



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



**ESTUDO DE CASOS SUSPEITOS DE DENGUE NEGATIVOS NO
TESTE SOROLÓGICO PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO NS1:
FALHA NO DIAGNÓSTICO OU EMERGÊNCIA DE OUTRAS
ARBOVIROSES?**

Marineide Souza da Silva

Manaus – AM
Setembro – 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



**ESTUDO DE CASOS SUSPEITOS DE DENGUE NEGATIVOS NO
TESTE SOROLÓGICO PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO NS1:
FALHA NO DIAGNÓSTICO OU EMERGÊNCIA DE OUTRAS
ARBOVIROSES?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Discente: Marineide Souza da Silva

Orientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca

Manaus – AM
Setembro – 2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586e Silva, Marineide Souza da
Estudo de casos suspeitos de dengue negativos no teste sorológico para detecção do antígeno NS1: Falha no diagnóstico ou emergência de outras arboviroses? / Marineide Souza da Silva.
2017
90 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Felipe Gomes Nveca
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Arboviroses. 2. Virus Dengue. 3. Proteína NS1. 4. Virus Mayaro. 5. Virus Oropouche. I. Nveca, Felipe Gomes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Só sei que nada sei”.

Sócrates

Dedico aos meus pais:
À minha mãe, que foi a minha primeira
professora e despertou em mim o
interesse pela leitura e escrita.
Ao meu pai, o alicerce para o meu
desenvolvimento pessoal.

AGRADECIMENTOS

- A Força geradora do universo (DEUS);
- A minha família, pelo incentivo amor e apoio dispensados;
- Aos amigos, que estiveram presentes em todos os momentos dessa trajetória;
- Aos professores, que foram uma constante no meu processo de formação;
- Ao meu orientador por ter acreditado que seria possível desenvolver o trabalho;
- A direção do LACEN-AM, pelo apoio dispensado durante a pesquisa e aos demais profissionais da instituição pelas palavras de incentivo;
- Ao GEADI e a todos os membros da equipe, pelo apoio durante esse trajeto;
- A equipe de virologia do ILMD/FIOCRUZ-AM, pois não existe palavra mais adequada a esse grupo do que EQUIPE, onde há parceria no desenvolvimento de todos os projetos, do qual fico feliz por fazer parte;
- Ao PPGIBA, pelo empenho em cada vez mais tornar essa, uma pós-graduação de excelência. Isso inclui os colaboradores que estão dentro da secretaria, por serem pessoas especiais, sempre prestando o melhor serviço no atendimento aos alunos.

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta, ou indireta contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

A todos, obrigada!

RESUMO

A dengue é considerada atualmente a mais importante arbovirose. O seu principal vetor é o mosquito da espécie *Aedes aegypti*, presente em diversas regiões do mundo. O diagnóstico sorológico por meio da pesquisa do antígeno NS1 é o que tem maior aplicabilidade, pela baixa complexidade na execução e por ser detectado entre o 1º e 9º dia de início dos sintomas, porém com frequência maior até o 5º dia. Esse estudo teve por objetivo principal investigar a presença do vírus dengue em amostras com resultados “Não Reagentes” para o antígeno NS1, avaliando se houve falha no diagnóstico laboratorial, ou a existência de outros arbovírus circulando no estado do Amazonas. Utilizando a técnica de RT-qPCR, pesquisou-se a presença do vírus dengue em 306 amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de infecção. As amostras que continuaram negativas foram pesquisadas quanto a presença dos vírus Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV), pela mesma metodologia, bem como foi pesquisada a presença de anticorpos das classes IgG e IgM para o vírus dengue por ELISA. Das 306 amostras analisadas 17 (5,5%) foram positivas para DENV, com três sequenciadas para o sorotipo 4. Trinta e quatro (10,8%) foram positivas para o ZIKV, uma (0,3%) para CHIKV, treze (4,2%) para MAYV e nove (2,9%) para OROV. Em relação ao teste NS1 todos os kits avaliados apresentaram 100% de concordância em negatividade. Para a pesquisa de anticorpos anti-dengue da classe IgG, das 306 amostras testadas 134 (43,8%) tiveram resultados positivos. Em relação à detecção do anticorpo IgM foram observadas diferentes positivities para os kits comerciais: VIRION (n=250) 35,6% positivas; FOCUS (n=105) 10,5% positivas e PANBIO (N=80) 20% positivas. Nossos resultados confirmam casos de resultados falso-negativos, para os testes NS1 de três kits comerciais, além da circulação de outros arbovírus entre os pacientes de diferentes municípios do estado do Amazonas.

Palavras chaves: Arboviroses; Vírus Dengue; Proteína NS1; Vírus Mayaro; Vírus Oropouche; Vírus Chikungunya; Vírus Zika.

ABSTRACT

Dengue is currently considered the most important arbovirose. Its main vector is the mosquito *Aedes aegypti*, present in several regions around the world. The serological diagnosis by means of the NS1 antigen search is the one that has greater applicability, because of easy of execution and the window for detection between the 1st and the 9th day of the onset of symptoms, with a higher frequency until the 5th day. This study aimed to investigate the presence of dengue virus in samples with non-reactive results for the NS1 antigen, assessing if there was a failure in laboratorial diagnosis, or the existence of other arboviruses circulating in the state of Amazonas. Using the RT-qPCR technique, the presence of dengue virus was investigated in 306 serum samples from patients with clinical suspicion of infection. The samples that remained negative were investigated for the presence of the Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV) and Oropouche (OROV) viruses with the same methodology, as well as the presence of IgG and IgM for dengue virus by ELISA. Of the 306 analyzed samples, 17 (5.5%) were positive for DENV, with three sequenced for serotype 4. Thirty-four (10.8%) were positive for ZIKV, one (0.3%) for CHIKV, thirteen (4.2%) for MAYV and nine (2.9%) for OROV. In relation to the NS1 test, all kits evaluated presented 100% agreement in negativity. For the screening of anti-DENV antibodies of the IgG class, of the 306 samples tested 134 (43.8%) had positive results. Regarding the detection of the IgM antibody, different positivities were observed for commercial kits: VIRION (n = 250) 35.6% positive; FOCUS (n = 105) 10.5% positive and PANBIO (N = 80) 20% positive. Our results confirm cases of false negative results for the NS1 tests of three commercial kits, in addition to the circulation of other arboviruses among patients from different municipalities in the state of Amazonas.

