-AM, 2008	59
Figura 13 - Distribuição espacial do DENV-3 no município de Manaus/AM, em crianças de 0 a 10 anos, segundo bairro de residência	60
Figura 14 - Distribuição espacial do DENV-3 no município de Manaus/AM, em crianças de 0 a 10 anos, segundo zona de residência	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados para identificação do vírus dengue e seus sorotipos	51
Tabela 2 - Distribuição segundo a frequência do sexo e idade das crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS durante o ano de 2008, Manaus-AM	55
Tabela 3 - Distribuição segundo o resultado da RT-PCR para dengue em crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS durante o ano de 2008, segundo o sexo, Manaus-AM	55
Tabela 4 - Distribuição mensal da casuística e resultados positivos em crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS, Manaus-AM, 2008	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Adenina
ADE	Imunoamplificação dependente de anticorpo
AM	Amazonas
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEP-INPA	Conselho de Ética em Pesquisa do INPA
dATP	Desoxi adenilato trifosfatado
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
dCTP	Desoxi citidilato trifosfatado
DENV	Vírus dengue
dGTP	Desoxi guanilato trifosfatado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxi-nucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxi timidilato trifosfatado
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tatra-acético
Fc	<i>Cristal fraction</i>
FD	Febre do dengue clássica
FHD	Febre hemorrágica do dengue
FVS	Fundação de Vigilância em Saúde
g	Gravidade
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Kb	Quilo base
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Quilo Dalton

LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LIRAA	Levantamento Rápido de <i>Aedes aegypti</i>
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mNS1	Proteína não-estrutural associada à membrana
NS	Proteína não-estrutural
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pam-Americana de Saúde
PA	Pará
pb	Pares de bases
PCR	Do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pM	Picomol
PrM	Pré-proteína M (de membrana)
RN	Recém-nascido
PSC	Pronto Socorro Infantil
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	PCR conjugado à transcrição reversa
S	Svedberg (unidade de coeficiente de sedimentação)
SCD	Síndrome do choque do dengue
sNS1	Proteína não-estrutural secretada
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em saúde
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TBE	Tris-Borato-EDTA
U	Unidade
V	Volts
ng	Nanograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Aspectos históricos	16
2.2 O vírus dengue (DENV)	17
2.3 Vetores e modo de transmissão	20
2.4 Imunopatogenia	22
2.4.1 Febre Clássica do Dengue	24
2.4.2 Febre Hemorrágica do Dengue	25
2.5 A dengue em crianças	26
2.6 Aspectos epidemiológicos	28
2.6.1 A dengue no mundo	31
2.6.2 A dengue no Brasil	32
2.6.3 A dengue no Amazonas	36
2.7 Diagnóstico laboratorial	38
2.8 Prevenção e controle	40
3. OBJETIVOS	43
3.1 Geral	43
3.2 Específicos	43
4. METODOLOGIA	44
4.1 Modelo de Estudo	44
4.2 Universo de estudo	44
4.2.1 Local de Realização do estudo	44
4.2.2 População de referência	43
4.2.3 População de estudo	45
4.2.4 Critérios de inclusão e exclusão	45
4.2.5 Casuística	46
4.2.6 Variáveis analisadas	47
4.3 Amostras	48
4.3.1 Rotulagem das amostras	48
4.4 Método de identificação viral	48
4.5 Fluxo de procedimentos	49
4.6 Procedimentos laboratoriais	50
4.6.1 Extração do RNA	50
4.6.2 Procedimento molecular	51
4.6.2.1 Primeira etapa: RT-PCR	51
4.6.2.2 Segunda etapa: Nested-PCR	52
4.7 Detecção do produto amplificado	53
4.8 Análise dos resultados	53
5. RESULTADOS	54

6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO A	82

1. INTRODUÇÃO

A dengue é causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, cujas características genômicas o diferem em quatro sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUBLER, 1998; SINGHI et al., 2007; YONG et al., 2007). Geralmente, comporta-se como uma enfermidade febril de início agudo com duração de 2 a 7 dias com dois ou mais dos seguintes sintomas: cefaléia, dor retro-orbital, mialgia/artralgia, exantema (maculopapular) e petéquias, podendo ou não acontecer manifestações hemorrágicas (WHO, 2009).

Globalmente, cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas onde o vírus pode ser transmitido. A disseminação geográfica tanto dos vírus quanto do mosquito vetor, *Aedes aegypti*, tem favorecido a ressurgência de epidemias da febre do dengue (FD) e a emergência da febre hemorrágica do dengue (FHD), principalmente nos últimos 25 anos com o desenvolvimento de hiperendemicidade em muitos centros urbanos de áreas tropicais do planeta (WHO, 2007; YONG et al., 2007), onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do vetor.

A dengue acarreta uma sobrecarga social que é difícil de mensurar por causa dos sintomas inespecíficos e da falta de definições facilmente aplicáveis para suas mais severas manifestações (RIGAU-PÉREZ, 2006).

Apesar de na América Latina a forma grave ser prevalente em adultos (HALSTEAD, 2006), nos últimos dois anos tem sido observada uma mudança nos padrões etários para a ocorrência de FHD no Brasil (TEIXEIRA et al., 2008). Em Manaus, capital do Amazonas, o mesmo comportamento foi observado por Rocha; Tauil (2009) em 2006 e 2007. O deslocamento para faixas etárias mais jovens também assinala a gravidade da situação,

considerando que as crianças são mais susceptíveis ao extravasamento plasmático, por apresentarem permeabilidade vascular aumentada (HALSTEAD, 2006). Esse agravante, associado à alta endemicidade e a co-circulação dos três sorotipos no país (SIMONE et al., 2004) mostra um importante fator de risco para o desenvolvimento de FHD e síndrome do choque do dengue (SCD), principalmente por causa da introdução de novos genótipos virulentos.

O diagnóstico laboratorial é feito através da pesquisa do vírus ou dos anticorpos desenvolvidos contra ele. A pesquisa de anticorpos IgM pode ser realizada a partir do 5º dia de doença e a pesquisa do antígeno viral NS1, pode ser realizado do 1º ao 5º dia de doença, sendo ambas as provas de caráter qualitativo, visto que não fornecem dados sobre o sorotipo viral. A sensibilidade, a especificidade e a rápida detecção de quantidades mínimas de material genético em amostras humanas fazem da reação em cadeia da polimerase (em inglês *Polymerase Chain Reaction - PCR*), uma ferramenta laboratorial muito útil para o diagnóstico da dengue, pois pode ser realizado a partir do 1º dia de doença e o vírus pode ser detectado enquanto durar a viremia (GUZMÁN; KOURÍ, 1996), além de fornecer o diagnóstico de múltiplas infecções.

Por tais motivos, a identificação dos sorotipos circulantes na população infantil da cidade de Manaus, torna-se importante, principalmente se considerarmos a relevância de se caracterizar, através da técnica de RT-PCR os subtipos de vírus do dengue a que esta população está exposta. Além disto, a introdução de um novo sorotipo pode ser um importante indicador de futuras epidemias de FHD.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos históricos

Embora a dengue tenha alcançado níveis dramáticos de incidência que levaram ao conhecimento da doença em muitas regiões tropicais e subtropicais, principalmente após o fim da Segunda Guerra Mundial, a doença possui uma longa história de interação humana.

Os relatos mais antigos de doença vêm do século III, na China, onde há descrições de uma doença chamada pelas pessoas da época de *water poison* (veneno aquático), cujas descrições clínicas são semelhantes à dengue, tais como: febre, *rash*, artralgia, mialgia e manifestações hemorrágicas. Outros descritos semelhantes ocorreram após um intervalo de mais de sete séculos, em duas localizações distintas: entre índios do Oeste da França e no Panamá, respectivamente em 1635 e 1699 (WEAVER; VASILAKS, 2009).

Segundo Pontes; Ruffino-Netto (1994), as primeiras epidemias compatíveis com o dengue datam de 1779 em Jacarta e Cairo, no Egito. No século XIX e primeiras décadas do século XX, foram registradas em Zanzibar (1823, 1870), Calcutá (1824, 1853, 1871, 1905); Antilhas (1827); Hong Kong (1901); Estados Unidos (1922); Austrália (1925-26, 1942), Grécia (1927-28) e Japão (1942-45).

A etiologia viral da dengue foi determinada em 1906, quando Ashburn e Craig encontraram um agente infeccioso filtrável em sangue humano. Bancroft descreveu a transmissão do dengue pelo *A. aegypti* em 1906. Posteriormente Silers e col. (1926) e Simmons e col. (1931) conseguiram transmitir a doença em voluntários (*in* PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994).

Importantes investigações realizadas por Sabin e Schlesinger, durante a Segunda Guerra Mundial, resultaram no isolamento dos dois primeiros sorotipos do vírus dengue, em

1944 – os sorotipos 1 e 2. Na década de 50, Hammon e col. Isolaram mais dois sorotipos – os sorotipos 3 e 4, quando estudavam a epidemia de dengue hemorrágica (FHD) ocorrida em Manilla (Filipinas), em 1956 (*in* PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994).

O fato de esta síndrome ocorrer na década de 50 pode estar associada a intensa urbanização e intercâmbio entre os países que contribuíram para gerar as condições ecológicas apropriadas para o aumento da circulação do vírus e para a circulação simultânea e sequencial de diferentes sorotipos virais em uma mesma área geográfica e ou ao aparecimento de cepas mais virulentas (HALSTEAD, 1992).

2.2 O vírus dengue (DENV)

A dengue é causada por um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, espécie Dengue. Seu genoma está constituído de RNA, que por ser de polaridade positiva, funciona como RNA mensageiro ao traduzir-se diretamente nos ribossomos durante o processo de replicação (ACOSTA-BAS; GÓMEZ-CORDERO, 2005).

São esféricos e têm envelope lipídico derivado das membranas das células hospedeiras (Figura 1). Seu tamanho é de cerca de 40-50nm e possuem aproximadamente 11Kb de extensão (GUZMÁN; KOURÍ, 1996), coeficiente de sedimentação de 42S e um peso molecular de 4,2 KDa (ACOSTA-BAS; GÓMEZ-CORDERO, 2005). Até o momento foram descritas quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUBLER, 1998; SINGHI et al., 2007; YONG et al., 2007).

O genoma do vírus contém o código de três proteínas estruturais (capsídeo [C], proteína da membrana [M] e glicoproteína do envelope viral [E]) e sete outras proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (GUBLER, 1998; SINGHI et al.,

2007; YONG et al., 2007). Quando dentro da célula hospedeira, o vírus apresenta uma proteína conhecida como pré-proteína M ou prM, um precursor da proteína M (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

As proteínas são sintetizadas como poliproteínas de cerca de 3 mil aminoácidos que são processadas por proteases tanto do vírus quanto do hospedeiro (SHU; HUANG, 2004). Os ácidos nucleicos do genoma viral, por si mesmos, são infecciosos, pelo que as autoridades de saúde recomendam manipular este vírus em nível de biossegurança 2 (NB-2) (ACOSTA-BAS; GÓMEZ-CORDERO, 2005).

As principais propriedades biológicas dos vírus estão na proteína E, cujos domínios são responsáveis pela neutralização, fusão e interações com receptores virais. Algumas das proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação dos vírus (GUBLER, 1998; SINGHI et al., 2007; YONG et al., 2007).

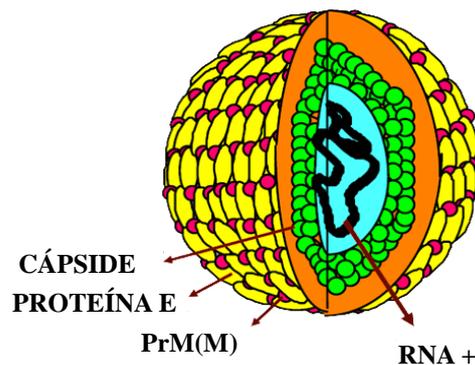


Figura 1- Estrutura do vírus dengue.

Fonte:GUZMÁN, M.G. Diagnosing dengue. International Dengue Course. Havana, 2005.

A ordem da codificação das proteínas é 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a,NS4b-NS5-3'(WHO, 1997). Os genes que codificam as três proteínas estruturais estão localizados no extremo amino terminal da cadeia (5'), ocupando a quarta parte da capacidade codificadora do RNA viral. No extremo carboxila terminal (3') se encontram os genes que codificam as sete proteínas não estruturais, como pode ser visualizado na Figura 2 (ACOSTA-

BAS; GÓMEZ-CORDERO, 2005).

O DENV compartilha epítomos antigênicos com outros *Flavivirus*, principalmente os presentes na proteína do envelope que resultam em amplas reações cruzadas nos testes sorológicos (GUBLER, 1998). Isso torna o diagnóstico sorológico muito dificultoso, especialmente entre os quatro sorotipos do vírus dengue. Entretanto, anticorpos direcionados à proteína M do DENV são espécie-específicos e podem ser úteis para estudos soroepidemiológicos, especialmente em países onde outros *Flavivirus* são endêmicos (MALAVIGE et al., 2004).

A infecção por um dos sorotipos proporciona imunidade longa para aquele vírus, mas não existe imunidade cruzada duradoura para os outros sorotipos. Assim, indivíduos vivendo em área endêmica podem ser infectados pelos quatro sorotipos do DENV durante a sua vida (GUBLER, 1998).

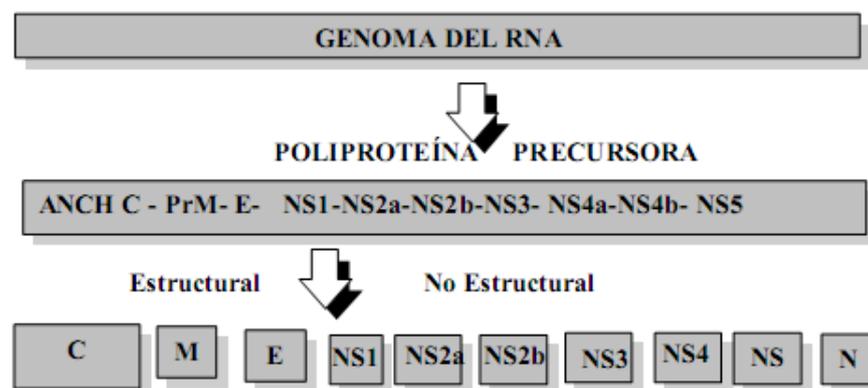


Figura 2 - Organização do genoma viral do DENV.
Fonte: Acosta-Bas; Gómez-Cordero, 2005.

A proteína não-estrutural NS1 é uma glicoproteína de 46-50KDa expressada em células infectadas e ambas as formas, membrana-associada (mNS1) e secretada (sNS1), não fazem parte da composição do virion. Níveis circulantes desta proteína têm sido detectados em amostras de soro coletadas na fase aguda de pacientes com infecção pelo DENV (ALCON

et al., 2002; YOUNG et al., 2000). Em cultura de células infectadas, níveis sobrenadantes de sNS1 correlacionaram-se com o título viral infectante (YOUNG et al., 2000). Em crianças, os níveis de sNS1 livres no plasma foram compatíveis com os níveis da viremia, nas quais os níveis de sNS1 foram maiores em pacientes com FHD que naqueles com FD. Um elevado nível de NS1 (≥ 600 ng/mL) com 72 horas de estabelecimento da dengue identificou pacientes com risco de desenvolver FHD (LIBRATY et al., 2002).

2.3 Vetores e modo de transmissão

A dinâmica da transmissão do vírus está determinada pela interação entre o ambiente e que estejam presentes de forma simultânea: o vírus, o vetor e o hospedeiro susceptível (ACOSTA-BAS; GÓMEZ-CORDERO, 2005).

Humanos, primatas e mosquitos podem ser hospedeiros naturais do vírus dengue (HENCHAL; PUTNAK, 1990), mas a principal fonte de infecção e reservatório vertebrado é o ser humano (GUBLER, 1998).

A transmissão ocorre principalmente pela picada da fêmea hematófaga do mosquito *Aedes aegypti* infectado, o qual possui hábito domiciliar (RIBEIRO et al., 2006). No entanto, outras variedades de *Aedes* podem transmitir o vírus: *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e outras espécies do complexo *A. scutellaris*, que também têm sido relacionadas à epidemias, porém menos eficientemente que o *A. aegypti* (MALAVIGE, et al., 2004; ACOSTA-BAS; GÓMEZ-CORDERO, 2005). Essa variação na espécie de vetor que é utilizada pelo DENV depende da localização geográfica.

O *A. albopictus*, já presente nas Américas, com ampla dispersão nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (BRASIL, 2007), é o vetor de manutenção da dengue na Ásia e foi descrito no México, como vetor potencial da dengue (MALAVIGE et al., 2004).

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 de suas secreções com uma pessoa sadia, nem por intermédio de fontes de água ou alimento (BRASIL, 2007). Há relatos de casos de transmissão vertical (gestante - bebê) do vírus (MAROUN et al., 2008).

Um ciclo silvestre tem sido proposto existir no Sudeste da Ásia, já que ocorre uma alta taxa de transmissão do DENV entre diferentes espécies de macacos (GUZMÁN; KOURÍ, 1996). Presume-se que este ciclo é ancestral ao ciclo humano, visto que a transmissão inter-humana eficiente exige um mínimo de tamanho populacional (10 mil a 1 milhão de pessoas), o que não existia até cerca de 4 mil anos atrás, quando surgiram as civilizações urbanas (WEAVER; VASILAKS, 2009).

Após uma pessoa ser picada pelo mosquito infectado, o vírus passa por um período de incubação que varia de 3 a 14 dias (normalmente, 4 a 7 dias), após o qual pode haver a instalação dos sintomas da fase aguda, coincidente com a viremia (GUBLER, 1998).