Keywords: Arboviroses; Dengue virus; NS1 protein; Mayaro virus; Oropouche virus; Chikungunya virus; Zika virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

FIGURA 1 – Representação de um Flavivirus.....	9
FIGURA 2 – Genoma dos Flavivírus.....	10
FIGURA 3 – Estrutura da proteína NS1 do vírus dengue.....	11
FIGURA 4 – Via de sinalização.....	14
FIGURA 5 – Modulação do SC pela NS1 do vírus dengue.....	16
FIGURA 6 – Marcadores para o diagnóstico laboratorial.....	19
FIGURA 7 – Evolução da doença em diferentes estágios da infecção.....	20
FIGURA 8 – Partícula infecciosa e o genoma de um membro do gênero Alphavirus.....	25
FIGURA 9 – Partícula infecciosa de um vírus do gênero Orthobunyavirus.....	27
FIGURA 10 – Fluxograma de inclusão de amostras na sequencia de testagem.....	36
FIGURA 11 – kit usado na extração do material genético.....	36
FIGURA 12 – Equipamento utilizado na RT-qPCR (A) e microplacas utilizadas para amplificação (B).....	37
FIGURA 13 – Kits utilizados para testagem por ELISA: (A) FOCUS, (B) PANBIO e (C) BIORAD.....	38
FIGURA 14 – Teste rápido para dengue (A) kit, (B) cassete fechado e (C) cassete pronto uso.....	39
FIGURA 15 – Mapa representativo da distribuição das 306 amostras incluídas no estudo, por municípios de origem.....	44
FIGURA 16- Amplificação de 17 amostras na RT-qPCR para dengue entre as 306 não reagentes para NS1.....	47
FIGURA 17 – Imagem do Gel de 3 amostras positivas na nested-PCR (Lanciotti, 1992) para dengue.....	47
FIGURA 18 – Mapa representativo das amostras positivas para DENV na RT-qPCR por zonas e bairros de Manaus, entre as 306 NS1 negativas incluídas no estudo.....	50
FIGURA 19 – Amplificação na RT-qPCR para o vírus Zika.....	54
FIGURA 20 – Distribuição de amostras POS para o ZIKV no centro Regional (Manaus).....	57
FIGURA 21- Amplificação das amostras para o vírus Mayaro na RT-qPCR.....	59
FIGURA 22 – Distribuição de casos positivos para MAYV nas zonas e bairros de Manaus de janeiro de 2011 a dezembro de 2015.....	61
FIGURA 23- Amplificação das amostras para o vírus Oropouche na RT-qPCR.....	62
FIGURA 24 – Distribuição do OROV nas zonas e bairros de Manaus entre 2015 e 2016.....	65

GRÁFICOS

GRÁFICO 1– Representação em percentual das amostras Negativas por ano, em relação ao total de realizadas.....	42
GRÁFICO 2 – Solicitação de pesquisa para antígeno NS1 pelas regiões de Saúde do estado do Amazonas e sua distribuição anual.....	44
GRÁFICO 3 – Distribuição das 306 incluídas no estudo por meses do ano.....	45
GRÁFICO 4 – Frequência dos dias de doença das 306 amostras incluídas no estudo.....	45
GRÁFICO 5 – Distribuição das 306 para NS1 por sexo.....	46
GRÁFICO 6 – Representação gráfica da frequência entre os sexos.....	48
GRÁFICO 7 – Distribuição por idade para amostras positivas na RT-qPCR para o vírus dengue.....	48

GRÁFICO 8- Resultado dos testes de anticorpos para as 17 amostras Positivas para dengue.....	49
GRÁFICO 9 – Resultados das 306 amostras testadas por diferentes kits para anticorpo IgM.	51
GRÁFICO 10 – Comparativo entre 33 amostras das 306 com três diferentes kits de ELISA para anticorpos da classe IgM.	51
GRÁFICO 11 – Resultados para IgG por ELISA	52
GRÁFICO 12 – Resultado das 306 testadas para IgG por idade e sexo.	53
GRÁFICO 13 – Distribuição das 34 amostras positivas para ZIKV por sexo.....	54
GRÁFICO 14 – Distribuição por idade das 34 amostras positivas para ZIKV.....	55
GRÁFICO 15 – Distribuição dos resultados de ZIKV por dias de doença.....	55
GRÁFICO 16 – Resultados para os anticorpos IgM do DENV em amostras POS para ZIKV.....	55
GRÁFICO 17 – Resultados para os anticorpos IgG do DENV em amostras POS para ZIKV.....	56
GRÁFICO 18 – Distribuição das amostras POS para o ZIKV por ano.	58
GRÁFICO 19 – Paciente grávida com resultados POS para o ZIKV	58
GRÁFICO 20 – Frequência dos casos positivos para MAYV por sexo	59
GRÁFICO 21 – Distribuição dos casos de MAYV POS por faixa etária.....	60
GRÁFICO 22 – Distribuição de MAYV POS por ano. As primeiras amostras encontradas para o MAYV nesse estudo datam de fevereiro de 2011 e a última em novembro de 2015.....	60
GRÁFICO 23 – Resultado de anticorpos IgM e IgG nas amostras POS para MAYV	61
GRÁFICO 24 – Distribuição do resultado de OROV por sexo	62
GRÁFICO 25 – Distribuição de OROV por faixa etária	62
GRÁFICO 26-Distribuição de OROV por ano	63
GRÁFICO 27 – Frequência de pacientes grávida com OROV.....	63
GRÁFICO 28 – Resultado de Anticorpos IgM e IgG do DENV nas amostras POS para OROV.....	64

QUADROS

QUADRO 1– Solicitação para pesquisa do antígeno NS1, segundo distribuição anual e mensal das 306 amostras do estudo.....	43
QUADRO 2 - Média de CT para os diferentes vírus com aís de um resultado positivo, encontrados nas amostras.	54
QUADRO 3 – Dados clínicos constantes nas fichas de investigação	66
QUADRO 4- Dados clínicos relacionados às amostras Positivas na RT-qPCR para os diferentes vírus encontrados	67
QUADRO 5 – Demonstrativo da equipe que constitui e suas respectivas funções no projeto	78

TABELAS

TABELA 1 – Total de amostras recebidas no LACEN para a pesquisa do antígeno NS1....	41
TABELA 2 – Resultados positivos para outras arboviroses em RT-qPCR	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
Ac	Anticorpo
ABI	Associação Brasileira de Infectologia
ADE	<i>Antibody dependent enhancement</i> (Aumento dependente de anticorpo)
Ae	<i>Aedes</i>
MAb	Anticorpo monoclonal
C1s	Protease do complexo multimérico C1 da Via Clássica do Sistema Complemento
C4	Proteína da Via Clássica do Sistema Complemento
CDC	Centro de Controle de Doenças
CT	Threshold Cycle
CHIKV	Vírus Chikungunya
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DENV1	Vírus Dengue sorotipo 1
DENV2	Vírus Dengue sorotipo 2
DENV3	Vírus Dengue sorotipo 3
DENV4	Vírus Dengue sorotipo 4
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimático)
YFV	<i>Yellow fever virus</i> (Vírus da Febre Amarela)
FD	Febre do Dengue
FHD	Febre Hemorrágica do Dengue
FVS-AM	Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas
GVE	Guia de Vigilância Epidemiológica
Gc	Glicoproteína c
Gn	Glicoproteína n
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
LACEN	Laboratório Central
MAYV	Vírus Mayaro
MS	Ministério da Saúde
NS1	Proteína Não Estrutural 1
NS2A	Proteína Não Estrutural 2 ^a
NS2B	Proteína Não Estrutural 2B
NS3	Proteína Não Estrutural 3
NS4A	Proteína Não Estrutural 4 ^a
NS4B	Proteína Não Estrutural 4B
NS5	Proteína Não Estrutural 5
OMS	Organização Mundial de Saúde
OROV	Vírus Oropouche
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, conjugada à transcrição reversa.

RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, conjugada à transcrição reversa.
SC5b	Complexo terminal do Complemento
SES	Secretaria Estadual de Saúde (sigla antiga da SUSAM)
SUSAM	Superintendência Estadual de Saúde do Estado do Amazonas
SISLAB	Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública
SUS	Sistema Único de Saúde
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TCD4	Célula T CD4+
TCD8	Célula T CD8+
TNF	Fator de Necrose Tumoral
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1 Arboviroses.....	8
2.2 O vírus dengue e a família <i>Flaviviridae</i>	9
2.2.1 Situação epidemiológica da dengue	12
2.2.2 Resposta imunológica.....	13
2.2.3 Importância diagnóstica.....	18
2.3 Outros arbovírus de interesse	22
2.3.1 Vírus Zika.....	22
2.3.2 Vírus Chikungunya e vírus Mayaro.....	24
2.3.3 Vírus Oropouche	27
2.4 Controle do <i>Aedes aegypti</i>	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Tipo de estudo	32
4.2 Obtenção das amostras	32
4.3 Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN-AM.....	33
4.4 Seleção das Amostras do estudo.....	33
4.5 Desenho amostral	34
4.6 Sorteio das amostras	34
4.7 Dados dos Sujeitos da Pesquisa.....	35
4.8 Etapas para testagem das amostras	35
4.9 Extração do material genético viral	36
4.10 Pesquisa do material genético do vírus dengue.....	37
4.11 Caracterização do sorotipo do vírus dengue.....	37
4.12 Testagem por métodos clássicos.....	38
4.13 Pesquisa de outros arbovírus	39
4.14 Análises estatísticas	40
5 FONTE DE FINANCIAMENTO.....	40
6 RESULTADOS	41

7 DISCUSSÃO	68
8 CONCLUSÃO	77
9 EQUIPE DO PROJETO	78
BIBLIOGRAFIAS	79
ANEXOS	88
Aprovação do projeto no CEP UEA.....	88
Requisição de Exame no GAL	89
Ficha de investigação Dengue - SINAN.....	91

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril, que pode evoluir para remissão, ou agravar-se em um curto espaço de tempo. A partir de 2014 o Ministério da Saúde (MS) passou a adotar a nova classificação para os casos de dengue, recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 2009. Essa nova classificação visa tratar a dengue como uma doença única com quadros evolutivos, que ao sinal de agravamento são registrados como “dengue grave” e “dengue com sinais de alarme” (MS, 2016).

Na maioria dos pacientes a dengue se apresenta de forma clássica, com um simples quadro febril. No entanto, diferente de outros agravos semelhantes, a dengue pode assumir formas mais graves (CLETON, et al 2012). Uma série de fatores pode contribuir para o agravamento da doença: as condições imunológicas do indivíduo; a associação do vírus com outros agentes infecciosos; a infecção secundária; doenças de base como diabetes, hipertensão e doenças autoimunes (WHITEHORN, 2011). É em função da dinâmica da doença, que se faz necessário o acompanhamento do paciente para detectar os sinais de agravamento, e nesse caso, sejam tomadas condutas para garantir o bem-estar do mesmo. Diagnosticar a dengue apenas pela clínica do paciente é complexo, tendo em vista que muitas doenças apresentam sintomas similares na fase inicial. Portanto, o diagnóstico preciso da dengue requer auxílio laboratorial (MS, 2016).

Alguns exames de rotina podem auxiliar no diagnóstico dos casos. Segundo orientações constantes no Guia de Vigilância Epidemiológica (GVE), podem ser do tipo inespecífico (hemograma, coagulograma, contagem de plaquetas) e específico (pesquisa de anticorpos, antígenos, RNA viral e isolamento do vírus) (MS, 2016). Entre os exames sorológicos, a pesquisa do antígeno NS1 é o que oferece uma resposta mais rápida, em virtude de permitir a detecção viral a partir do primeiro dia de início de sintomas (ALCON, 2002).

Os testes para a pesquisa de anticorpos do tipo IgM normalmente só se tornam positivos a partir do quinto dia após o início dos sintomas (HANNA, 2010). Os moleculares tais como, a Reação em Cadeia da Polimerase conjugada à Transcrição Reversa (RT-PCR) são metodologias confiáveis, com alta reprodutibilidade, rápidas, muito sensíveis, o que viabiliza seu uso em diagnóstico, porém não estão disponíveis na maioria dos serviços públicos de saúde (HANNA, 2010). Já o isolamento viral, geralmente, tem importância para estudos epidemiológicos, pesquisas do sorotipo circulante em determinada área, ou região e análise filogenética e de dispersão, mas em função do tempo de execução não é viável para rotina diagnóstica (MS, 2016).

Os exames específicos são recomendados pelo MS apenas para controle epidemiológico, ou quando necessário para o diagnóstico diferencial de outras arboviroses e de outras doenças infecciosas de curso febril agudo. A escolha dos kits para a realização da pesquisa do antígeno NS1 deve obedecer a rigoroso cuidado quanto à sensibilidade e especificidade, tal fato se deve a possíveis resultados falso-negativos, ou falso-positivos, descritos na literatura (HANNA, 2010).