O período febril agudo pode durar de 2 a 10 dias e o vírus pode permanecer circulante no sangue periférico. Se outro *A. aegypti* picar um indivíduo doente durante essa fase febril virêmica, o mosquito torna-se infectado e subseqüentemente, poderá transmitir o vírus para outro indivíduo, após um período de incubação extrínseco que pode variar de 8 a 12 dias (GUBLER, 1998). Como o repasto sanguíneo estimula, na fêmea do mosquito, a ovoposição, o ciclo reprodutivo durante o período de incubação extrínseco é uma oportunidade para o vírus infectar os ovos e assim, contaminar a geração seguinte (MONATH, 1994).

Os ovos constituem-se a principal forma de resistência, podendo permanecer viáveis por cerca de 1 ano. O tempo transcorrido entre a eclosão do ovo e a forma adulta, em condições favoráveis, é em torno de 10 dias. O período de vida do mosquito adulto é de cerca de poucas semanas até 45 dias (FERREIRA et al., 2009).

Sua convivência com o homem é favorecida pela utilização de recipientes artificiais no desenvolvimento das formas imaturas, o que faz com que esta espécie seja predominantemente urbana (RIBEIRO et al., 2006), com frequência são notificados surtos em regiões rurais, com menor concentração populacional (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

O *A. aegypti* encontra-se atualmente numa extensão que vai desde o Uruguai até o sul dos Estados Unidos, tendo sido registrado surtos de grande importância em vários países, como Venezuela, Brasil, Cuba e Paraguai, o que corresponde a 3,5 bilhões de pessoas contaminadas no mundo, exceto a Europa, o Canadá e o Chile. As condições climáticas e de altitude desses países impossibilitam a existência do mosquito transmissor (FERREIRA et al., 2009).

2.4 Imunopatogenia

Apesar de ainda não serem conhecidas todas as células-alvo envolvidas na infecção do DENV, dados atuais apontam para as células dendríticas, os macrófagos teciduais, os monócitos do sangue periférico e hepatócitos, mas não as células endoteliais, como células do hospedeiro para replicação do vírus. O receptor celular dominante responsável pela entrada do vírus não foi identificado, embora os co-receptores tais como DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) em células dendríticas tenham sido relatados (VAUGHN et al., 2000; LIBRATY et al., 2002).

O DENV ao ser inoculado na pele, rapidamente migra para os macrófagos localizados nos linfonodos regionais e outros órgãos linfáticos, baço e fígado. A magnitude da viremia e antigenemia, como altos níveis de NS1, tem sido associada com a severidade da doença, incluindo a ativação do complemento, embora esses fatores não possam explicar sozinhos, todos os aspectos da patogênese da doença e seus desfechos clínicos (VAUGHN et al., 2000).

O extravasamento plasmático, também chamado de síndrome hemorrágica, ocorre quando o endotélio é danificado e a sua função de barreira torna-se comprometida, ocorrendo perda plasmática para o terceiro espaço. O próprio DENV parece estar envolvido na indução direta desses danos celulares (LIN et al., 2005).

Anticorpos produzidos contra a proteína NS1 do vírus podem reagir cruzadamente com células endoteliais e provocar apoptose dessas células, levando aos fenômenos de vasculopatia característicos da dengue grave (LIBRATY et al., 2009). No entanto, os papéis de várias citocinas e quimiocinas na patogênese da FHD/SCD ainda precisam ser melhor esclarecidos, especialmente os envolvidos na ativação de células endoteliais, relacionados aos processos vasculopáticos.

Figueiredo (1999), descreve que:

Os sintomas característicos da dengue relacionam-se a níveis séricos elevados de citocinas liberadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T (LT) *helper* ativados. A leucopenia e a discreta e transitória depressão medular que se apresentam nesses casos, também, relacionam-se aos altos teores de citocinas macrofágicas. As mialgias são conseqüentes, em parte, à multiplicação viral no próprio tecido muscular e são acometidos, inclusive músculos oculomotores, sendo responsáveis pela cefaléia retroorbitária que muitos pacientes apresentam.

As drogas antivirais para inibir a replicação ou a adesão celular ao DENV estão sendo desenvolvidas por vários grupos, e se administradas cedo o suficiente, podem modular o curso da infecção e, eventualmente, melhorar ou diminuir a doença clínica.

Cheng et al., (2009) demonstrou a ocorrência de reações auto-imunes do vírus que apresentaram implicações potenciais para a patogênese da síndrome hemorrágica da dengue. Conseguiram observar uma reação cruzada de anticorpos anti-NS1 e receptores de células endoteliais *in vitro*, cuja reatividade foi bloqueada pela pré-absorção de peptídeo sintético. Porém em modelo animal, não foi possível verificar este processo, visto que houve precipitação no trato gástrico do peptídeo sintético neutralizante.

Na Figura 3 pode-se observar a duração do período virêmico durante a infecção, bem como a dinâmica da formação dos anticorpos resultantes do processo infeccioso que são encontrados nas respostas primária e secundária, caracterizadas pela produção inicial de imunoglobulinas M (IgM) e imunoglobulinas G (IgG), respectivamente.

Dependendo da forma como se apresenta, a dengue pode ser de curso benigno ou grave: infecção inaparente, febre clássica do dengue (FD), febre hemorrágica do dengue (FHD) ou síndrome do choque do dengue (SCD) (BRASIL, 2007).

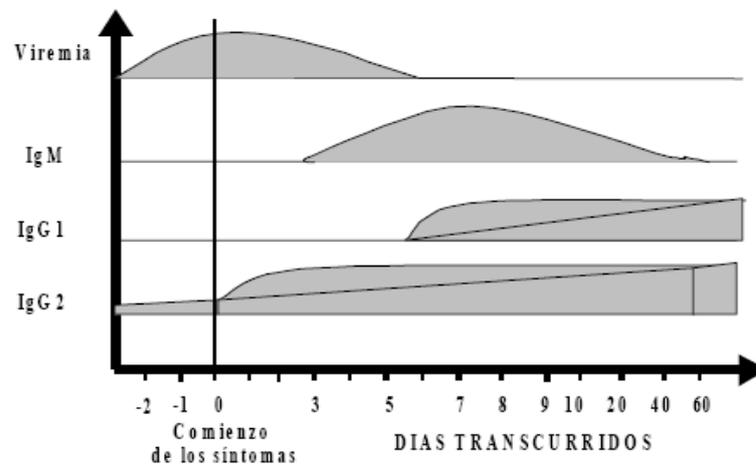


Figura 3 - Cinética da resposta imune durante a infecção pelo vírus dengue
Fonte: GOMEZ-CORDERO; ACOSTA-BAZ, 2005.

2.4.1 Febre clássica do dengue

A dengue clássica caracteriza-se por uma febre alta de início abrupto, cefaléia intensa, dor retroorbitária, dores articulares e musculares, prostração, acompanhada algumas vezes de exantema maculopapular, podendo ocorrer alguns fenômenos hemorrágicos sem maiores conseqüências (petéquias, epistaxe, gengivorragia) (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994). Geralmente os doentes evoluem para cura após uma semana, considerando-se o suporte adequado (LUPI et al., 2007).

Acomete principalmente jovens e adultos, ao contrário da FHD que, por outro lado, é primariamente uma doença de crianças com até 15 anos (GUBLER, 1998).

A presença de manifestações hemorrágicas não é exclusiva da febre hemorrágica da dengue, e quadros com plaquetopenia ($<100.000/\text{mm}^3$) podem ser observados, com ou sem essas manifestações. É importante diferenciar esses casos de dengue clássica com manifestações hemorrágicas e/ou plaquetopenia dos casos de febre hemorrágica da dengue (BRASIL, 2005).

2.4.2 Febre Hemorrágica do Dengue

A FHD ocorre quase exclusivamente em dois episódios clínicos: crianças e adultos com dengue heteróloga secundária pelo DENV e crianças com dengue primária nascidas de mães imunes. A teoria mais aceita e amplamente citada para a patogênese da FHD é a ADE (imun amplificação dependente de anticorpo) da infecção do vírus dengue (LIBRATY et al., 2009).

O que difere a FHD da FD é o extravasamento plasmático presente somente na FHD, porém ambas podem ser causadas por um dos quatro sorotipos do DENV (PONGSUMPUN et al., 2002). As manifestações clínicas iniciais da FHD são as mesmas descritas para a dengue clássica (FD), até que ocorra a defervescência da febre, entre o terceiro e o sétimo dia, e a síndrome se instale. Evidencia-se o surgimento de manifestações hemorrágicas espontâneas ou provocadas e/ou insuficiência circulatória com ou sem choque hipovolêmico. Prova do torniquete positiva, trombocitopenia ($100.000/\text{mm}^3$ ou menos) e hemoconcentração (aumento de 20% ou mais no hematócrito) são achados característicos da FHD/SCD (BRASIL, 2005; PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994).

A OMS (WHO, 1997) preconiza uma série de critérios clínico/laboratoriais para o

diagnóstico de FHD/SCD, e, tomando por base esses critérios, estabelece diferentes estágios de gravidade que corresponderiam a graus evolutivos da doença – dengue hemorrágico Grau I, II, III e IV. Os graus III e IV são classificados como síndrome do choque do dengue, enquanto todos os quatro o são como febre hemorrágica do dengue.

A susceptibilidade, em relação à FHD, não está totalmente esclarecida. Segundo Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (BRASIL, 2007), três teorias mais conhecidas tentam explicar sua ocorrência: a *teoria de Rosen* (relaciona o aparecimento de FHD à virulência da cepa infectante); a *teoria de Halstead* (relaciona a FHD com infecções sequenciais por diferentes sorotipos do vírus da dengue, onde a resposta imunológica, na segunda infecção, é exacerbada, o que resulta numa forma mais grave da doença, também conhecida por ADE); e a teoria proposta por autores cubanos conhecida por *teoria integral da multicausalidade* (a qual se aliam vários fatores de risco às teorias de infecções sequenciais e de virulência da cepa, como os fatores individuais, virais e epidemiológicos).

Não existe um tratamento específico antiviral, apenas pesquisas em andamento, mas geralmente os doentes recuperam-se após o suporte terapêutico com fluidos e eletrólitos, especialmente se as medidas são aplicadas precocemente. O reconhecimento precoce dos sinais de alerta para FHD (dor abdominal contínua e intensa, vômito persistente, agitação ou letargia) e o tratamento precoce são de extrema importância para reduzir as taxas de fatalidade (GUZMÁN; KOURÍ, 2002).

2.5 A dengue em crianças

Na faixa etária infantil, a dengue é especialmente reconhecida como importante enfermidade emergente causadora de pandemias, determinando expressivas taxas de mortalidade, (OPAS, 1995). Em 1998, a OMS considerou a dengue como a décima causa de

morte no mundo por enfermidades infecciosas e os menores de 15 anos são as principais vítimas deste padecimento, sendo responsáveis por cerca de 95% das infecções (ACOSTA-BAS; GOMEZ-CORDERO, 2005). O risco relativo de desenvolver a forma mais severa da doença é cerca de 100 vezes maior após a infecção secundária que na infecção primária (CUNHA et al., 1995).

As crianças podem ser assintomáticas ou ter febre indiferenciadamente, visto que crianças (na segunda fase da infância) ou adultos são mais prováveis de ter uma instalação mais severa de sintomas (WHO, 2007). Crianças assintomáticas ou oligoassintomáticas foram detectadas em 56% dos casos estudados em Niterói/RJ num inquérito sorológico realizado após as epidemias de 1990-1991 (CUNHA et al., 1995)

Em áreas endêmicas, infecções por dengue são registradas anualmente e as crianças não imunes apresentam-se como os principais hospedeiros susceptíveis (LANCIOTTI et al., 1992), ao contrário do que acontece em regiões indenes, onde os indivíduos em faixas etárias mais elevadas são os mais acometidos, principalmente quando há a introdução de um novo sorotipo (GONÇALVES NETO; REBÊLO, 2004; RIBEIRO et al., 2006).

A dengue hemorrágica surgiu entre as crianças no Sudeste Asiático na década de 1950 e desde então se transformou num grave problema de saúde pública mundial, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade pediátrica (SINGHI et al., 2007), representando a terceira ou quarta causa de hospitalização em crianças em algumas áreas (CUNHA et al., 1995). A co-circulação viral dos quatro sorotipos do dengue faz com que as crianças manifestam principalmente as formas mais graves e não usuais da doença (CAMPAGNA et al., 2006).

Segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2005):

A dengue na criança, na maioria das vezes, apresenta-se como uma síndrome febril com sinais e sintomas inespecíficos: apatia ou sonolência, recusa da alimentação, vômitos, diarreia ou fezes amolecidas. Nos menores de dois

anos de idade, os sintomas cefaléia, mialgia e artralgia podem manifestar-se por choro persistente, adinamia e irritabilidade, geralmente com ausência de manifestações respiratórias. As formas graves sobrevêm geralmente após o terceiro dia de doença, quando a febre começa a ceder. Em crianças menores de cinco anos, o início da doença pode passar despercebido e o quadro grave ser identificado como a primeira manifestação clínica. Observa-se, inclusive, a recusa de líquidos, podendo agravar seu estado clínico subitamente, diferente do adulto, no qual a piora é gradual. O exantema, quando presente, é maculopapular, podendo apresentar-se sob todas as formas (pleomorfismo), com ou sem prurido, precoce ou tardiamente.

Na infância estes quadros graves têm duas causas. A primeira a ser considerada é a infecção sequencial, por mais de um sorotipo viral, com a produção de anticorpos subneutralizantes contra o último sorotipo infectante. Estes anticorpos ao se ligarem aos vírus facilitam a sua entrada no macrófago, por se ligarem a receptores de membrana para a porção Fc de IgG. A segunda causa observa-se em crianças com menos de 1 ano, cujas mães tiveram dengue na gravidez. Os IgG maternos transferidos passivamente à criança, vão decaindo a níveis subneutralizantes e, eventualmente, ao ocorrer infecção por qualquer sorotipo do vírus da dengue, na vigência desta situação imunológica, ocorreria a FHD/SCD (FIGUEIREDO et al., 1994)

Também é possível ocorrer a infecção pela transmissão vertical do DENV. Segundo Maroun et al. (2008):

Existem, até então, poucos casos relatados de transmissão vertical de dengue publicados na literatura. A maior série de casos com repercussões neonatais documentadas incluiu 10 casos na Ásia (Tailândia e Malásia), dois na Europa (França) e cinco na América Latina (Taiti). Em relação ao feto, autores relatam um aumento de incidência de malformações de tubo neural em recém-nascidos (RN) cujas mães apresentaram dengue no primeiro trimestre de gravidez, durante uma epidemia de dengue na Índia. Há também relatos de prematuridade e de baixo peso ao nascer. No RN, os autores relatam que a dengue grave ocorre somente quando o quadro clínico na mãe acontece próximo ao termo ou ao parto em si, e não há tempo para produção materna de anticorpos protetores

Em áreas endêmicas para dengue, os clínicos devem estar alertas para FD/FHD em

mulheres grávidas que apresentam doença febril aguda (PETDACHAI et al., 2004)

2.6 Aspectos epidemiológicos

A despeito dos numerosos programas de erradicação ou controle que foram implementados nas últimas duas décadas, a incidência de dengue nas Américas tem apresentado uma tendência ascendente, com mais de 30 países informando casos da doença. Os picos epidêmicos têm sido cada vez maiores, em períodos que se repetem a cada 3-5 anos, quase de maneira regular (BRASILa, 2009).

Nos últimos 10 anos (1999-2008) foram notificados, segundo dados oficiais da Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO, 2010) quase seis milhões de casos nas Américas (1999-2008), destes, cerca de quatro milhões de casos foram no Brasil (67%).

A distribuição disseminada e o aumento das taxas de incidência estão relacionadas à distribuição do *A. aegypti*, principalmente devido à ineficiência de programas de controle vetorial e ao aumento da densidade populacional em grandes áreas urbanas, com conseqüente deterioração do meio ambiente urbano (TORRES; CASTRO, 2007). A adaptação do vetor aos ambientes domésticos e peridomésticos, utilizando-se de recipientes que armazenam água potável e recipientes descartáveis que acumulam água de chuvas, comumente encontrados nos lixos das cidades (CÂMARA et al., 2007), fortalecem a condição ecológica que torna esta espécie predominantemente urbana (RIBEIRO et al., 2006).

Outro fator responsável para a emergência global da dengue e FHD seria o aumento das viagens aéreas, que proporcionariam o mecanismo ideal para o transporte do vírus dengue e outros patógenos urbanos entre centros populacionais mundiais, resultando num constante movimento do vírus da dengue entre humanos infectados de todas as áreas do mundo e assegurando, dessa forma, introduções repetidas de novas cepas virais e sorotipos dentro de

áreas onde o mosquito vetor tem ocorrência (GUBLER, 1998).

A dengue tem acometido indivíduos de ambos os sexos, porém existem estudos que mostram maior incidência em mulheres que em homens. Pessoas de todas as idades são suscetíveis de adquirir esta infecção, contudo a maior incidência de casos nas faixas etárias mais elevadas é um padrão observado em áreas indenes logo após a introdução de um sorotipo do vírus (GONÇALVES NETO; REBÊLO, 2004; RIBEIRO et al., 2006).

Segundo Torres (2008), a carga da doença, expresso em anos perdidos por incapacidade é de 0,42 x 1000 habitantes, semelhante ao da meningite, o dobro da hepatite e de um terço do que a do HIV/AIDS. No sudeste da Ásia e do Pacífico Ocidental, as taxas de incidência são tão altas quanto 6.400 x 100.000 habitantes, e de lá - há décadas - as crianças constituem até 95% dos casos. Atualmente a situação mudou e há um ligeiro predomínio em adultos, à semelhança do que estava ocorrendo no Brasil e demais países sul-americanos.