Para a vigilância epidemiológica nenhum dos dois resultados é útil, tendo em vista que as ações neste setor são baseadas na presença do vírus, para posterior controle do vetor e ações educativas nas regiões de ocorrência. Para o indivíduo portador, o falso-negativo pode se tornar um caso grave (HANNA, 2010). Estudos realizados descrevem que os kits NS1 têm a sua sensibilidade reduzida quando o paciente apresenta infecção secundária (por um novo sorotipo do vírus dengue) com a consequente presença de anticorpos heterólogos (ACOSTA et al, 2014; CHUNG et al, 2015; SILVA et al., 2011; PEELING, 2010).

Em períodos epidêmicos, que normalmente estão relacionados com a época de maior pluviosidade, as unidades de saúde tendem a receber um aumento na demanda de pacientes com queixa de febre, dor na cabeça e dor no corpo. Esses sintomas não são característicos de uma doença específica, de uma maneira geral são tratadas como viroses, entre elas está a dengue que é considerada a mais importante das arboviroses (doença viral transmitida por vetor artrópode) que acometem o homem (FIGUEIREDO, 1992).

Vários fatores devem ser levados em consideração antes de solicitar um teste sorológico, o GVE (disponível no website do Ministério da Saúde) orienta os profissionais em caso de dúvidas. Essas orientações são pertinentes em virtude de o tratamento da dengue ser baseado em medicações para combater os sintomas e na hidratação adequada, pois ainda não existem antivirais específicos. De uma maneira geral pacientes grávidas, idosos acima de 65 anos e crianças merecem atenção especial (MS, 2016).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arboviroses

As arboviroses são doenças causadas por vírus transmitidos por vetores artrópodes, possuindo em comum a propriedade de multiplicar-se em células de vertebrados e artrópodes. O termo deriva da contração em inglês, *ARthropod BORne VIRUSES* (MUSSGAY, et al, 1975; GUBLER, 2006). Na década de 1970 eram mencionadas as famílias virais mais importantes pertencentes a este grupo, entre as quais a *Togaviridae* era tida como clássica, e os gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* eram seus representantes, formando os grupos A e B respectivamente, sendo possível a sua distinção sorologicamente. Seguidamente viriam as famílias *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Picornaviridae* (MUSSGAY, et al, 1975). Em 1984, uma ratificação foi publicada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) tornando o gênero *Flavivirus* uma família, denominada *Flaviviridae* (CDC 2017).

A família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* tem entre seus principais representantes o vírus da Febre amarela (YFV), vírus Dengue (DENV) e o vírus Zika (ZIKV). Atualmente são registrados aproximadamente 537 vírus no catálogo Internacional de Arbovírus, incluindo outros vírus de vertebrados, por apresentarem possíveis interesses para ciências e/ou saúde humana (CDC 2017).

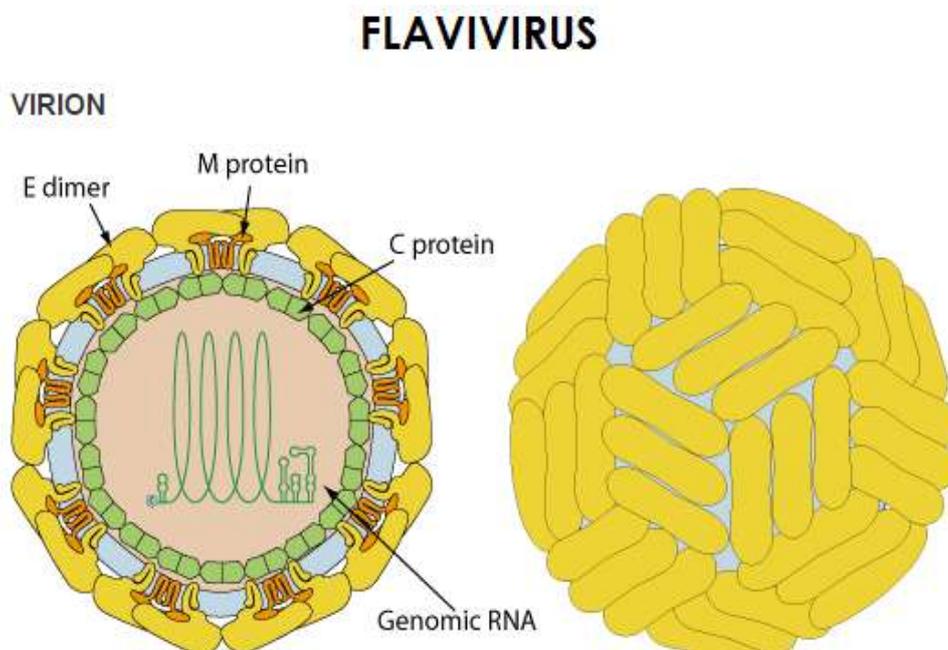
Os arbovírus são agrupados em diferentes famílias, entre elas as mais importantes são: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* (ICTV). Essas famílias são formadas por diferentes gêneros envolvidos em um ciclo complexo de transmissão entre vertebrados silvestres, eventualmente o homem e um, ou mais vetores artrópodes, (WEAVER e REISEN, 2010). Os principais arbovírus tem se disseminado por todo o mundo, em função do aumento no fluxo de viagens em especial quando envolvem grandes eventos, tornando-se fonte de preocupação entre os centros de controle de doenças e vigilância de diversos países (GUBLER, 2002).

As famílias arbovirais aqui citadas comportam alguns dos mais importantes vírus capazes de causar doenças em humanos e com grande repercussão em saúde pública. A maioria dos arbovírus espalhados pelo mundo foram inicialmente isolados na África (GUBLER, 2006). As condições propícias oferecidas para a proliferação do principal vetor de doenças como a dengue, zika e chikungunya - os mosquitos do gênero *Aedes* - torna-o o principal responsável pela propagação dos arbovírus nas mais longínquas regiões de clima tropical e subtropical (GUBLER, 2006; UYAR, 2013; VASCONCELOS, 2016).

2.2 O vírus dengue e a família *Flaviviridae*

Os membros da família *Flaviviridae* são vírus esféricos, envelopados, com aproximadamente 50nm de diâmetro, as proteínas de superfície são organizadas de tal modo que se assemelha a um icosaedro. A origem do nome da família vem do latim *flavus*, ou “amarelo” fazendo referência ao vírus protótipo do gênero, vírus da *Febre amarela* (CHAMBERS et al, 1990; ZHANG et al, 2014). Atualmente essa família é dividida em quatro gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* e *Hepacivirus* (ICTV, 2017).