Considerando-se a variação genética dos quatro sorotipos virais existentes do dengue, todos são capazes de produzir infecção sintomática, enfermidade febril e quadros graves que podem levar a morte. Algumas variantes genéticas parecem ser mais virulentas ou possuir maior potencial epidêmico (ACOSTA-BAZ; GOMEZ-CORDERO, 2005).

Qualquer um dos quatro sorotipos do vírus pode provocar a forma hemorrágica da enfermidade, embora exista associação mais frequente, observada no sudeste asiático, nas infecções sequenciais terminadas com o DENV-3 e, principalmente, o DENV-2. Também a sequência DENV-1/DENV-2 tem-se mostrado particularmente importante para a ocorrência de FHD/SCD, como se observou na Tailândia e na região das Américas em anos mais recentes. As evidências epidemiológicas sugerem que o FHD/SCD ocorre com maior frequência dentro de um intervalo entre 3 meses até 5 anos a partir da infecção primária. Atente-se para o fato de que os casos de FHD/SCD correspondem a uma fração do total dos casos de dengue ocorridos em um determinado grupo populacional submetido à infecção secundária, ou seja, a maior parte das pessoas, mesmo apresentando uma infecção sequencial, evoluirá para os quadros mais benignos do dengue (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994).

Tem sido observado um padrão sazonal de incidência coincidente com o verão, devido

à maior ocorrência de chuvas e aumento da temperatura nessa estação. É mais comum nos núcleos urbanos, onde é maior a quantidade de criadouros naturais ou resultantes da ação do ser humano. Entretanto, a doença pode ocorrer em qualquer localidade desde que exista população humana susceptível, presença do vetor e o vírus seja introduzido (BRASIL, 2007).

2.6.1 A dengue no mundo

A primeira epidemia conhecida de FHD ocorreu em Manila, Filipinas, entre 1953 e 1954, mas dentro de 20 anos a dengue na forma epidêmica alastrou-se pelo sudeste da Ásia. Em meados da década de 1970, tornou-se a principal causa de hospitalização e morte entre crianças na região (GUBLER, 1998). Em 1997, o vírus da dengue e o mosquito *A. aegypti* apresentaram uma distribuição mundial nos trópicos, causando mais doença e morte que qualquer outra arbovirose humana (VAUGHN et al., 2000).

Nas últimas décadas, houve um aumento na prevalência mundial de dengue, pois a doença tornou-se endêmica em 112 países da África, das Américas, da Região Leste do Mediterrâneo, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental (SINGHI et al., 2007). Sendo as duas últimas regiões citadas, as mais afetadas. Antes de 1970, apenas nove países experimentaram epidemias de dengue, número que aumentou mais de quatro vezes em 1995 (WHO, 2009).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) calcula que 40% da população mundial, cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão vivendo em áreas tropicais e subtropicais consideradas de risco (Figura 4).

Todos os anos ocorrem cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue, 500.000 casos de dengue hemorrágico e no mínimo 12.000 mortes são relatados no mundo (TEIXEIRA et

al., 2005). Noventa por cento dos óbitos ocorrem em crianças com menos de 15 anos. Em 2005, houve cerca de 320.000 casos de dengue nas Américas dos quais, 15.253 eram de FHD, com 80 mortes registradas. Somente no Brasil aconteceram cerca de 2/3 dos casos e metade dos óbitos (SINGHI et al., 2007). Em 2007, existiam mais de 890.000 casos notificados de dengue nas Américas, dos quais 26.000 foram casos de FHD (WHO, 2009), demonstrando que a dengue está em escala ascendente no mundo, o que aumenta os riscos de casos graves e mortes.

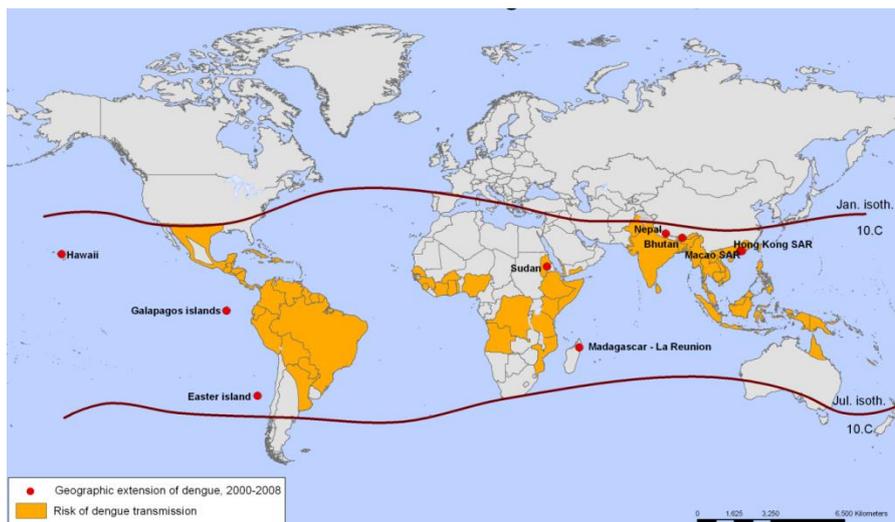


Figura 4 - Área em risco de dengue em nível global.
Fonte: WHO, 2009.

Nas Américas, a primeira grande epidemia de FHD ocorreu em Cuba, em 1981, com 24 mil casos, 10 mil casos de SCD e 158 mortes reportadas durante um período de 3 meses (TORRES; CASTRO, 2007).

2.6.2 A dengue no Brasil

O Brasil permaneceu livre do *A. aegypti* até 1976, como resultado do sucesso do programa de erradicação para prevenção da febre amarela urbana coordenada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) nas décadas precedentes (SIQUEIRA et al.,

2005). Assim, durante quase 60 anos, de 1923 a 1982, o Brasil não apresentou registro de casos de dengue em seu território (TAUIL, 2001), porém a subsequente reinfestação do *A. aegypti* em áreas urbanas e a introdução do vírus dengue (DENV) em 1982 em Boa Vista/Roraima e sua disseminação pelo país a partir de 1986, levaram ao ressurgimento dos surtos de dengue e aumento do risco de urbanização da febre amarela no país (SIQUEIRA et al., 2005).

A primeira epidemia no Brasil, documentada clínica e laboratorialmente, ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista/RR, causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (OSANAI et al., 1983). Em 1986, ocorreram epidemias no Rio de Janeiro causadas pelo DENV-1 acompanhada da disseminação para outros seis estados brasileiros até 1990. Neste mesmo ano, foi identificada a circulação de um novo sorotipo, o DENV-2, também no Estado do Rio de Janeiro (MIAGOSTOVICH et al. 1997; CAMPAGNA et al., 2006).

Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes (VASCONCELOS et al., 1993, FIGUEIREDO et al., 2004).

Após completa ausência das Américas por mais de 15 anos, o sorotipo DENV-3 foi reintroduzido no continente em 1994, atingindo o Brasil em 2000, numa ampla e severa epidemia de dengue no verão de 2001-2002 (NOGUEIRA et al., 2002; COELHO et al., 2008). O Estado do Rio de Janeiro revelou-se novamente como o Estado nodal para a introdução e disseminação desse novo sorotipo no país (NOGUEIRA et al., 2001; 2002).

No período de 1986-2007, o Brasil apresentou mais de 4,5 milhões de casos confirmados oficialmente com 493 mortes (COELHO et al., 2008). Os piores anos da história foram 2002 e 2008, com 794 mil e 793 mil casos notificados, respectivamente (PAHO, 2010). A dispersão do DENV-3 desde 2001 tem sido associada ao agravamento dos casos de dengue no Brasil e é o sorotipo responsável pela maior ocorrência de FHD nas últimas epidemias

(FIGUEIREDO, 2003; PINHEIRO et al., 2005).

A dengue encontra-se presente em todos os 27 Estados da Federação, distribuída por 3.794 municípios, sendo responsável por cerca de 60% das notificações nas Américas (CÂMARA et al., 2007).

No Brasil, os adultos jovens foram os mais atingidos pela doença desde a introdução do vírus. No entanto, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASILa, 2009), a partir de 2006, alguns Estados apresentaram a recirculação do sorotipo DENV-2 após alguns anos de predomínio do sorotipo DENV-3. Esse cenário levou a um aumento no número de casos, de formas graves e de hospitalizações em crianças, principalmente no Nordeste do país

Em 2009, foram registrados 529.237 casos de dengue. Houve 2.271 casos e 154 óbitos por FHD, e 5.952 casos de dengue com complicação, com 144 óbitos. No mesmo período de 2008, ocorreram 4.232 casos de FHD, com uma redução de 63% no número de casos graves em 2009. O monitoramento da circulação viral demonstra que o sorotipo DENV-3, apesar de ainda ser o mais frequentemente isolado no país, vem sendo substituído pelo sorotipo DENV-2 (BRASILa, 2010).

O quadro epidemiológico atual da dengue no país caracteriza-se pela ampla distribuição do *A. aegypti* em todas as regiões, com uma complexa dinâmica de dispersão do seu vírus, circulação simultânea de três sorotipos virais (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) e vulnerabilidade para a introdução do sorotipo DENV-4. Essa situação epidemiológica tem, ao longo dos anos, apesar dos esforços do Ministério da Saúde, dos estados e dos municípios, provocado a ocorrência de epidemias nos principais centros urbanos do país, infligindo um importante aumento na procura pelos serviços de saúde, com ocorrência de óbitos. Mais recentemente, com a maior intensidade de circulação do sorotipo DENV-2, tem-se observado um agravamento dos casos, com aumento do registro em crianças. (BRASILa, 2009)

Em 2009, as informações disponibilizadas pelas Secretarias Estaduais de Saúde sobre o monitoramento da circulação viral demonstram o isolamento dos sorotipos DENV-1,

DENV-2 e DENV-3 (Figura 6) em diversos estados, com predomínio para o sorotipo DENV-1 (50%). Até o presente momento, não foi isolado o DENV-4, assim como não há evidência epidemiológica de sua circulação no Brasil. (BRASILa, 2010).

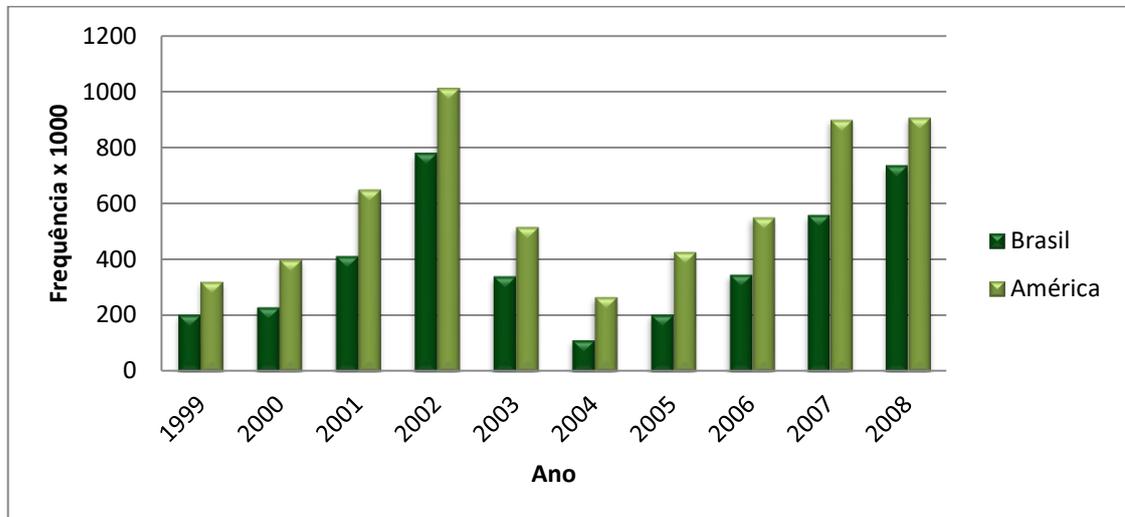


Figura 5 - Incidência da dengue na América e Brasil, 1999-2008.
Fonte: PAHO, 2008.

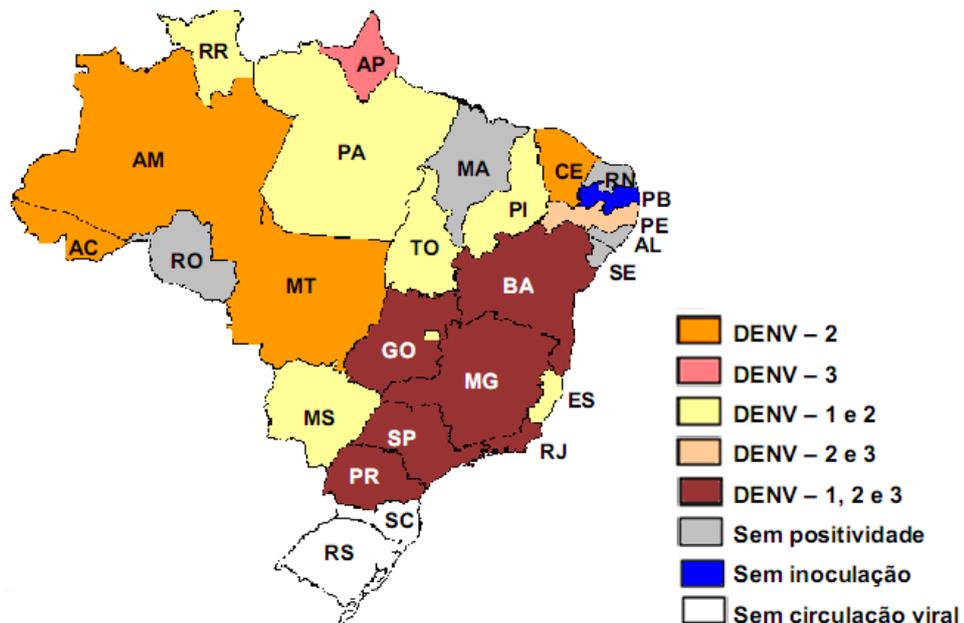


Figura 6 - Distribuição espacial por sorotipo circulante isolado, de acordo com a unidade federada, Brasil, 2009.
Fonte: BRASIL, 2010

2.6.3 A dengue no Amazonas

Na Região Amazônica, fatores ambientais e sociais, tais como alta temperatura e umidade, estações chuvosas prolongadas associadas à pobre infraestrutura, fornecem condições ideais para a proliferação do vetor (PINHEIRO; TADEI, 2002).

O Amazonas foi um dos últimos Estados a tornar-se infestado pelo *A. aegypti*. A ampla dispersão do vetor na cidade de Manaus, capital do Amazonas, instalou-se em 1996 (FIGUEIREDO et al., 2004) e dois anos mais tarde, uma epidemia com 13.873 casos foram reportados na capital do Estado do Amazonas. Em 1998, foram detectados os sorotipos DENV-1 e DENV-2. Durante o ano de 2002 o DENV-3 foi isolado pela primeira vez de dois pacientes em Manaus. Em 2001 e 2003 foram registrados 55 e 59 casos de FHD, respectivamente (PINHEIRO et al., 2005).

Em Manaus, após a epidemia de 2001, com 18.595 casos (ROCHA; TAUIL, 2009), a dengue adquiriu um caráter endêmico, com aumento da incidência nos períodos chuvosos, de janeiro a julho. Já foram identificados os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e o grupo etário mais acometido até 2006 era de adultos de 20 a 49 anos. A partir de 2006/2007, segundo dados da FVS e também confirmado por Rocha e Tauil (2009) a dengue vem afetando principalmente a faixa etária dos menores de 15 anos.

Em 2008, Figueiredo et al. (2008) relataram a presença do DENV-4 em Manaus, Amazonas. Porém, o resultado foi contestado pelo Ministério da Saúde e até o momento não houve consenso a cerca da presença deste sorotipo na Amazônia Brasileira (CODEÇO et al., 2009).

De Melo et al. (2009), analisou as amostras de Figueiredo et al. (2008) com o intuito de identificar o genótipo do DENV-4 e identificaram o genótipo tipo I, embora o genótipo II estivesse presente nas Américas há mais de duas décadas. A presença deste genótipo foi um

resultado inesperado, uma vez que não se conhecia sua circulação no ocidente. A intensificação das atividades econômicas entre o Brasil e outros países asiáticos (especialmente China) poderia explicar a introdução direta para o Brasil (DE MELO et al., 2009).

Atualmente, segundo dados oficiais no país, circulam 3 sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-2 e DENV-3), e a introdução do DENV-4 no país é iminente devido ao transporte aéreo e terrestre intenso entre o Brasil e países americanos e outros continentes afetados. Países adjacentes como Venezuela e Peru possuem o vírus DENV-4 e fazem fronteira com a região norte do Brasil (PAHO, 2010). Além disso, Manaus possui um polo industrial que compreende um grande número de empresas asiáticas, ocorrendo um fluxo intenso de pessoas tanto no que diz respeito ao aspecto comercial-industrial, quanto ao turístico.

No Amazonas, a dengue na infância está se tornando um sério problema de saúde pública, onde em 2006 e 2007, os casos de dengue em menores de 15 anos foi maior que 50% dos casos notificados (ROCHA; TAUILL, 2009).

O Estado do Amazonas apresentou 11.281 casos notificados de dengue em 2008 e 2.680 em 2009, uma variação de -76%. As taxas de incidência foram de 337,6 e 79,0, respectivamente (BRASILa, 2010). A taxa de letalidade no Amazonas foi de 4,1% (BRASILb, 2009)

Em 2009, a capital, Manaus, concentrou 46,1% dos casos (1.232), incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes; seguido por Coari com 340 casos (12,7%) e Humaitá com 515 casos (19,3%), correspondendo a incidência de 1.264,2 e 507,5 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. O último sorotipo isolado no Estado foi o DENV-2. Entretanto, devido ao pequeno número de amostras positivas, não foi possível uma confirmação do mesmo como sorotipo predominante (BRASILa, 2010).

Apesar dos esforços dos governos em promover a vigilância, controle, e adequado

tratamento, a perspectiva epidemiológica pode ser considerada negativa, devido parcialmente ao ambiente urbano complexo do país, facilitando a proliferação do vetor principal da doença, *A. aegypti*, e a alta incidência dos níveis de infestação (TEIXEIRA et al., 2005).

2.7 Diagnóstico laboratorial

Pode-se fazer o diagnóstico laboratorial de infecção por dengue através da detecção do vírus e dos anticorpos produzidos contra ele. Sendo que os três métodos mais utilizados pelos laboratórios são o isolamento viral, a detecção de seu genoma por amplificação de seu ácido nucléico e a detecção de anticorpos específicos (SHU; HUANG, 2004; KLUNTHONG et al., 2007).

O isolamento do vírus pode ser realizado através da inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos, cultura de células ou inoculação em mosquitos vivos (HENCHAL; PUTNAK, 1990; GUBLER, 1998). Usualmente se inocula o sangue/soro do caso suspeito em cultura de células de mosquito, que ao se infectarem propagam o vírus, permitindo, após alguns dias, a sua identificação (FIGUEIREDO, 2006). A identificação costuma ser realizada através de imunofluorescência indireta (IFI), independentemente do sistema biológico usado para o isolamento do vírus (GUZMÁN; KOURÍ, 1996).

Os vírus em circulação podem ser detectados no sangue durante a fase febril (virêmica), em média até 5 dias após o início dos sintomas e são rapidamente depurados com o surgimento de anticorpos neutralizantes, que tornam-se detectáveis a partir deste período (SINGHI et al., 2007). Assim, o tipo de amostra e o tempo de coleta determinam o tipo de exame diagnóstico que será utilizado.

Em casos fatais, pode-se observar a presença de antígenos virais no fígado por imunohistoquímica (FIGUEIREDO, 2006).

Existem quatro testes sorológicos que podem ser utilizados para o diagnóstico da dengue: inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, teste de neutralização e MAC-ELISA (*immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay*) (GUBLER, 1998). Entretanto, o método laboratorial mais utilizado pelos serviços de saúde pública no Brasil, após o quinto dia de doença, é a detecção de anticorpos IgM específicos pelo MAC-ELISA (FIGUEIREDO, 2006).

O diagnóstico específico através de exames sorológicos frequentemente não é possível por causa das extensas reações cruzadas dos anticorpos aos *Flavivirus*, particularmente entre os vírus da dengue. Amostras pareadas de soro são necessárias e esta exigência causa uma demora no diagnóstico e os resultados são raramente concluídos (LANCIOTTI et al., 1992).

Atualmente, existem novos métodos diagnósticos baseados em princípios biomoleculares como: RT-PCR, hibridização do ácido nucléico e imuno-histoquímica (GUBLER, 1998). Esses métodos vêm gradualmente substituindo o isolamento viral na fase aguda da doença (SHU; HUANG, 2004).

A sensibilidade, a especificidade e a rápida detecção de quantidades mínimas de material genético em amostras humanas fazem do PCR uma ferramenta laboratorial muito útil para o diagnóstico da dengue. Além disso, ele também pode ser usado em estudos genômicos de diferentes linhagens virais do dengue, através do uso de enzimas de restrição ou análise da sequência nucleotídica do seu material genético (GUZMÁN; KOURÍ, 1996), além de fornecer o diagnóstico de múltiplas infecções.

Está disponível no mercado também um teste imunoenzimático/imunocromatográfico direcionado contra a proteína NS1 do vírus dengue. Alguns estudos têm demonstrado que este antígeno está presente em altas concentrações no soro do indivíduo infectado durante a fase clínica precoce da doença, onde os testes convencionais como o MAC-ELISA não conseguem detectar a infecção. A pesquisa do antígeno NS1 é eficiente até o 3º dia após o início dos

sintomas, não importando se a dengue é primária ou secundária, porém ainda é pouco utilizada pelos laboratórios (YOUNG et al., 2000; ALCON et al., 2002; DUSSART et al., 2006).

Na ocorrência de epidemias, o Ministério da Saúde (BRASILc, 2010) preconiza realizar a sorologia em apenas uma amostra dos pacientes com FD, pois a confirmação da maioria dos casos é feita pelo critério clínico-epidemiológico, após a confirmação laboratorial da circulação viral na área. Em geral, tem-se estabelecido que se colha sangue de um a cada dez pacientes (10%) com suspeita de febre do dengue. A coleta é obrigatória para 100% dos casos graves.

2.8 Prevenção e controle

O setor saúde, por si só, não tem como resolver a complexidade dos fatores que favorecem a proliferação do vetor da dengue. A rápida urbanização do país gerou déficits nas estruturas de saneamento básico, favorecendo o aumento de criadouros do vetor. O trânsito de pessoas e veículos terrestres, aéreos e aquáticos, torna-se cada dia mais intenso e rápido, favorecendo a dinamizando as epidemias de dengue (BRASILa, 2009).

Segundo a OMS (2009), não existe vacina para proteger contra a dengue, embora muitos estudos estejam em andamento. O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra os quatro sorotipos de DENV que imunizem contra a forma leve ou grave da doença, continua a ser um grande desafio.

A compreensão limitada atual a cerca de como o vírus se comporta e interage com o sistema imunológico associada à falta de modelos animais de laboratório disponíveis para testar a resposta imunológica às vacinas em potencial, são fatores que dificultam esse progresso. Apesar de várias vacinas estarem no processo de ensaio clínico, uma vacina

eficiente, segura e de baixo custo não estará disponível num futuro próximo (SHU; HUANG, 2004).

Segundo Teixeira et al. (2005), existem três fatores que tornam a prevenção da dengue uma tarefa difícil: a ausência de uma vacina efetiva, a força da morbidade de um agente infeccioso e a predominância de um vetor altamente competente e persistente em áreas urbanas populosas. Assim, o controle e a prevenção da doença têm sido direcionados principalmente para atividades de vigilância e controle do vetor, somados à tentativa da conscientização pública em massa (TAUIL, 2001; SIQUEIRA et al., 2005). Apesar destas ações, surtos vêm ocorrendo continuamente em diversas áreas altamente urbanizadas, salientando a alta complexidade que envolve o controle do dengue não somente no Brasil, mas em todo o mundo

Não existem medidas de controle específicas direcionadas ao homem, uma vez que não se dispõe de nenhuma vacina ou drogas antivirais. A notificação dos casos suspeitos, a investigação do local provável de infecção, bem como a busca ativa de casos são elementos fundamentais (BRASILa, 2009)

Segundo o Ministério da Saúde (BRASILa, 2009):

Nessa direção, o SUS vem desenvolvendo uma série de esforços solidários, buscando propiciar aos estados e municípios melhores condições para o adequado enfrentamento do problema. Dentre as ações destacam-se o aumento de R\$ 130 milhões no Teto Financeiro de Vigilância em Saúde, a intensificação das campanhas de informação e mobilização da população, a publicação e distribuição de manuais de manejo clínico de adultos e crianças, de enfermagem, do caderno de atenção básica, entre outros.

Também há o LIRAA, que é o programa de Levantamento Rápido de *Aedes aegypti*. Utiliza método simplificado para determinar os índices larvários de *A. aegypti*, realizado em amostras de dois estágios (casas/quarteirões). As vantagens são o levantamento do *status* de infestação da cidade em uma semana; informação rápida e oportuna, além de poder identificar

os principais criadouros e áreas críticas (BRASIL, 2010)

Os resultados desses esforços começaram a surtir efeito em 2009, com uma importante redução no número de casos de dengue, inclusive em suas formas graves, e principalmente no número de óbitos. O desafio é dar sustentabilidade e continuidade a esses resultados, tendo sempre como meta uma taxa de letalidade por dengue menor que 1%.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os sorotipos do vírus dengue em crianças de 0 a 10 anos residentes no município de Manaus, Amazonas.

3.2 Específicos

3.2.1 Identificar os sorotipos virais infectantes circulantes nos bairros e zonas de Manaus;

3.2.3 Apresentar aspectos epidemiológicos da ocorrência do vírus dengue na população infantil de 0 a 10 anos de idade.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de estudo

O estudo foi do tipo longitudinal, retrospectivo, com duração de 12 meses, com amostragem probabilística sistematizada, onde se estudou a distribuição dos sorotipos do DENV na faixa etária selecionada através da técnica molecular RT-PCR (reação em cadeia da polimerase conjugada à transcriptase reversa).

4.2 Universo de estudo

4.2.1 Local de realização do estudo

O estudo foi realizado na cidade de Manaus, Amazonas.

As amostras foram obtidas no LACEN/AM (Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas) e os procedimentos laboratoriais moleculares foram realizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA / Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde / Laboratório de Virologia.

O projeto foi submetido ao CEP-INPA (Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) sob protocolo 184/08 e aprovado em 19 de junho de 2008.

4.2.2 População de referência

População que procura por serviços de saúde pública para diagnóstico de

esclarecimento de febre persistente, suspeitos de dengue, cujas amostras são encaminhadas ao LACEN-AM/FVS para identificação viral.

O LACEN-AM/FVS em Manaus é o laboratório de apoio da Fundação de Vigilância em Saúde (FVS-AM) para a investigação laboratorial de dengue. O laboratório recebe amostras de todo o Estado e realiza o diagnóstico de dengue através de sorologia (IgM ELISA). Também recebe amostras para isolamento viral, que são encaminhadas periodicamente ao Instituto Evandro Chagas, Belém/PA, para a definição do sorotipo viral através da cultura de células C6/36. No ano de 2008 o laboratório recebeu 361 amostras para isolamento viral.

4.2.3 População de Estudo

Crianças com suspeita de dengue pertencentes à faixa etária entre 0 e 10 anos e 11 meses de idade de ambos os sexos, cujas amostras de sangue total e/ou soro foram encaminhadas ao LACEN-AM/FVS para isolamento viral para dengue.

4.2.4 Critérios de inclusão e exclusão

Participaram do estudo, amostras de sangue total ou soro de crianças na faixa etária de 0 a 10 anos de idade, encaminhadas ao LACEN-AM/FVS para o diagnóstico de dengue (isolamento viral), coletadas até 5 dias após o início dos sintomas (período de viremia). Todas as crianças do estudo foram residentes do município de Manaus-Am.

Não foram incluídas as amostras de crianças: maiores de 10 anos; coletadas após 5 dias do início dos sintomas ou sem informação sobre dias de doença até a coleta e/ou sem data de coleta; não residentes no município de Manaus-AM; e com volume de sangue/soro

insuficiente para alíquotar para o referido estudo (a prioridade foi o isolamento viral no LACEN-AM/FVS).

Nos casos do mesmo indivíduo ter apresentado duas amostras (soro e sangue total), foi priorizada a análise do sangue total, pois conforme divulgado por Klungthong et al. (2007) esta é a melhor amostra para detecção do vírus na fase precoce da dengue, quando comparada com soro e/ou plasma.

4.2.5 Casuística

O cálculo amostral adotado para o estudo foi o inerente às amostras finitas, baseado na seguinte equação:

$$n = \frac{Z^2 p q N}{d^2 (N-1) + Z^2 p q}$$

onde:

Z = abscissa da norma padrão

N = tamanho da população padrão

p = estimativa de proporção

$q = 1 - p$

d = erro amostral

O LACEN-AM/FVS recebeu ao longo do ano de 2008 um total de 207 amostras de crianças (N). Considerando-se uma prevalência (p) de 10% de positividade nos isolamentos virais para essa faixa etária, com intervalo de confiança (q) de 95% e admitindo-se um erro amostral (d) de 0,045 estimou-se uma casuística de 94 amostras.

No entanto, foram descartados deste estudo 38 amostras, por não se enquadrarem dentro dos critérios de inclusão anteriormente descritos (14 amostras com volume

insuficiente; 17 sem identificação da data do início dos sintomas ou do tempo hábil de coleta). Assim, ao todo só foram possíveis participar do universo de estudo 169 amostras.

As amostras foram selecionadas de forma sistematizada até que se alcançasse o total de 94 amostras, utilizando-se razão igual a 2 (inclui uma, descarta uma), que resultaram na inclusão de 84 amostras. E depois nas restantes, razão igual a 8 (inclui uma descarta sete), até que se completasse a casuística (mais 10 amostras selecionadas nesse processo). A última razão foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: N/n ($85/10=8,5$). Onde N equivale aos que foram excluídos na primeira etapa e, n é o total de amostras que faltam para completar a casuística de 94 ($94-84=10$).

Foram feitos dois sorteios para saber que amostra incluir e eliminar. Na primeira etapa, sorteou-se a segunda amostra para ser incluída (nesse caso, incluíram-se todas as amostras com números pares). Na segunda etapa sorteou-se um número de 1 a 8, nesse caso o número 7 foi sorteado. Assim, incluiu-se a 7ª amostra e a cada 8 contadas, uma foi incluída até completar a casuística.

4.2.6 Variáveis analisadas

As fichas de investigação laboratorial que contém as informações sobre os pacientes encaminhados ao LACEN-AM/FVS foram analisadas (Anexo A).

Destacamos as seguintes variáveis nesse estudo: idade, sexo, bairro de residência, zona de residência, data de início dos sintomas, e sorotipo viral infectante.

As variáveis sinais e sintomas não foram analisadas neste estudo, pois considerou-se que os dados estavam passíveis de erros (viés). Notou-se que nas fichas as informações sobre este aspecto na maioria das vezes estavam ausentes ou pobremente descritas.

4.3 Amostras

Utilizou-se neste estudo amostras de sangue total e soro, pois o LACEN-AM/FVS recebeu estes dois tipos de amostras para o isolamento viral da dengue. Tanto o soro quanto o sangue total (cerca de 2 mL) foram armazenados em *freezer* a -70°C no próprio laboratório.

Uma alíquota de sangue total ou soro, cerca de 500 μL , foi recolhido em microtubo, e armazenada em *freezer* a -70°C . O transporte para posterior processamento laboratorial foi feito em temperatura fria (caixa térmica com gelo).

Quando o mesmo indivíduo apresentou duas amostras (sangue total e soro), foi priorizada a análise do sangue total, pelo fato desse tipo de amostra apresentar melhores resultados que o soro nas tentativas de tipificação viral para dengue, conforme divulgado por Klungthong et al. (2007).

4.3.1 Rotulagem das amostras

A identificação da amostra foi a mesma utilizada pelo LACEN-AM/FVS: uma etiqueta adesiva impressa contendo o número do protocolo, nome, data de nascimento, data de entrada no LACEN-AM/FVS e tipo de exame (isolamento viral). Adotou-se uma numeração crescente de acordo com a ordem cronológica de recebimento da amostra, para que fosse possível realizar a seleção sistemática da casuística.

4.4 Método de Identificação Viral

O método de identificação do RNA viral do dengue foi feito através da reação em cadeia da polimerase conjugada à transcrição reversa (RT-PCR), seguida por um Semi-

Nested-PCR, segundo metodologia descrita por Laciotti *et al.* (1992).

A RT-PCR obtém o DNA complementar (cDNA) e amplifica-o produzindo um amplicon de 511 pares de bases (pb). O *Semi-Nested-PCR* amplifica a sequência específica para cada sorotipo do DENV, produzindo amplicons com diferentes tamanhos, conforme o sorotipo ou sorotipos presentes na amostra (Tabela 1).

Durante os processos biomoleculares foram utilizados controles negativos (sangue humano sabidamente negativo para dengue) e controles positivos (sangue total positivo para DENV-3). Os controles foram utilizados desde o processo de extração do RNA viral até a última etapa da análise (*Semi-Nested-PCR*), em lotes de processamento (de 10 em 10 amostras).