FIGURA 1 – Representação de um *Flavivirus* - A partícula viral consiste da proteína E na cor amarela, proteína M em laranja, a proteína C em verde e o genoma mostrado no centro da imagem.

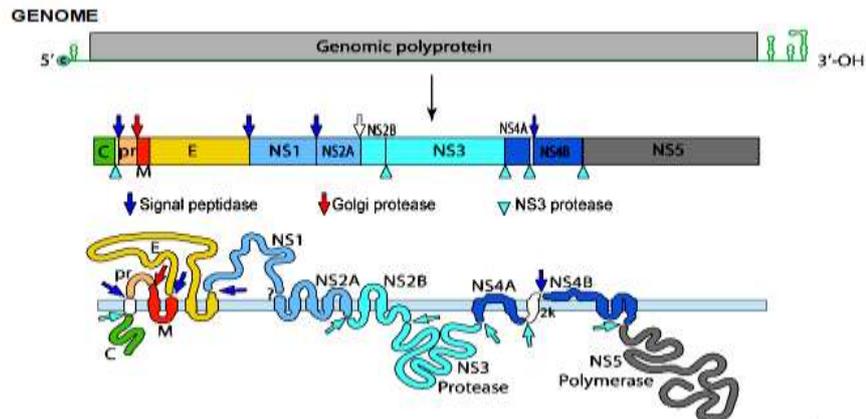


Fonte: <http://viralzone.expasy.org> – acesso em: 02/082017

Entre os membros que compõem o gênero *Flavivirus* estão o vírus da Dengue, vírus da Febre amarela, vírus Zika e outros de importância médica como o vírus da Encefalite Japonesa (SMIT et al, 2011). São constituídos por um genoma de RNA de cadeia simples polaridade positivo, com aproximadamente 11 Kb, o qual codifica uma poliproteína, que em função da ação de proteases celulares e virais, é clivada e dá origem a três proteínas estruturais: Capsídeo, Membrana (expressa como prM, o precursor para M) e Envelope (E), as quais constituem, em conjunto com o genoma, a partícula viral. A clivagem da poliproteína também dá origem a sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B,

NS5) (FIG. 2), as quais foram relacionadas à atividade reguladora da replicação viral, virulência e patogenicidade (CHAMBERS et al, 1990; SMIT, 2011).

FIGURA 2 – Genoma dos Flavivírus – Consiste de uma poliproteína representada na cor cinza, as proteínas estruturais (C, prM/M e E) estão representadas nas cores verde, rosa vermelha e amarela respectivamente. As não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) nas cores azul, azul claro, azul escuro e cinza.



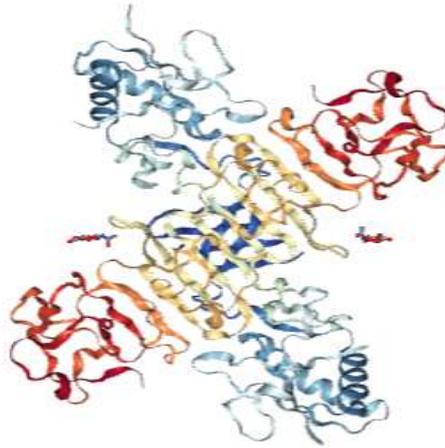
Fonte: <http://viralzone.expasy.org> acesso em 02/08/2017

As proteínas estruturais apresentam funções distintas, a proteína C consiste de aproximadamente 120 aminoácidos, envolve o genoma viral formando o nucleocapsídeo, o qual é envolvido por uma membrana lipídica derivada do hospedeiro. As proteínas prM/M e E são glicoproteínas que apresentam em torno de 165 e 495 aminoácidos respectivamente, cada qual contendo duas hélices inseridas na camada que envolve o nucleocapsídeo. Antes da clivagem do peptídeo pr da proteína M, durante a maturação da partícula, prM pode funcionar como uma chaperona para dobrar e montar a proteína E. Além disso, prM tem a função protetiva da partícula imatura a qual vai amadurecendo durante o percurso na rede Trans-Golgi até a sua liberação por exocitose (CHAMBERS et al, 1990; SMIT, 2011).

As proteínas não estruturais dos flavivírus têm participação ativa na montagem, replicação e infecciosidade dos vírus (CHAMBERS et al, 1990; MURRAY, 2008). NS2A, NS2B, NS3 e NS5 estão envolvidas na replicação do RNA genômico. A NS1 é uma proteína que apresenta funções distintas entre os flavivírus e não bem conhecidas. Alguns estudos demonstram seu importante papel na patogênese de doenças como a dengue (MURRAY, 2008; MULLER e YOUNG, 2013). Na dengue essa proteína está associada ao agravamento, por evadir-se do sistema imunológico, protegendo assim a partícula viral de ser neutralizada (AVIRUTAN et al, 2006). Por exemplo, as proteínas NS1 e NS5 do vírus Zika estão sendo fonte de estudos para diagnóstico laboratorial da doença juntamente com proteínas estruturais, ou seja, um teste *multiplex* capaz de diagnosticar o vírus zika evitando as reações cruzadas

apresentadas pelo vírus (WONG, 2017). A proteína NS1 do vírus dengue já é usada para diagnóstico precoce da doença, facilitando a diferenciação entre outros membros da família, bem como, outras arboviroses (ALCON et al, 2002).

FIGURA 3 – Estrutura da proteína NS1 do vírus dengue – Possui 12 cisteínas e sofre glicosilação de maneira semelhante a outras proteínas virais NS.



Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/ngl/ngl.do?pdbid=4OIG&bionumber=1> – acesso em 18/08/2017

Entre os flavivírus, o vírus dengue é o causador de uma das mais importantes doenças em humanos e que acomete milhões de pessoas anualmente, por esse motivo, é o foco principal desse estudo. Esse vírus é uma continua ameaça as populações que vivem em áreas de risco, ou seja, regiões de clima tropical e subtropical, nas quais há ampla distribuição do vetor (GUBLER, 2002; GUZMAN et al, 2010). Os registros em torno da dengue são antigos, na dinastia Chinesa era reportada como “veneno da água”, pois já nesse período os chineses a associavam com a água e a insetos voadores (GUBLER, 1998), porém só veio a ser melhor documentada a partir do século XVIII.