4.5 Fluxo de procedimentos

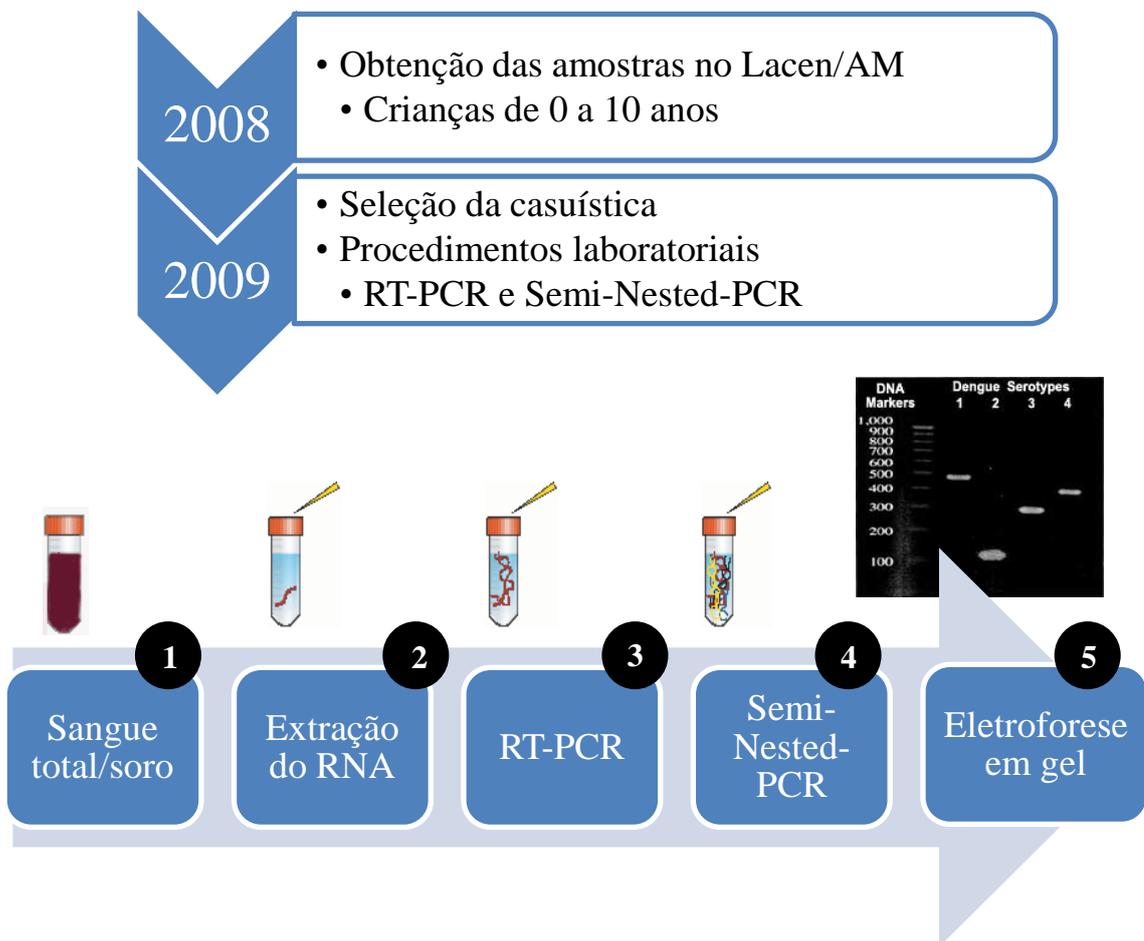


Figura 7 - Resumo dos procedimentos realizados no estudo.

4.6 Procedimentos Laboratoriais

4.6.1 Extração do RNA

A extração do RNA foi executada utilizando-se o método do Trizol (Invitrogen), baseado na utilização de solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Um volume de 100µL da amostra foi homogeneizada com 300µL do reagente Trizol em microtubo de 500µL, em câmara de exaustão. A mistura foi vigorosamente agitada em *vórtex* e logo em seguida incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi adicionado 80µL de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (diluído na proporção de 1:25, respectivamente) e a mistura foi agitada por 15 segundos no agitador automático e incubada em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro microtubo de 500µL. Foi adicionado igual volume (cerca de 200µL) de álcool isopropílico gelado para precipitar o RNA, homogeneizado por 5 segundos e a suspensão foi incubada por 15 minutos em banho de gelo. Logo após, a suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante (isopropanol) foi retirado cuidadosamente, do lado oposto do precipitado (RNA), e descartado. O precipitado foi lavado com 500µL de etanol gelado a 75% e homogeneizado por 15 segundos. A suspensão foi centrifugada a 9.000 x g por 8 minutos a 4°C. O etanol sobrenadante foi retirado e descartado e o processo de lavagem repetiu-se mais uma vez. Terminada a lavagem, o RNA precipitado foi seco e ressuspenso com 30µL de solução de água livre de RNase e DNase e estocado a -70°C até o momento do processamento.

4.6.2 Procedimento molecular

Uma vez extraído, o RNA viral foi submetido à técnica de transcrição e amplificação utilizando-se uma transcriptase reversa (RT) para obtenção do DNA complementar (cDNA) associada à uma polimerase (PCR) para amplificação do cDNA, baseado no protocolo de Lanciotti et al. (1992). Após a obtenção do cDNA o produto foi submetido a um segundo PCR (*Semi-Nested-PCR*) com iniciadores tipo-específicos, que amplificaram segmentos de cDNA de tamanho característico para cada sorotipo do vírus dengue, conforme pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1

Primers utilizados para identificação do vírus dengue e seus sorotipos

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho do Amplicon</i>
D1	5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G-3'	511pb
D2	5'-TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC-3'	511pb
TS1	5'-CGT CTC AGT GAT CCG GGG G-3'	482pb
TS2	5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG-3'	119pb
TS3	5'-TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C-3'	290pb
TS4	5'-CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A-3'	392pb

Fonte: LANCIOTTI et al., 1992

4.6.2.1 Primeira Etapa: RT-PCR

Neste procedimento, foram utilizados iniciadores designados para anelar com genoma de qualquer um dos quatro sorotipos de dengue, gerando um produto com 511 pb, correspondente a uma região conservada entre os genes C/prM (Tabela 1). A reação de

amplificação foi realizada em um volume final de 27,5µL, contendo os seguintes componentes: 5µL do RNA extraído, 2,5µL de PCR *buffer* 10X (10mM de Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl), 0,75 µL MgCl₂ 50mM, 0,5µL de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10mM, 1,25µL de DTT 0,1M (Ditiotreitol), 0,25 µL de cada iniciador 12,5mM (D1 e D2); 0,25 µL de Inibidor de RNase 40U/µL (*RNase Out™ Recombinant* Invitrogen®), 0,35 µL da enzima Transcriptase Reversa 200U/µL (*Super Script™ II RNase H* Invitrogen®); 0,125 µL unidades da enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* 5U/µL Invitrogen ® e 16,3 µL de água miliQ.

A mistura foi amplificada em um termociclador Eppendorf® *Mastercycler Gradient* programado para 1 ciclo à 45°C por 65 minutos; 1 ciclo à 94°C de 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 60 segundos, 55°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos; e um ciclo final a 72°C por 10 minutos, mantendo-se a amostra à 4 °C no término do procedimento.

4.6.2.2 Segunda Etapa: Semi-Nested-PCR

O produto do primeiro ciclo foi submetido a uma reação realizada com iniciadores específicos para cada sorotipo viral, para que houvesse a amplificação de fragmentos de 489pb, 119pb, 290pb e 392pb para os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente (Tabela 1). As reações de Semi-Nested-PCR foram realizadas em um volume final de 30,8µL, utilizando 5µL do produto do primeiro ciclo diluído em água livre de DNase e RNase na proporção de 1:100. A mistura de reação foi a mesma do primeiro ciclo da PCR, com exceção do *primer* D2 que foi substituído pelos *primers* tipo-específicos de cada sorotipo do dengue, no volume de 0,25 µL de cada iniciador 12,5mM (TS1, TS2, TS3 e TS4), e o DTT e a enzima transcriptase reversa que foram retirados nesta segunda fase de amplificação.

As amostras foram submetidas à incubação em termociclador com as seguintes

condições: 28 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, seguido de 72°C por 2 minutos; mais 1 ciclo final a 72°C por 10 minutos.

4.7 Detecção do produto amplificado

Foi retirado 7µL do produto amplificado no segundo PCR e adicionado 3µL do tampão de corrida com azul de bromofenol e glicerina. Aos poços do gel foram acrescentados, nessa ordem, 2µL do padrão de peso molecular equivalente a 100 pares de bases (*Ladder* 100bp 1µg/mL Invitrogen™), 8µL de cada amostra amplificada (corada) e os controles negativo e positivo.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose na concentração de 1,5% utilizando-se tampão TBE 1X, com voltagem de 90V por cerca de 1 hora.

Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio. A visualização foi realizada em um transluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera digital.

4.8 Análise dos resultados

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e Tabelas de frequência, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados qualitativos, e média e desvio-padrão para os dados quantitativos.

Na comparação da média de idade em relação às demais variáveis foi utilizada a estatística de t de *Student*, pois a mesma apresentava distribuição normal ($p > 0,05$) por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Na análise dos dados categorizados foi utilizado o teste do qui-quadrado de *Pearson* (VIEIRA, 2004; ARANGO, 2001).

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info versão 3.5.1 para Windows, que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5%.

5. RESULTADOS

Foram analisadas 94 amostras de sangue/soro de crianças de 0 a 10 anos suspeitas de dengue no Município de Manaus/Am durante o ano de 2008, encaminhadas ao LACEN-AM para diagnóstico viral. Ao todo, foram 361 amostras para diagnóstico viral, das quais 207 amostras pertenciam à faixa etária estudada. Onze amostras não continham na ficha de encaminhamento a idade do paciente.

Das 94 amostras analisadas pelo estudo, dezesseis (17,0%) foram positivas para dengue, sendo que 78/94 amostras foram negativas (83,0%).

Dentre as amostras positivas, quinze (93,8%) foram diagnosticadas em amostras de sangue total coletadas sem EDTA. Somente uma amostra foi de soro.

O DENV-3 foi o único sorotipo viral do dengue encontrado neste estudo, conforme visualizado na Figura 8 Abaixo:

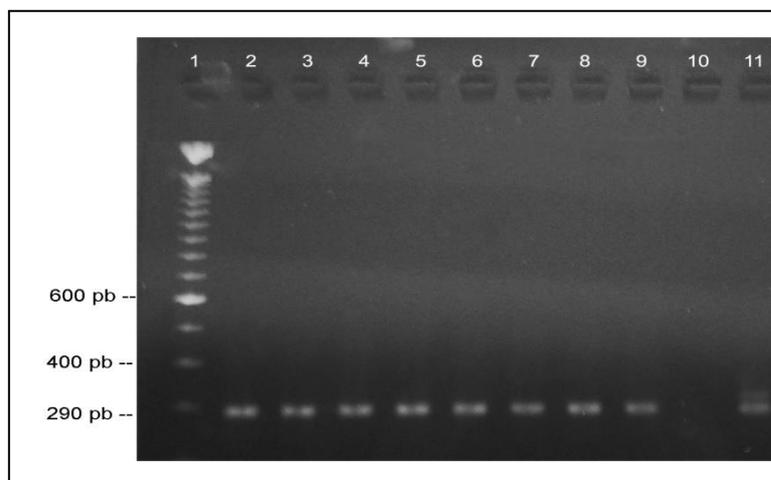


Figura 8 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% de *Nested*-PCR para dengue. Canal 1: marcador de pM=100pb; canais 2 a 9: amostras (positivas para DENV-3, pM=290pb); canal 10: controle negativo; canal 11: controle positivo DENV-3.

Entre as amostras de crianças analisadas 48,9% foram do sexo feminino e 51,1% foram do sexo masculino (Tabela 2).

Tabela 2

Distribuição segundo a frequência do sexo e idade das crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS durante o ano de 2008, Manaus-AM.

<i>Variáveis</i>	<i>f_i</i>	<i>%</i>
Sexo		
Masculino	46	48,9
Feminino	48	51,1
Idade		
0 a 2	18	19,1
3 a 5	27	28,7
6 a 8	24	25,5
9 a 10	25	26,6
Média ± Dp	5,6 ± 3,1	

Dp = Desvio-padrão.

Dentre os casos positivos, 62,5% foram do sexo masculino e 37,5% do sexo feminino. Na Tabela 3 pode-se visualizar a distribuição dos casos positivos e negativos dentre as amostras investigadas, segundo o sexo. Pôde-se verificar que a dengue foi mais frequente entre os meninos (20,8%) que entre as meninas (13,0%), com uma razão de 1,6 vezes maior entre os meninos. No entanto, não foi encontrada associação estatisticamente significativa do resultado do RT-PCR positivo em relação ao sexo ($p = 0,315$).

Tabela 3

Distribuição segundo o resultado da RT-PCR para dengue em crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS durante o ano de 2008, segundo o sexo, Manaus-AM.

Sexo	<i>Resultado do RT-PCR</i>				<i>Total</i>	
	<i>Positivo</i>		<i>Negativo</i>			
	<i>f_i</i>	<i>%</i>	<i>f_i</i>	<i>%</i>	<i>f_i</i>	<i>%</i>
Feminino	6	13,0	40	87,0	46	48,9
Masculino	10	20,8	38	79,2	48	51,1
Total	16	17,0	78	83,0	94	100,0

$\chi^2 = 1,01$; $p = 0,315$.

Quanto à idade das crianças estudadas, a média etária ficou em 5,6 anos ($Dp \pm 3,1$ anos). A média e o desvio-padrão da idade das crianças com RT-PCR positivo e negativo foram, respectivamente, $6,4 \pm 3,2$ e $5,5 \pm 2,7$. No entanto, não foi constatada diferença estatística ($p = 0,289$) ao nível de 5% (Figura 9). O mesmo ocorreu na comparação da idade em relação ao sexo ($p = 0,433$), como pode ser observado na Figura 10.

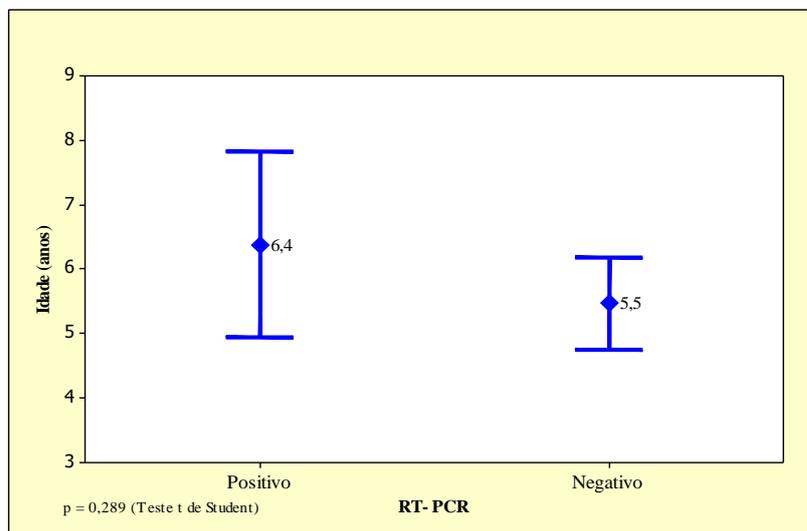


Figura 9 - Distribuição segundo a média de idade e o intervalo de confiança das amostras positivas na RT-PCR para dengue, segundo o RT - PCR, Manaus-AM, 2008.

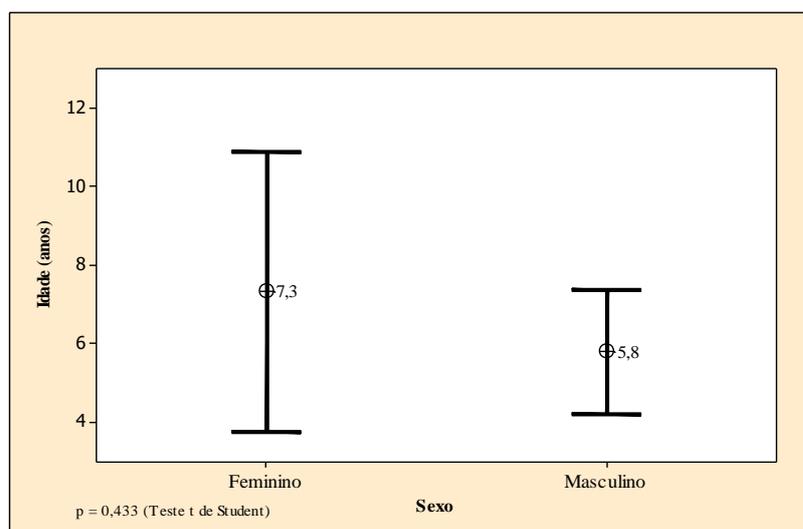


Figura 10. Distribuição segundo a média de idade e o intervalo de confiança das amostras positivas na RT-PCR para dengue, segundo o sexo, Manaus-AM, 2008.

Quanto à distribuição temporal da casuística durante o período do estudo, 88,3% das amostras foram representativas do primeiro trimestre de 2008, sendo que os meses de junho, julho, agosto e dezembro não apresentaram amostras, ou seja, não houve investigação laboratorial virológica em crianças suspeitas de dengue em Manaus nos respectivos meses (Tabela 4).

Tabela 4

Distribuição mensal da casuística e resultados positivos em crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS, Manaus-AM, 2008.

<i>Mês</i>	<i>f_i/n</i>	<i>%</i>
Janeiro	4/26	15,4
Fevereiro	10/44	22,7
Março	2/13	15,4
Abril	-/3	-
Maiο	-/5	-
Junho	-	-
Julho	-	-
Agosto	-	-
Setembro	-/1	-
Outubro	-/1	-
Novembro	-/1	-
Dezembro	-	-
Total	16/94	17,0

f_i= frequência de casos positivos.

Na Figura 9 tem-se a distribuição dos casos positivos por unidade de notificação do caso suspeito de dengue, ou seja, por procedência da amostra. As unidades notificantes que enviaram amostras de crianças com suspeita de dengue para o LACEN-AM/FVS durante o ano de 2008, foram, em ordem decrescente: Pronto Socorro da Criança Zona Sul (44,7%),

Pronto Socorro da Criança Zona Oeste (30,9%), Pronto Socorro da Criança Zona Leste (17,0%), Pronto Socorro Infantil da UNIMED (3,2%) e Distrito de Saúde Leste (1,1%).

Considerando-se somente as amostras positivas, o PSC da Zona Oeste totalizou 43,8% dos casos identificados pelo RT-PCR. Em segundo ficou o PSC da Zona Sul com 31,3% de positividade e em terceiro o PSC da Zona Leste com 18,8% dos casos positivos. 6,2% dos casos positivos foram advindos do PSI da UNIMED-Manaus (Figura 11).

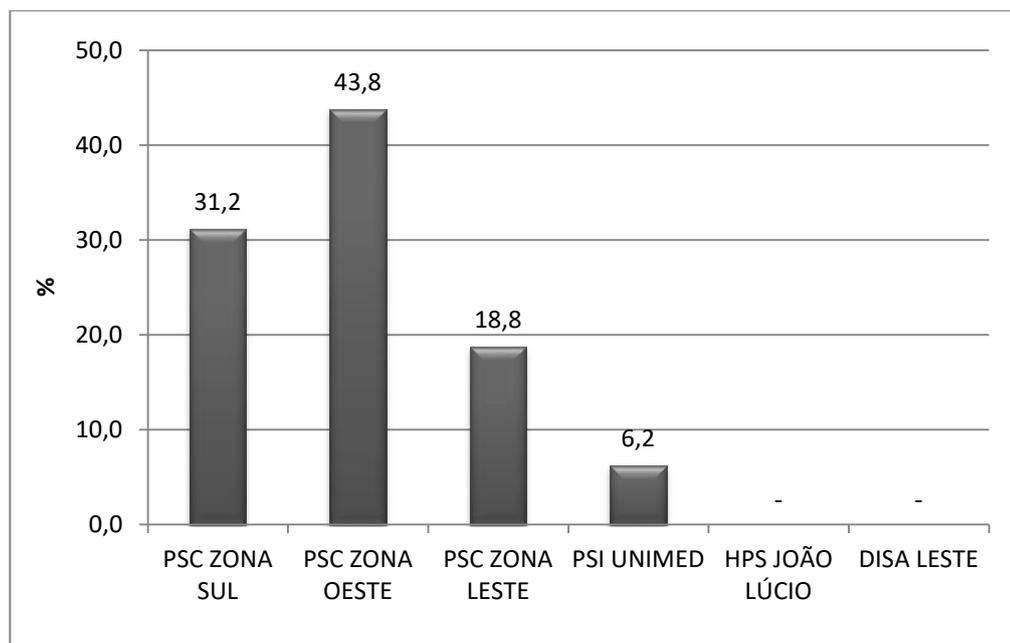


Figura 11 - Distribuição da frequência de amostras positivas para dengue em crianças de 0 a 10 anos encaminhadas ao LACEN-AM/FVS por unidade de procedência, Manaus-Am, 2008.

Quanto aos dias de doença, que correspondem aos dias entre a data do início dos sintomas e data da coleta da amostra de sangue da criança, entre as amostras positivas a média foi de 2,8 dias, com desvio padrão de $\pm 0,98$ dias. Nenhuma amostra coletada no 5º dia de doença foi positiva para dengue.

Setenta e cinco por cento (75,0%) das amostras positivas para o DENV-3 foram coletadas até o 3º dia de doença. A proporção de casos positivos foi crescente do 1º ao 3º dia, conforme pode ser visualizado na Figura 12. O 4º dia apresentou a segunda maior proporção

de casos positivos (25,0%).

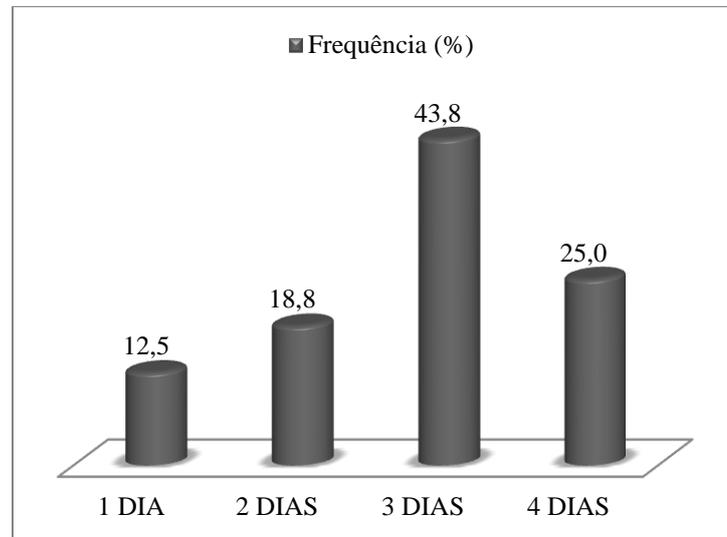


Figura 12 - Distribuição dos casos positivos de dengue entre as crianças de 0 a 10 anos atendidas no LACEN-AM/FVS, segundo dias de doença. Manaus-AM, 2008.

Nas Figuras 13 e 14 pode-se observar a distribuição espacial dos casos positivos para DENV-3 por bairros e zonas da cidade de Manaus. O bairro Alvorada foi responsável pelo maior número de crianças diagnosticadas no estudo por DENV-3, com 18,8% dos casos. Os bairros Compensa e São José Operário apresentaram 12,5% dos casos, cada um. Juntos, estes três bairros somaram 43,8% dos casos. Não foi possível identificar o endereço de uma criança do estudo (6,5%). Outros bairros que também apresentaram crianças com dengue foram: Lírio do Vale, Cachoeirinha, Cidade Nova, Educandos, Centro, Parque 10 de Novembro e Aparecida, conforme ilustrado a seguir.

Todas as zonas do município de Manaus apresentaram crianças positivas nesse estudo. A Zona Sul foi responsável pelo maior número de casos, alcançando 25,0%. As zonas Oeste e Centro-Oeste foram responsáveis por 18,8% dos casos, cada uma. Juntas, estas três zonas somaram 62,5% dos casos, conforme pode ser visto na Figura 14. As zonas Centro-Sul e Norte mostraram os menores índices, com 6,3% dos casos, isoladamente.

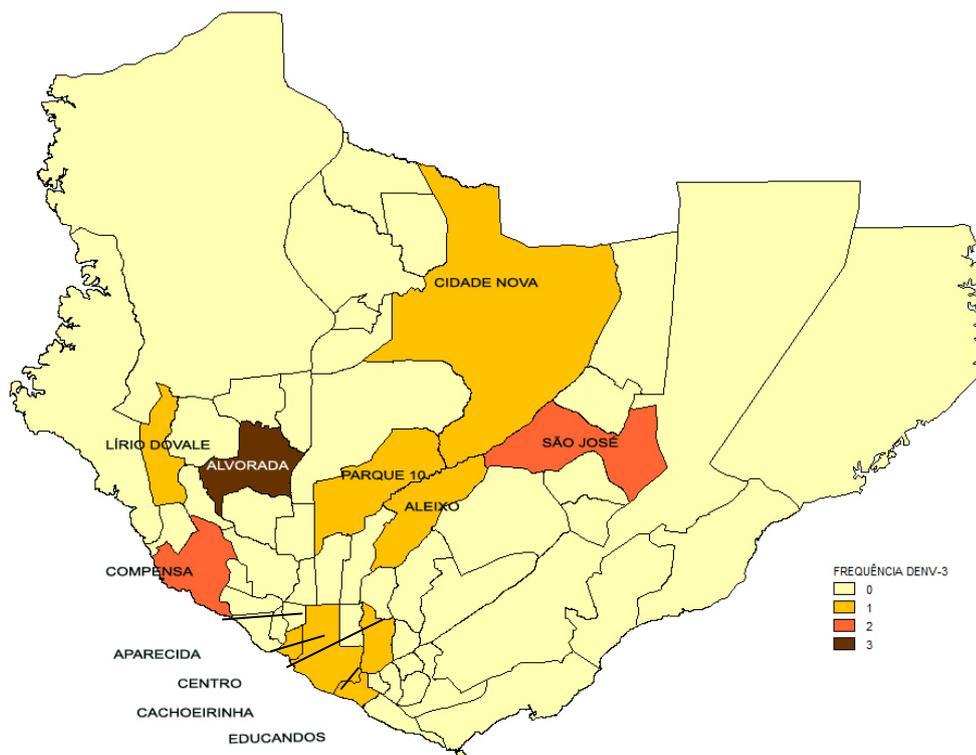


Figura 13 - Distribuição espacial do DENV-3 no município de Manaus/AM, em crianças de 0 a 10 anos, segundo bairro de residência.

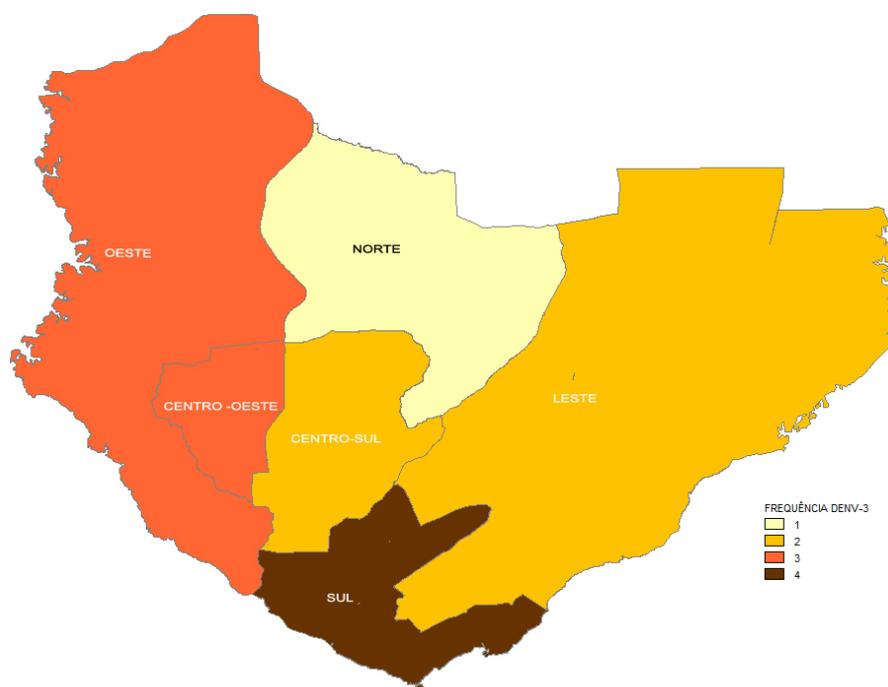


Figura 14. Distribuição espacial do DENV-3 no município de Manaus/AM, em crianças de 0 a 10 anos, segundo zona de residência.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas 94 amostras de crianças encaminhadas ao LACEN-AM/FVS durante o ano de 2008, onde se verificou uma prevalência de 17,0% para o DENV, todos pertencentes ao sorotipo DENV-3.

Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASILa, 2010), em 2008 o Estado do Amazonas notificou 11.281 casos suspeitos de dengue; com incidência de 337,6 casos por 100.000 habitantes e uma concentração de 81% dos casos em Manaus. Foram confirmados 171 casos de FHD, com seis óbitos. O principal sorotipo circulante foi o DENV-3, detectado em 96,6% das amostras com isolamento, confirmando os achados deste estudo.

O DENV-3 introduzido no continente tem sido associado com epidemias de FHD/SCD, principalmente no Sri Lanka e Índia e, com casos de mortes no México e países centro-americanos (NOGUEIRA et al., 2007).

Esse sorotipo vem ocorrendo no país desde a sua entrada em 2000 e encontra-se disperso em todo o país. Em Manaus, durante o ano de 2002 o DENV-3 foi isolado pela primeira vez e ocasionou uma epidemia no primeiro quadrimestre de 2008 (BRASILb, 2009). Após a introdução do DENV-3, os estudos mostram que este sorotipo costuma desbancar os outros sorotipos quando introduzido pela primeira vez na área, mostrando sua alta capacidade de infecção tanto em seres humanos quanto em vetores. Estes dados, no entanto, necessitam de uma avaliação mais cuidadosa e comparação com dados epidemiológicos de outros países na Região das Américas (NOGUEIRA et al., 2007).

Quanto ao reconhecimento das variantes genéticas que o DENV-3 vem apresentando no Brasil, algumas cepas pertencentes às epidemias de 2000 a 2003 no Rio de Janeiro foram isoladas e genotipadas e mostraram-se correspondentes ao genótipo III, característica do subcontinente indiano (NOGUEIRA et al., 2007).

Alguns estudos investigaram os sorotipos virais da dengue em mosquitos do gênero *Aedes* no perímetro urbano de Manaus, através da RT-PCR, com o intuito de se conhecer o nível de infestação e disseminação deste vetor na capital do Amazonas. Pinheiro et al. (2005) verificou uma prevalência de 17,1% para o DENV-3, único sorotipo isolado no estudo. A análise filogenética desse sorotipo mostrou serem pertencentes ao genótipo III, que são representados pelos vírus do Sudeste Asiático, similar ao encontrado no Rio de Janeiro anteriormente.

Santos (2008) analisou *pools* de mosquitos durante o período de dezembro/2005 a dezembro/2006. Houve uma positividade de 80% nos pools de *A. aegypti* e 60% nos pools de *Aedes albopictus*, ambos para o sorotipo DENV-3. Esse elevado percentual de infecção pelo DENV-3 demonstrou uma importante circulação desse sorotipo na cidade de Manaus em populações naturais de mosquitos adultos no período do estudo, inclusive prevendo o risco da população manauense de sofrer epidemias ocasionadas por este sorotipo nos anos subsequentes ao estudo, o que pôde ser constatado na epidemia de 2008.

Somente um estudo, realizados por Rocha e Tauil (2009), abordou características clínico-epidemiológicas da dengue em crianças no município de Manaus, onde se estudou casos de dengue autóctone em crianças menores de 15 anos, no período de 2006 e 2007. Neste estudo também se relatou prevalência do DENV-3 sobre os demais sorotipos.

Apesar de um estudo recente reportar a circulação do DENV-4 em Manaus (FIGUEIREDO et al., 2008), neste estudo não foi detectado este sorotipo. Houve prevalência do DENV-3, o que não significa que os outros sorotipos não estivessem presentes, apenas que não foram detectados, visto o tamanho limitado da casuística frente ao universo de estudo (todos os habitantes de Manaus).

Também é sabido que o sorotipo DENV-1 não costuma provocar dengue sintomática, pois segundo Schatzmayr (2000), durante a primeira epidemia causada pelo DENV-1 no país,

houve cerca de 40% de infecções silenciosas nas populações afetadas, confirmando dados obtidos em outros países.

Considerando o homem como principal hospedeiro no ciclo de transmissão urbano do vírus dengue, a detecção apenas do DENV-3 sugere que a maior parte da população de Manaus está imune aos vírus DENV-1 e DENV-2. Uma vez que esses sorotipos já circularam na cidade em anos anteriores ao estudo, provocando duas principais epidemias em 1998-1999 e 2000-2001, e parte da população se infectou e desenvolveu anticorpos contra os mesmos. Com a introdução do DENV-3 em 2002 na cidade de Manaus, a população se encontrava imunologicamente susceptível a este sorotipo, facilitando sua dispersão e infecção em humanos.

De fato, experimentos anteriores mostraram que quando um novo sorotipo é introduzido em uma comunidade, ocorre uma diminuição natural da circulação de outros sorotipos pré-existentes (WHO, 1997; RIGAU-PEREZ et al., 2006).

Neste estudo a dengue foi mais prevalente em meninos (62,5%) que em meninas (37,5%), apesar da proporção praticamente igual de meninos e meninas no estudo. A razão de chances de adoecer de dengue foi 1,6 vezes maior entre os meninos, embora não tenha ocorrido significância estatística de dengue em relação ao sexo.

Há estudos que demonstram maiores incidências de dengue em mulheres quando comparadas às incidências entre os homens (RIBEIRO et al., 2006; VASCONCELOS, 1993), outros indicam transmissão similar entre os sexos (GONÇALVES NETO; REBÊLO, 2004).

Não houve diferença entre os gêneros nesse estudo, coincidente com os achados de Rocha e Tauil (2009), também realizado em Manaus, embora estudos voltados para a faixa etária infantil ainda sejam escassos no Brasil e principalmente no Amazonas.

No Vietnã, Hung et al.(2005), não encontraram diferença entre os sexos, em crianças menores de 1 ano. Na Nicarágua, a razão de prevalência entre os sexos foi de 1:1 em crianças

(HAMMOND et al., 2005).

Salgado et al. (2007) estudaram crianças menores de 13 anos internadas com suspeita de dengue na Colômbia (Neiva), no qual a doença foi mais frequente em meninas menores de 10 anos e em meninos maiores de 10 anos, sem entretanto haver diferença de gênero. Na distribuição por idade, 67% dos pacientes foram menores de 5 anos, com um número importante de lactentes (20%).

Em algumas partes do mundo, a dengue é o principal problema de saúde pública pediátrica (KABILAN et al., 2003). A OMS considera aceitável uma letalidade de FHD de até 1%. Rocha e Tauil (2009) observaram que a letalidade de FHD e SCD em Manaus, nos menores de 15 anos encontrava-se acima do aceitável apesar de ter havido uma redução do ano de 2006 (12,5%) para o ano de 2007 (4,6%). Em 2009, houve diminuição significativa, passando a 0,9% (BRASILa, 2010)

As características epidemiológicas da dengue no Brasil, segundo Halstead (2006) diferiam daquelas encontradas no Sudeste da Ásia, pois a incidência da FD e da FHD era maior em adultos (TEIXEIRA et al., 2005), enquanto no Sudeste Asiático a FHD é predominante em crianças. Siqueira et al. (2005) num estudo para identificar padrões epidemiológicos da dengue no Brasil (1981 a 2002), reportaram que aproximadamente 50% de todos os casos de dengue ocorreram na faixa etária entre 20 a 49 anos

Teixeira et al. (2008), no entanto, descreveram uma mudança recente nos padrões etários para a ocorrência de FHD no Brasil, num estudo retrospectivo da dengue no Brasil de janeiro de 1998 até dezembro de 2007. O mesmo comportamento foi observado por Rocha; Tauil (2009) na cidade de Manaus em 2006/2007.

Em 2008 foram notificados 806.306 casos e novas epidemias causadas pelo sorotipo DENV-2 ocorreram em diversos estados do país, marcando o pior cenário da doença no Brasil, em relação ao total de internações e óbitos até o momento (BRASILa, 2009). 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. No ano de 2009, foram notificados no Amazonas 2.680 casos de dengue, o que representa um declínio de 76%, em relação ao período de 2008 (BRASILa, 2010).