O vírus dengue apresenta 4 sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) os quais foram inicialmente isolados em 1943 por Kimura e Horta em 1944, com a detecção de dos sorotipos 1 e 2. Posteriormente em 1956 durante a epidemia de dengue hemorrágica no sudoeste da Ásia, foram identificados os sorotipos 3 e 4 (BARRETO e TEIXEIRA, 2008). São diferenciados antigenicamente, com grande variedade genética, porém causam doença similar no homem. Cada sorotipo do vírus apresenta em torno de 4 a 6 genótipos diferentes, geralmente associados a sua distribuição geográfica (CHEN, 2011; GUBLER, 2002).

Análises com base nas sequências completas do gene E de 1812 amostras do DENV-1 confirmam a linhagem de 5 genótipos desse vírus. O mesmo nível de análise aplicado ao DENV-2, por exemplo, apresenta 6 genótipos distintos das mais diferentes regiões do planeta.

Em 1994 Lanciotti e colaboradores caracterizaram 4 genótipos do DENV-3 e atualmente essa classificação está em 5 genótipos. O DENV-4 para o qual haviam sido identificados inicialmente 2 genótipos, em análises atualizadas baseadas no sequenciamento do gene E de 418 amostras, foi confirmada a existência de 4 genótipos (CHEN, 2011).

A dengue não seleciona um grupo específico, pois qualquer indivíduo é susceptível, evidentemente que os que vivem em ambientes propícios ao desenvolvimento do vetor, ou próximo destes tem maior probabilidade de contrair a doença. É fato que os portadores de qualquer dos sorotipos se tornam imunes a este, todavia aos demais a imunidade é passageira, tornando-os propensos a serem infectados por um novo sorotipo (MASERA et al., 2011).

2.2.1 Situação epidemiológica da dengue

No Brasil, segundo dados do Portal Saúde, foram registrados em média 58.000 casos de dengue no início da década de 1990. Ainda na mesma década, no ano de 1999 começam as notificações pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), que registrou mais de 1 milhão de casos em 2010. Houve uma diminuição do número de casos em 2011, 2012, e 2014, porém em 2013 e 2015 foram notificados respectivamente, 1.400.000 e 1.621.797 prováveis casos de dengue. Dos números apresentados em 2015, até a semana epidemiológica (SE) 52 (04/01/2015 a 02/01/2016) a região Norte representou desse total 2,1% (34.110 casos), e o estado do Amazonas com um percentual de 0,33% (4.131 casos). Para os casos de agravamento até a SE 52/2015, foram registrados no Brasil 20.329 com sinais de alarme; 1.569 casos de dengue grave e 863 óbitos. No mesmo período de 2014, foram confirmados 8.436 casos de dengue com sinais de alarme; 764 casos de dengue grave e 473 óbitos (MS, 2016).

Em relação ao ano de 2016 até a SE 27, que compreende o período de 03/01/2016 a 09/07/2016 foram registrados no Brasil 1.399.480 casos de dengue, a região Norte com 2,6% (36.220 casos) e o estado do Amazonas com 0,52% (7.763 casos). Para os casos de agravamento até SE 27 foram confirmados 6.253 casos de dengue com sinais de alarme; 639 casos de dengue grave e 419 óbitos. No mesmo período de 2015, foram 19.149 casos de dengue com sinais de alarme; 1.441 casos de dengue grave e 789 óbitos. Fazendo o comparativo dos casos de morte por dengue, o país mostra uma redução de 47% em 2016 quando relacionado ao mesmo período de 2015 (MS, 2016).

Segundo dados da Fundação de Vigilância em Saúde do estado do Amazonas (FVS-AM), a presença do *Aedes aegypti* na cidade de Manaus foi detectada a partir de novembro de 1996 e do *Aedes albopictus* a partir de setembro de 1997. Em fevereiro de 1998 foram registrados os primeiros casos autóctones de DENV-1 (FIGUEIREDO et al, 2004) na capital

do estado dando início à epidemia, essas informações condizem com os registros dos primeiros casos no portal do Ministério da Saúde, constantes no SINAN (MS, 2016).

A distribuição dos sorotipos virais é bastante variada, porém com uma prevalência maior para os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 até 2010. Em 2015, em todo território nacional, a partir do recebimento de 23.196 amostras para o isolamento viral, 8.859 apresentaram resultados positivos e a proporção para os sorotipos foi: DENV1 (93,8%), seguido de DENV4 (5,1%), DENV2 (0,7%) e DENV3 (0,4%), todos os dados aqui citados estão disponíveis em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2014-042-ok-50.pdf>>. De acordo com informe desse boletim o Amazonas enviou 13 amostras para isolamento e todas apresentaram resultados negativos. Em 2016 foram processadas 9.513 amostras para isolamento viral, das quais 2.520 apresentaram resultados positivos, com uma predominância de 89% para o DENV-1, prevalecendo o predomínio do sorotipo circulante em 2015 em todo território brasileiro. O estado do Amazonas aparece com o envio de 2 amostras, sendo ambas positivas para DENV-1 (MS, 2016).

Os dados referentes à distribuição da dengue mundialmente, são reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), porém a OMS refere que há uma discrepância considerada entre os casos reais e os reportados pelos governos dos países. Tal fato segundo o órgão se dá em função da situação econômica na qual se encontra a maioria dos países endêmicos. Cita como exemplo os casos da África e Região do Mediterrâneo Oriental que não são relatados. Apesar das subnotificações, há uma estimativa a partir de 2013 que 390 milhões de casos de infecção por dengue ocorram todos os anos, dos quais 96 milhões se manifestam clinicamente (WHO, 2016).

Só recentemente as autoridades de vigilância em saúde dos países mais industrializados, vieram demonstrar uma maior preocupação com a distribuição geográfica do DENV, em virtude de casos importados em turistas. Para os Estados Unidos da América tem havido um aumento significativo de casos importados e autóctones no Texas, Havaí e Flórida. Tal situação acrescentou um sentido de urgência para a pesquisa e uma esperança para suporte adicional para estudos desta doença há muito tempo negligenciada em regiões tropicais (RICO-HESSE, 2010).