Segundo Gonçalves Neto e Rebêlo (2004), essa mudança de padrão pode ser explicada pelo próprio processo de instalação da endemização da doença, visto que a maior incidência da doença em faixas etárias mais elevadas é um padrão observado em áreas indenes logo após a introdução de um novo sorotipo do vírus. Considerando que em Manaus circulam os três sorotipos e já se tem consolidado o processo de endemização da doença, é esperado que faixas etárias mais jovens sejam mais afetadas. Este comportamento também já foi descrito em outras partes do mundo. Na Ásia, países como Tailândia, Filipinas e Malásia, onde as epidemias ocorrem desde 1954 e existe uma co-circulação viral dos quatro sorotipos de dengue, as crianças manifestam principalmente as formas mais graves e não usuais da doença (CAMPAGNA et al., 2006).

O deslocamento para faixas etárias mais jovens também assinala a gravidade da situação, pois as crianças são mais susceptíveis ao extravasamento plasmático por apresentarem permeabilidade vascular aumentada (HALSTEAD, 2006). A alta endemicidade e a co-circulação dos três sorotipos no país (SIMONE et al., 2004) mostram um importante fator de risco para o desenvolvimento de FHD e SCD por causa da introdução de novos genótipos virulentos .

Neste Estudo não houve casos positivos em menores de 1 ano (lactentes), apesar de em Manaus, a dengue também acometer essa faixa etária. Também não foi possível

identificar nenhum caso de transmissão vertical, apesar desta forma de transmissão ser conhecida em vários países.

Maroun et al. (2008) relatam caso de transmissão vertical de dengue em recém-nascido do sexo feminino, com peso dentro da normalidade, admitida na unidade de terapia intensiva neonatal com *rash* cutâneo, hipoatividade e febre no quinto dia de vida. O hemograma evidenciava plaquetopenia importante (38.000 plaquetas). A mãe apresentou quadro clínico compatível com dengue três dias antes do parto. Foram detectados anticorpos IgM para dengue tanto na mãe, quanto no recém-nascido. Foi detectado DENV-2 no recém-nascido através da RT-PCR.

González et al. (2001) também relatam o caso de um neonato a termo, filho de uma mãe portadora de FHD, que aos 3 dias de vida apresentou sinais de sepse complicada com alterações hemorrágicas. A enfermidade foi confirmada pela presença de anticorpos IgM no soro do bebê, porém não se identificou o sorotipo viral.

Há casos em que a criança desenvolve febre mais cedo, como o descrito por Petdachai et al. (2004), onde o neonato desenvolveu febre 16 horas após o nascimento. Havia sinais como petéquias, no rosto e tronco, e hepatomegalia. Não houve sinais de extravasamento plasmático ou hemorragia grave. Leucopenia e trombocitopenia estavam presentes na mãe e bebê. Ambos foram diagnosticados como dengue. O DENV-1 foi identificado.

Desde que o *A. aegypti* tornou-se altamente domesticado e alimenta-se durante todo o dia, as crianças são expostas ao vetor por um longo período de tempo. Iturrino-Monge et al. (2006), verificou em estudo na Costa Rica que as crianças com mais de 6 anos apresentaram maior positividade para dengue. Justamente a idade em que começam a vivência escolar.

No presente estudo a maior parte das crianças encontravam-se em idade escolar, salientando a importância de se desenvolver campanhas de erradicação do vetor nas escolas também.

Segundo Iturrino-monge et al. (2006), as crianças, na maioria das vezes, estudam em escolas públicas e ficam longe de casa pelo menos, metade do dia. Seus pais podem ter a preocupação de manter a área da residência livre do vetor, adotando medidas que anulem os criadouros do *A. aegypti*. Porém, é importante se considerar a área onde a escola está construída, pois muitas delas estão localizadas em áreas governamentais que tendem a ser menos bem cuidadas que os lares dessas crianças. Potenciais fontes e criadouros de mosquitos não são difíceis de encontrar nessas áreas e suas redondezas. Isso ressalta a importância de concentrar programas de controle vetorial em áreas onde as crianças passam mais tempo.

Todos os casos positivos desse estudo ocorreram no primeiro trimestre de 2008 (100,0%), com predomínio na estação chuvosa (janeiro a abril), coincidindo com a epidemia ocorrida em Manaus nesse mesmo período. Num estudo retrospectivo da dengue em Manaus, de 2002 a 2006 (AMARAL; NASCIMENTO, 2009), a dengue apresentou caráter sazonal, com maior incidência nos meses de janeiro a abril, confirmando os achados deste estudo.

Desde a primeira epidemia em Manaus, a dengue vem se comportando de forma endêmica, com aumento de incidência no período das chuvas, que geralmente ocorre entre janeiro e julho, com os três sorotipos circulantes (ROCHA; TAUIL, 2009). Apesar de ocorrer mais no início do ano, torna-se imprescindível manter continuamente as vigilâncias entomológica, epidemiológica e laboratorial com adoção de medidas de prevenção e controle da doença durante o ano todo, visto que o vetor encontra-se sempre competente para transmitir qualquer sorotipo e desencadear, a qualquer momento, mais uma epidemia sempre que encontrar uma população susceptível.

Não houve nenhum caso positivo no período da seca e no período transicional (outubro-novembro), justamente porque apenas 3,2% da casuística deste estudo concentraram-se nestes períodos. Em 2008, a demanda foi quase nula no período seco e/ou transicional entre as crianças de 0 a 10 anos, no LACEN-AM/FVS.

É natural que essa redução de casos ocorra, visto que na estação seca diminui a disponibilidade de criadouros naturais e artificiais, desfavorecendo o vetor. Coelho et al. (2008) e Coutinho et al. (2006) relatam que em algumas áreas subtropicais, a densidade do mosquito e o número de casos começam a aumentar em número sempre com o início da estação chuvosa (outubro) alcançando um pico cerca de 3 meses mais tarde.

Mesmo na estação seca, os ovos do vetor conseguem se manter até a próxima chuva. Segundo Ríos-Velasquez et al. (2007), no período de transição ocorre um aumento significativo dos vetores *A. aegypti* e *A. albopictus*, pois a baixa precipitação é suficiente para manter o habitat e garantir a eclosão dos ovos acumulados durante a estação seca. Embora o maior número de casos em Manaus ocorra na estação chuvosa, um número considerável de casos tem sido notificado nas estações seca e transicional, que demonstra uma transmissão endêmica ocorrendo durante todo o ano.

Neste estudo não foi possível verificar o tipo de infecção nas crianças, pois não foi feita a sorologia para se especificar se era dengue primária ou secundária, e assim poder comparar o grau de resolução do PCR nestas duas entidades clínicas. Porém a literatura relata que na infecção primária ela costuma ser mais prolongada quando comparada com infecção secundária, 5,1 dias versus 4,4 dias, respectivamente. E a viremia costuma durar em média 4,4 dias, variando num espectro de 1 a 7 dias (VAUNGH et al., 2002).

Quanto aos dias de doença, o presente estudo verificou que a média para o diagnóstico para a RT-PCR para dengue foi de 2,8 dias e nenhuma amostra do 5º dia de doença foi positiva para dengue. A maioria das amostras positivas foram coletadas até o 3º dia de doença, sugerindo que a viremia decresce com o passar do tempo, justamente quando os anticorpos começam a ser produzidos.

Sa-NGasang et al. (2003) num estudo em crianças hospitalizadas num hospital pediátrico na Tailândia em 2002, avaliando o grau de resolução da RT-PCR na dengue

secundária, identificou mais o vírus dengue em amostras coletadas até o 5º dia após o início da febre. No entanto foi possível detectar o vírus até o 8º dia.

Nolasco et al. (1997) num estudo de avaliação do RT-PCR em um surto epidêmico na costa norte peruana, verificaram que os soros coletados a partir do 4º dia de doença não apresentaram resultado positivo.

No Brasil, o uso do RT-PCR para o monitoramento da circulação dos sorotipos virais como ferramenta diagnóstica é recente e ainda pouco utilizada pelos serviços de saúde responsáveis pelo diagnóstico. Klungthong et al. (2007) afirmam que o RT-PCR é capaz de detectar precocemente a doença, inclusive estendendo a janela de detecção do vírus para até 9 dias, quando se utiliza o sangue total. Esse aspecto não pôde ser verificado no presente estudo porque só foram incluídas amostras até o 5º dia de doença.

Onze bairros da cidade de Manaus apresentaram casos positivos nesse estudo: Alvorada, Compensa, São José Operário, Lírio do Vale, Cachoeirinha, Cidade Nova, Educandos, Centro, Parque 10 de Novembro e Aparecida. Rocha e Taulil (2009) descrevem que os bairros mais atingidos por dengue em crianças na cidade de Manaus, em 2006-2007, foram em ordem decrescente: Cidade Nova, Petrópolis, Japiim, Jorge Teixeira, Alvorada e Compensa.

Todas as zonas do município de Manaus apresentaram crianças positivas nesse estudo, sendo que as Zonas Sul, Oeste e Centro-Oeste apresentaram a maioria dos casos.

A mesma prevalência foi verificada por Santos (2008), que detectou mosquitos *A. aegypti* infectados com DENV-3 na cidade de Manaus, onde a positividade foi maior nas zonas Centro-Oeste (70%), Sul (60%) e Oeste (53%) e menor nas zonas Norte (30%) e Leste (23%). Assim, todas as zonas foram proporcionalmente semelhantes aos achados virológicos do presente estudo, sugerindo que zonas mais infestadas por mosquitos infectados são mais favoráveis a apresentar maior número de casos.

Manaus, como um todo, possui todas as condições ecológicas para o desenvolvimento do mosquito vetor *A. aegypti*. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 1995), entre os fatores macro determinantes do dengue, destacam-se a densidade populacional moderada ou alta; padrões de assentamento inadequados; habitações com ausência de água encanada e com recipientes para armazenamento inadequadamente vedado; coleta de lixo deficiente, propiciando acúmulo de recipiente descartável e, finalmente, precárias condições socioeconômicas. Esses bairros possuem pelo menos um desses fatores que, associado aos fatores climáticos da região amazônica, favorecem a proliferação do vetor.

No presente estudo 83,0% das crianças analisadas apresentaram resultado negativo para dengue através do RT-PCR sugerindo a ocorrência de outras doenças febris que necessitam ser esclarecidas. Assim, tornam-se necessários estudos mais aprofundados a cerca das arboviroses e outras doenças exantemáticas, cujos sintomas se confundem com a dengue, a fim de se conhecer e estabelecer o real perfil de doenças exantemáticas ocorrentes em Manaus, principalmente no que concerne à atividade viral.

A infecção viral do dengue resulta em uma gama de sintomas que podem ser confundidos com os de muitas outras doenças exantemáticas (FIGUEIREDO et al., 2004). Num estudo realizado durante a primeira epidemia de dengue no Amazonas em 1998-1999, Figueiredo et al. (2004) detectou 40% dos casos investigados como positivos para dengue. Os pesquisadores identificaram alguns casos soronegativos registrados durante a epidemia de dengue em Manaus, como mayaro, oropouche, rubéola, sarampo e parvovírus.

A dengue é frequente entre as doenças febris na infância, com prevalência variando de acordo com a situação epidemiológica de cada região e a clínica da criança com dengue é muito semelhante à das crianças com outras doenças inespecíficas.

Rodrigues et al. (2005), ao tentar identificar as características clínicas indicativas de dengue e avaliar a aplicabilidade, na criança (1 a 12 anos), do critério de caso suspeito do

Ministério da Saúde, a sensibilidade do critério de caso suspeito de dengue foi de apenas 50,8%, e valor preditivo positivo de 62,5%. Esses valores foram maiores nos escolares e nos períodos de maior incidência da dengue. Assim, os critérios de caso suspeito elaborados pelo Ministério da Saúde mostraram-se de pouca utilidade em estudo realizado em crianças, principalmente nas menores e em período de menor incidência.

Segundo Cordeiro et al. (2009), a falta de instrumentos adequados para prever se um paciente infectado com o vírus da dengue vai avançar com a forma benigna da doença ou com risco de vida, tem originado um grande número de internações desnecessárias e dispendiosas. E por conseguinte, a diferenciação primária de infecção secundária pode ser de grande valor prognóstico para pacientes com dengue, principalmente crianças e idosos, nos quais uma infecção secundária de dengue é mais provável resultar em FHD.

Apesar da importância da dengue como um sério problema de saúde pública no país, somente poucos casos de vírus isolados de regiões endêmicas têm sido analisados com o intuito de se conhecer a variabilidade genômica. Segundo Pires Neto et al. (2005), esse monitoramento deveria ser contínuo com a finalidade de determinar a relação evolucionária entre eles e a introdução e circulação de novos genótipos que poderiam estar associados com os casos mais severos da dengue.

O conhecimento dos sorotipos circulantes numa localidade é fundamental, pois sabe-se que alguns vírus causam manifestações clínicas mais severas, fato observado mais comumente em locais com circulação simultânea de diferentes sorotipos.

Segundo Passos et al. (2004), indivíduos acometidos pelo DENV-3 apresentam sintomatologia mais grave, apresentando chance 6,07 vezes maior de apresentar choque em relação aos indivíduos infectados com DENV-2, sugerindo maior virulência deste sorotipo.

A emergência de casos de FHD e a continuidade de casos reportados de dengue no Amazonas e em todo país, reforça a importância dos métodos laboratoriais para a

caracterização definitiva da infecção dengue. A implementação no Brasil do diagnóstico molecular no sistema público poderia ser uma alternativa para tornar rápido o diagnóstico, pois a vigilância virológica e sorológica juntamente com medidas adotadas pelo Programa de Erradicação do *A.aegypti* são ferramentas muito importantes para alcançar o controle da dengue no país.

7. CONCLUSÃO

7.1 A prevalência do DENV entre as crianças foi de 17,0% e a maior parte das crianças sintomáticas suspeitas apresentaram resultado negativo para identificação viral, sugerindo a ocorrência de outras doenças febris que necessitam ser esclarecidas.

7.2 O sorotipo DENV-3 foi prevalente no período do estudo.

7.3 A média de idade para as crianças com resultado positivo foi de 6,4 anos e para as negativas de 5,5 anos, sem diferença estatística significativa.

7.4 A dengue foi mais frequente entre os meninos (20,8%) que entre as meninas (13,0%), sem, no entanto, haver associação estatisticamente significativa de casos positivos em relação ao sexo.

7.5 A dengue grassou no primeiro trimestre de 2008, coincidindo com o período chuvoso.

7.6 Os Pronto Socorros das Zonas Oeste e Sul foram as unidades de procedência com maior número de casos positivos.

7.7 A média dos dias de doença, coincidente com o período de viremia, foi de 2,8 dias para o diagnóstico molecular, sendo que o pico do diagnóstico nas crianças ocorreu no 3º dia.

7.8 Todas as zonas da cidade de Manaus apresentaram casos positivos de dengue no período do estudo e destacaram-se com os maiores índices os bairros: Alvorada, Compensa e São José Operário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-BAS, C.; GÓMEZ-CORDERO, I. Biología y métodos diagnósticos del dengue. **Rev Biomed**, v. 16, p. 113-137, 2005.

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 376-381, 2002.

AMARAL, A.A.; NASCIMENTO, A. Distribuição espacial dos casos de dengue no município de Manaus-Am, 2002-2006. Anais do XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Recife-PE. v. 42, Supl: I, p. 252, 2009.

ARANGO, Héctor Gustavo. **Bioestatística Teórica e Computacional**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**/Diretoria Técnica de Gestão. 2ª edição, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 6ª edição, Brasília/DF, 2007.

BRASILa. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília/DF, 2009.

BRASILb. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009. **Informe Epidemiológico da Dengue Janeiro a Novembro de 2008**. Disponível em: <http://www.combateadengue.com.br/wp-content/uploads/2009/02/boletim-janeiro-novembro-2008.pdf>. Acesso em 27/12/2009.

BRASILa. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Epidemiológico da Dengue: Semanas de 1 a 52 de 2009**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf. Acesso em 18/03/2010.

BRASILb. Ministério da Saúde. **LIRAA-Amazonas**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=33535&janela=1. Acesso em 14/03/2010.

BRASILc. Ministério da Saúde. **Dengue: Informações técnicas**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31125. Acesso em 18/03/2010.

CÂMARA, F.P.; THEOPHILO, R.L.G.; SANTOS, G.T.; PEREIRA, S.R.F.G; CÂMARA, D.C.P.; MATOS, R.R.C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características

regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192-196, 2007.

CAMPAGNA, D.S.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIQUEIRA, M.M.; CUNHA, R.V. Etiologia de exantema em crianças em uma área endêmica de dengue. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 354-358, 2006.

CHENG, H.J.; LIN, C.F.; LEI, H.Y.; LIU, H.S.; YEH, T.M.; LUO, Y.H.; LIN, Y.S. Proteomic Analysis of Endothelial Cell Autoantigens Recognized by Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies. **Exp. Biol. Med**, v. 234, n. 1, p. 63-73, 2009.

CODEÇO, C.T.; HONÓRIO, N.A.; RÍOS-VELASQUEZ, C.M.; SANTOS, M.C.A.; MATTOS, I.V.; LUZ, S.B. et al. Seasonal dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the northernmost state of Brazil: a likely port-of-entry for dengue virus 4. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 4, p. 614-620, 2009.

COELHO, G.E.; BURATTINI, M.N.; TEIXEIRA, M.G.; COUTINHO, F.A.B.; MASSAD, E. Dynamics of the 2006/2007 dengue outbreak in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 103, n. 6, p. 535-539, 2008.