2.2.2 Resposta imunológica

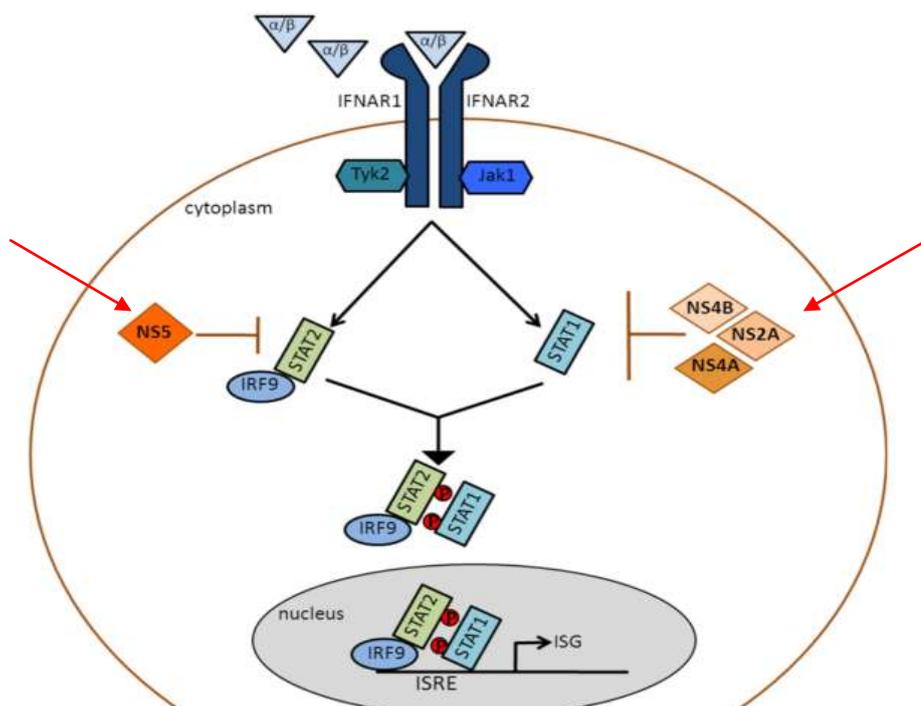
A resposta imunológica ao vírus dengue é extremamente complexa, em virtude da infecção por um dos sorotipos conferir imunidade prolongada a este, porém temporária aos demais. Infecções por dengue, em indivíduos que já tiveram contato com outros sorotipos do

vírus, ou mesmo, outros flavivírus (como os vacinados contra a febre amarela), podem alterar o perfil da resposta imune (FIGUEIREDO, 1999).

O mecanismo de infecção ocorre através da picada da fêmea infectada do mosquito *Aedes aegypti*, ou do *Aedes albopictus* que pode transmitir o vírus durante o repasto sanguíneo. As primeiras células do sistema imune a interagir com o vírus dengue são as células dendríticas, onde ocorre a replicação inicial (GANDINI et al, 2011). As células dendríticas infectadas maturam e migram para os gânglios linfáticos, onde apresentam antígenos virais às células T, desencadeando uma resposta imune celular e humoral (GUZMAN et al, 2010).

A infecção produtiva do vírus depende do seu poder de sobrepujar as defesas do hospedeiro, em especial a imunidade inata, que tem a função de retardar o avanço do patógeno, propiciando o desenvolvimento da imunidade adaptativa (MORRINSON, 2012). Uma das formas encontradas pelo vírus Dengue é inibir a produção e a sinalização de interferon (IFN) tipo I em células humanas suscetíveis, incluindo células dendríticas. O complexo, protease NS2BNS3, funciona como um antagonista inibindo a produção do IFN tipo I enquanto que as proteínas NS2A, NS4A, NS4B e NS5, antagonizam diferentes componentes destas vias de sinalização, tais como os transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs). A NS5, por exemplo, tem a capacidade de se ligar e direcionar STAT2 para a degradação (MORRINSON, 2012).

FIGURA 4 – Via de sinalização sendo redirecionada pelas proteínas do vírus dengue, impedindo a fosforilação das proteínas STATs (setas vermelhas).



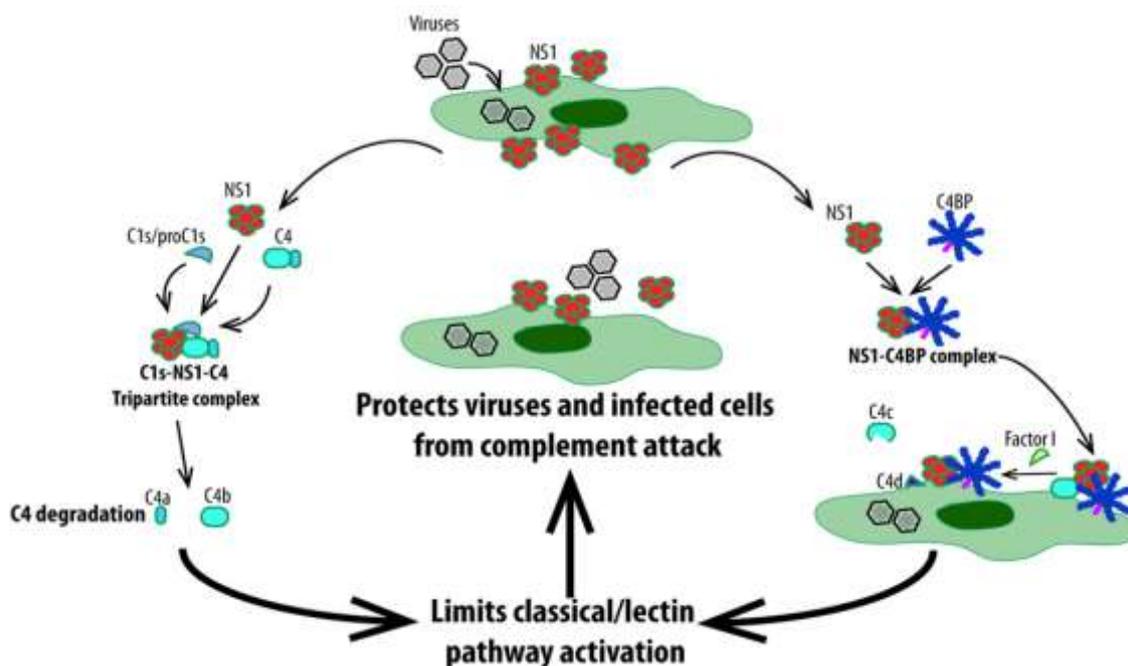
As proteínas citoplasmáticas STATs ao serem ativadas são translocadas para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas estimulando a transcrição (DARNELL et al, 1994). O interferon tipo I (IFN I) se liga ao seu receptor (INFAR1 e INFAR2) presente na superfície de células nucleadas, desencadeia a autofosforilação da via Janus cinases, Jak1 e Tik2. As cinases ativadas então fosforilam STAT1 e STAT2 que se ligam ao fator regulador de IFN, IRF9 formando um complexo trimérico que ao ser translocado para o núcleo, estimula os genes ISG e seus produtos levam a célula a um estado antiviral (FIG. 04). Passos esses que são antagonizados por algumas proteínas do DENV impedindo a ativação da via (MORRINSON, 2012).