CORDEIRO, M.T.; BRAGA-NETO, U.; NOGUEIRA, R.M.R.; MARQUES, E.T.A. Jr. Reliable Classifier to Differentiate Primary and Secondary Acute Dengue Infection Based on IgG ELISA. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. e4945, 2009.

COUTINHO, F.A.B; BURATTINI, M.N.; MASSAD, E. Threshold conditions for a non-autonomous epidemic system describing the population dynamics of dengue. **Bull Math Biology**, v. 68, n. 6, p. 2263-2282, 2006.

CUNHA, R.V.; DIAS, M.; NOGUEIRA, R.M.R.; CHAGAS, N.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SCHATZMAYR, H.G. Secondary dengue infection in a dengue endemic area in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 6, p. 517-521, 1995.

DONALÍSIO, M.R.; GLASSER, C.M. Vigilância entomológica e controle de vetores do Dengue. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

DE MELO, F.L.; ROMANO, C.M.; ZANOTTO, P.M.A. Introduction of Dengue Virus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 4, p. e390, 2009.

DUSSART, P.; LABEAU, B.; LAGATHU, G.; LOUIS, P.; NUNES, M.R.T.; RODRIGUES, S.G.; STORCK-HERRMANN, S.; CESAIRE, R.; MORVAN, J.; FLAMAND, M.; BARIL, L. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1185-1189, 2006.

EPI-INFO, Versão 3.5.1 para Windows. Disponível em <www.cdc.gov/epiinfo> Acesso em 30 dezembro de 2009,

FERREIRA, B.J.; SOUZA, M.F.M.; SOARES FILHO, A.M.; CARVALHO, A. A. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 3, p. 961-972, 2009.

FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue in Brazil: past, present and future perspective. **Dengue Bulletin**, v. 27, p. 25-33, 2003.

FIGUEIREDO, L.T.M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 203-210, 2006.

FIGUEIREDO, L.T.M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 32, p. 15-20, 1999.

FIGUEIREDO, L.T.M.; CARLUCCI, R.H.; DUARTE, G. A prospective study with children whose mothers had dengue during pregnancy. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 36, n.5, p. 417-421, 1994.

FIGUEIREDO, R.M.P.; TATCHER, B.D.; LIMA, M.L.; ALMEIDA, T.C.; ALECRIM, W.D.; GUERRA, M.V.F. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 476-479, 2004.

FIGUEIREDO, R.M.P.; Naveca, F.G.; BASTOS, M.S.; MELO, M.N.; VIANA, S.S.; MOURÃO, M.P.G et al. Dengue vírus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.

GONÇALVES NETO, V.S.; REBÊLO, J.M.M. Aspectos epidemiológicos do dengue no município de São Luiz, Maranhão, Brasil, 1997-2002. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 20, n. 5, p. 1424-1431, 2004.

GONZÁLEZ, G.; GUERRA, A.; MALAVÉ, L.; PÉREZ, P. Dengue neonatal: a propósito de un caso/Neonatal dengue: a porpose of the case. **Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría**, v. 64, n. 4, p. 219-222, 2001.

GUBLER, J.D. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUZMÁN, M.G.; KOURÍ G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 621-627, 1996.

GUZMÁN, M.G.; KOURÍ G. Dengue: un update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

HALSTEAD, S.B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **Rapp. Trimest. Statist. Sanit. Mond**, v. 45, p. 292-298, 1992.

HALSTEAD, S.B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? **Rev Panam Salud Publica**, v. 20, n. 6, p. 407-415, 2006.

HAMMOND, S.; BALMASEDA, A.; PÉREZ, L.; TELLEZ, Y.; SABORÍO, S.I.; MERCADO, J.C. et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 6, p. 1063-1070, 2005.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, Oct. 1990.

HUNG, N.T.; LAN, N.T.; LEI, H.Y.; LIN, Y.S.; LIEN, L.B.; HUANG, K.J. et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 4, p. 370-374, 2005.

ITURRINO-MONGE, R.; AVILA-AGÜERO, M.L.; AVILA-AGÜERO, C.R.; MOYA-MOYA, T.; CAÑAS-COTO, A.; CAMACHO-BADILLA, K.; ZAMBRANO-MORA, B. Seroprevalence of dengue virus antibodies in asymptomatic Costa Rican children, 2002-2003: a pilot study. **Rev Panam Salud Publica**, v. 20, n. 1, p. 39-43, 2006.

KABILAN, L.; BALASUBRAMANIAN, S.; KESHAVA, S.M.; THENMOZHI, V.; SEKAR, G.; TEWARI, S.C. et al. Dengue Disease Spectrum among Infants in the 2001 Dengue Epidemic in Chennai, Tamil Nadu, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3919–3921, 2003.

KLUNGTHONG, C.; GIBBONS, R.V.; HAI SOMBOONSUK, B.; NISALAK, A.; KALAYANAROOJ, S.; THIRAWUTH, V.; NUTKUMHANG, N.; MAMMEN JR, M.P.; JARMAN, R.G. Dengue Virus Detection Using Whole Blood for Reverse Transcriptase PCR and Virus Isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2480-2485, 2007.

LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LIBRATY, D.H.; ACOSTA, L.P.; TALLO, V.; SEGUBRE-MERCADO, E.; BAUTISTA, A.; POTTS, J.A.; JARMAN, R.G.; YOON, I. K.; GIBBONS, R.V.; BRION, J.D.; CAPEDING, R.Z. A Prospective Nested Case-Control Study of Dengue in Infants: Rethinking and Refining the Antibody-Dependent Enhancement Dengue Hemorrhagic Fever Model. **PLoS Med**, v. 6, n. 10, p. e1000171, 2009.

LIBRATY, D.H.; YOUNG, P.R.; PICKERING, D.; ENDY, T.P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; ENNIS, F.A.; ROTHMANA.L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The Journal of infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165-1168, 2002.

LIN, C.F.; CHIU, S.C.; HSIAO, Y.L.; WAN, S.W.; LEI, H.Y.; SHIAU, A.L. et al. Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules during Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein 1. **The Journal of Immunology**, v. 174, p 395-403, 2005.

LUPI, O.; CARNEIRO, C.G.; COELHO, I.C.B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **Anais Brasileiros de Dermatologia Rio de Janeiro**, v. 82, n. 4, p. 291-305, 2007.

MALAVIGE, G.N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D.J.; SENEVIRATNE, S.L. Dengue viral infections. **Postgrad Med J**, v. 80, p. 588-601, 2004.

MAROUN, S.L.C.; MARLIERE, R.C.C.; BARCELLUS R.C.; BARBOSA, C.N.; RAMOS, J.R.M.; MOREIRA, M.E.L. Relato de caso: transmissão vertical de dengue. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 84, n. 6, p. 556-559, 2008.

MIAGOSTOVICH, M.P.; SANTOS, F.B.; ARAÚJO, E.S.M.; DIAS, J.; SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M.R. Diagnosis of dengue by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 595-600, 1997.

MONATH, T.P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 2395-2400, 1994.

NOGUEIRA R.M.R.; ARAUJO, J.M.G.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. **Rev Panam Salud Publica**, v. 22, n. 5, p. 358-363, 2007.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue viruses in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FILIPPIS, A.N.B.; PEREIRA, M.A.S.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Dengue Bulletin**, v. 26, p. 77-83, 2002.

NOLASCO, O.; CARRILLO, C.; GUTIERREZ, V.; YABAR, C.; DOUGLAS, S.; GARCIA, M.; MONTOYA, I. Diagnóstico temprano em um brote epidêmico del vírus dengue em Piura usando RT-PCR y *Nested-PCR*. **Rev. Med. Exp.**, v. 14, n. 2, p. 13-17, 1997.

OPAS. Organización Panamericana de La Salud. **Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control**. Washington DC, 1995.

OSANAI, Carlos Hiroshi et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota prévia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, p. 53-54, 1983.

PAHO. The Pan American Health Organization, 2007: **Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion)**. Disponível em: <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2007.htm>. Acesso em 04/05/2008.

PAHO. Pan American Health Organization, 2008: **Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion)**. <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2008.htm>. Acesso em 14/03/2010.

PASSOS, M.N.P.; SANTOS, L.M.J.G.; PEREIRA, M.R.R.; CASALI, C.G.; FORTES, B.P.M.D, VALENCIA, L.I.O.; ALEXANDRE, A.J.; MEDRONHO, R.A. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 293-295, 2004.

PETDACHAI, W.; SILA'ON, J.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A. Neonatal dengue infection: report of dengue fever in a 1-day-old infant. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 35, n. 2, p.403-407, 2004.

PINHEIRO, V.C.S.; TADEI, W.P. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical S. Paulo**, v. 44, n. 5, p. 245-250, 2002.

PINHEIRO, V.C.S.; TADEI, W.P.; BARROS, P.M.S.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; CRUZ, A.C.R. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), captured in Manaus, Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 100, n. 8, p. 833-839, 2005.

PIRES NETO, R.J.; LIMA, D.M.; PAULA, S.O.; LIMA, C.M.; ROCCO, I.M.; FONSECA, B.A.L. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 6, p. 843-852, 2005.

PONGSUMPUN, P.; YOKSAN, S.; TANG, I.M. A comparison of the age distributions in the dengue hemorrhagic fever epidemics in Santiago de Cuba (1997) and Thailand (1998). **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 33, n. 2, p. 255-258, 2002.

PONTES, R.J.S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Rev. Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

RIBEIRO, A.F.; MARQUES, G.R.A.M.; VOLTOLINI, J.C.; CONDINO, M.L.F. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Rev Saúde Pública São Paulo**, v. 40, n. 4, p. 671-676, 2006.

RIGAU-PÉREZ, J.G. Severe dengue: the need for new case definitions. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 5, p. 297-302, 2006.

RÍOS-VELÁSQUEZ, C.M.; CODEÇO, C.T.; HONÓRIO, N.A.; SABROZA, P.S.; MORESCO, M.; CUNHA, I.C.; LEVINO, A.; TOLEDO, L.M.; LUZ, S.L. Distribution of dengue vectors in neighborhoods with different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 617-623, 2007.

ROCHA, L.A.; TAUIL, P.L. Dengue em crianças: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 1, p. 18-22, 2009.

RODRIGUES M.B.; FREIRE, H.B.; CORRÊA, P.R.; MENDONÇA, M.L.; SILVA, M.R.; FRANÇA, E.B. É possível identificar a dengue em crianças a partir do critério de caso suspeito preconizado pelo Ministério da Saúde? **J Pediatr (Rio J)**, v. 81, n. 3, p. 209-215, 2005.

SALGADO, D.M.; RODRIGUEZ, J.A.; GARZÓN, M.; CIFUENTES, G.; IBARRA, M.; VEGA, M.R.; CASTRO, D. Caracterización clínica y epidemiológica de dengue hemorrágico em Neiva, Colômbia, 2004. **Rev Salud Publica**, v. 9, n. 1, p. 53-63, 2007.

SA-NGASANG, A.; WIBULWATTANAKIJ, S.; CHANAMA, S.; O-RAPINPATIPAT, A.; ANUEGOONPIPAT, A.; ANANTAPREECHA, S. et al. Evaluation of RT-PCR as a tool for Diagnosis of Secondary dengue infection. **Jpn. J. Dis.**, v. 56, p. 205-209, 2003.

SANTOS, Ília Gilmaria Carvalho dos. **Detecção do vírus dengue em mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* capturados na zona urbana da cidade de Manaus, Amazonas.** Manaus: UFAM, 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2008.

SCHATZMAYR, H.G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, suppl. 1, p. 179-181, 2000.

SHU, P.Y.; HUANG, J.H. Current Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 642-650, 2004.

SIMONE, T.S.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, E.S.M.; GUIMARÃES, F.R.; SANTOS, F.B.; SCHATZMAYR, H.G. et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 9, p. 553-562, 2004.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2, p. 22-35, 2007.

SIQUEIRA, J.B.; MARTELLI, C.M.T.; COELHO, G.E.; SIMPLÍCIO, A.C.R.; HATCH, D.L. Dengue and Dengue Hemorrhagic fever, Brasil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48-53, 2005.

TAUIL, P.L. Urbanização e ecologia do dengue. **Caderno de Saúde Pública Rio de Janeiro**, v. 17(suplemento), p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA M.G.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, M.L.; MOTA E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 5, 2005.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; COELHO, C.; BARRETO, M.L. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.14, n.10, p. 1663, 2008.

TORRES, J.R.; CASTRO, J. The health and economic impact of dengue in Latin America. **Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro**, v. 23, n. 1, p. S23-S31, 2007.

TORRES, E.M. Dengue. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, 2008.

VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; FREITAS, R.B.; DÉGALLIER, N.; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaina, Tocantins, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 141-148, 1993.

VAUGHN, D.W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B.L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T.P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A.; NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 2-9, 2000.

VIEIRA, Sonia. **Bioestatística, Tópicos Avançados**. Rio de Janeiro; Elsevier, 2.ed., 2004.

WEAVER, SC, VASILAKIS N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and the epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 523-540, 2009.

WHO. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical

Diseases. **Understanding pathogenesis, immune response and viral factors**. Scientific Working Group, Report on Dengue, 1–5 October 2006, Geneva, Switzerland, 2007.

WHO. World Health Organization. **Dengue Haemorrhagic Fever: diagnosis, treatment, prevention and control**, 2. ed. Geneva: WHO, 1997.

WHO. World Health Organization. **Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever**. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/index.html>. Acesso em 15/09/2009.

YONG, Y.K.; THAYAN, R.; CHONG, H.T.; TAN, C.T.; SEKARAN, S.D. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR Green RT-PCR. **Singapore Med J**, v. 48, n. 7, p.662-669, 2007.

YOUNG, P.R.; HILDITCH, P.A.; 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.**, v. 38, p. 1053-1057, 2000.

ANEXO A

Ficha de solicitação de exames do LACEN-AM/FVS.

FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA		Número do SINAN
		Número do Prontuário
FICHA DE SOLICITAÇÃO DE EXAMES Obs: Ver Instruções de preenchimento no verso.		Data Recebimento:
		____/____/____
I - Identificação do cliente		
1. Nome Completo:		2. Data de nascimento:
		2.1. Idade:
3. Sexo: <input type="checkbox"/> Masc <input type="checkbox"/> Fem	4. Raça/Cor: <input type="checkbox"/> Branc <input type="checkbox"/> Negr <input type="checkbox"/> Asiatic <input type="checkbox"/> Mestiç <input type="checkbox"/> Indigen	5. Estado Civil: <input type="checkbox"/> Solteiro <input type="checkbox"/> Casad <input type="checkbox"/> Viuv <input type="checkbox"/> Outros _____
6. RG:	7. Telefone:	8. Nome da mãe:
9. Endereço:(rua ou avenida/ n°/ bairro/ cidade)		
II – Dados Complementares		
11. Exame de rotina de pré natal: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
12. Comunicante de que doença?		
13. Atividade profissional:		
14. Suspeita Clínica de:		
15. Data dos primeiros sintomas:		
16. Tomou vacina nos últimos 30 dias? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO Antes: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO Qual: _____		
17. Localidade provável onde contraiu a doença:		
18. Presença de Malformação congênita: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
III – Sinais e Sintomas		
<input type="checkbox"/> Amigdalite	<input type="checkbox"/> Anorexia	<input type="checkbox"/> Artralgia
<input type="checkbox"/> Congestão nasal	<input type="checkbox"/> Conjuntivite	<input type="checkbox"/> Coriza
<input type="checkbox"/> Dor retro-órbitária	<input type="checkbox"/> Edema	<input type="checkbox"/> Esplenomegalia
<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Fezes esbranquiçadas	<input type="checkbox"/> Flatulência
<input type="checkbox"/> Laringite	<input type="checkbox"/> Lombalgia	<input type="checkbox"/> Mialgia
<input type="checkbox"/> Parestesia	<input type="checkbox"/> Prostração	<input type="checkbox"/> Prurido
<input type="checkbox"/> Tosse	<input type="checkbox"/> Urina escura	<input type="checkbox"/> Vômito
<input type="checkbox"/> Astenia	<input type="checkbox"/> Diarréia	<input type="checkbox"/> Náuseas
<input type="checkbox"/> Cefaléia	<input type="checkbox"/> Dor abdominal	<input type="checkbox"/> Sangramento
<input type="checkbox"/> Membrana esbranquiçada (garganta)	<input type="checkbox"/> Faringite	<input type="checkbox"/> Ictericia
<input type="checkbox"/> Infarta/ o ganglion.	<input type="checkbox"/> Glaucoma	<input type="checkbox"/> Tosse com secreção
IV – Resultados de Exames Bioquímicos Complementares:		
ALT (TGP):		Outros:
AST (TGO):		
V – Exames Solicitados		
EXAME	Material da Amostra	Data da Coleta
Tuberculose: <input type="checkbox"/> Baciloscopia <input type="checkbox"/> Cultura		
<input type="checkbox"/> Diagnóstico <input type="checkbox"/> 1ª Amostra <input type="checkbox"/> 2ª Amostra		
<input type="checkbox"/> Controle <input type="checkbox"/> Teste de Sensibilidade		
VI – Dados Operacionais		
Município Solicitante com código do IBGE:		Unidade de Saúde:
Condições da amostra: <input type="checkbox"/> Lipêmica ou leitosa <input type="checkbox"/> Hemolisada <input type="checkbox"/> Ictérica <input type="checkbox"/> Satisfatória <input type="checkbox"/> Outra: _____		
Técnico responsável pelo envio:		Técnico responsável pelo recebimento:
Profissão do solicitante: (Nome, número do Conselho e telefone legíveis) Assinatura/Carimbo		
Uso exclusivo do Laboratório		