O sistema complemento (SC) está na primeira linha de defesa contra patógenos invasores e é um mediador entre a imunidade inata e a adaptativa, portanto é foco de estratégias de evasão pelo DENV. A proteína NS1 é encontrada em altas concentrações no sangue dos pacientes e pode modular as vias do complemento (WHITEHORN, 2011). Esse sistema pode ser ativado por três vias: Clássica, da Lectina e Alternativa, as quais são vias distintas que convergem em um evento central com a clivagem da proteína C3 nos produtos ativos C3a e C3b. Esses eventos podem ter o desfecho sequencial com a montagem da C5 convertase, que cliva C5 em C5a e C5b dando origem ao complexo de ataque a membrana (MAC) o qual leva a lise celular (LAMBRIS et al, 2008).

As proteínas do SC em sua forma ativa têm funções de opsonizar facilitando a fagocitose e eliminação do patógeno, bem como induzem a resposta inflamatória através das anafilotoxinas C3a e C5a (LAMBRIS et al, 2008). A proteína NS1 dos flavivírus, tanto na sua forma solúvel como associada à membrana de células, tem sido demonstrada por ser capaz de ativar a cascata do complemento em seres humano. A presença das anafilotoxinas C3a e C5a correlacionam-se com a gravidade da doença, bem como os níveis de NS1 no plasma e do complexo terminal do complemento SC5b-9 (GUZMAN et al, 2010). Além disso, a NS1 liberada de células infectadas pode ativar diretamente o complemento na fase fluída (AVIRUTAN et al, 2006). Um papel importante para NS1, ainda em relação ao complemento encontra-se no seu potencial de antagonizar C4 do SC, protegendo assim a partícula viral de ser neutralizada.

Estudos publicados mostram que NS1 aumenta a clivagem de C4 pelo recrutamento e ativação de proteases específicas do complemento. De acordo com esses dados, a NS1 se liga a C1s e C4 formando um complexo solúvel, clivando C4 em C4a e C4b impedindo a forma nativa de C4 de participar da ativação do Complemento no sítio infeccioso (AVIRUTAN et al, 2010; 2011).

FIGURA 5 – Modulação do SC pela NS1 do vírus dengue bloqueando as vias: Clássica e Lectina.



Fonte: Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation (Avirutan et al, 2011).

A proteína NS1 tem sido alvo de pesquisas nos últimos anos por ser considerada uma das proteínas não estruturais mais importantes do vírus da dengue. Trinta anos atrás, a ativação do complemento foi proposta para ser um evento-chave subjacente, mas a causa da ativação do complemento permaneceu desconhecida. Um estudo com pacientes infectados com o vírus dengue avaliou a NS1 quanto à sua capacidade para ativar o complemento humano nas suas formas associadas à membrana e solúveis (AVIRUTNAN et al, 2006). Grandes quantidades de NS1, C5a do complemento, anafilotoxina e complexo do complemento terminal SC5b-9 foram observados em fluídos pleurais de pacientes com dengue grave. Foi observado ainda que a ativação do complemento mediada por NS1 leva a geração local e sistêmica de anafilatoxinas e SC5b-9, o que pode contribuir para a patogênese do extravasamento vascular que ocorre em pacientes com sinais de alarme / dengue grave, (AVIRUTNAN et al., 2006).

Outro estudo voltado para estabelecer a relação entre os níveis do antígeno NS1 livre no plasma e o desenvolvimento da dengue na forma hemorrágica foi desenvolvido com 32 crianças infectadas pelo sorotipo 2, onde fora usado um método quantitativo de captura de ELISA para o antígeno NS1 e uma RT-PCR para detectar os níveis de RNA viral presente no plasma diariamente no intuito de demonstrar se os níveis circulantes de DENV-2 e do antígeno NS1 se correlacionam com os níveis de viremia. Os níveis de NS1 livre no plasma correlacionados com níveis de viremia foram maiores em pacientes com forma hemorrágica

da doença do que naqueles com forma clássica. Um elevado nível de NS1 livre foi identificado 72 horas antes em pacientes com risco de desenvolver dengue hemorrágica. (LIBRAT et al., 2002).

A proteína NS1 dos flavivírus é versátil e única entre os vírus de RNA. Após ser glicosilada, é enviada para superfície celular, secretada para o meio extracelular e liga-se à superfície de células não infectadas, dentro da célula, de forma incerta, tem participação na replicação do RNA viral (LINDENBACH e RICE, 1997; KHROMYKH et al, 2000). A NS1 pode se ligar a superfície de células não infectadas através da interação com glicosaminoglicanos, heparan sulfato e sulfato de condritina E, porém, esse mecanismo não explica como a NS1 é encontrada em superfície de células infectadas (YOUN et al, 2010).

Tanto a forma secretada, como a encontrada na superfície celular são altamente imunogênicas, tornando-a um importante biomarcador para o diagnóstico na fase precoce da dengue. A NS1 é encontrada em formas monoméricas, diméricas e hexaméricas, mas pouco se sabe sobre essas formas da proteína, apenas que ela interage com muitos componentes celulares de várias células do hospedeiro (MULLER e YOUNG, 2013).

A proteína NS1 tem sido considerada importante, por ter um papel duplo nas infecções por dengue, no desenvolvimento da patogênese e por representar um potencial antigênico para produção de vacinas, bem como no agravamento da doença, por exacerbar essa resposta em nível deletério para o hospedeiro. Porém estudos mostram que o agravamento ocorre durante uma viremia elevada. É fato que após mais de duas décadas de estudo em torno dessa proteína, há muitas perguntas sem respostas (AMORIM et al, 2014).

Em resposta a presença do vírus a imunidade inata tem o papel na primeira linha de defesa de controlar, ou até mesmo tentar eliminar o patógeno enquanto a imunidade adaptativa se desenvolve (DECEMBRE et al, 2014). Nesse contexto, a resposta imune adaptativa contribui para a resolução da infecção e representa papel importante na proteção em infecções primárias pelo vírus dengue (MURPHY, 2011). A resposta mediada por anticorpos no início da infecção é conferida pela classe IgM, que atuam na fase aguda da doença com o desenvolvimento sequencial da produção de IgG, o qual vai conferir imunidade duradoura contra o sorotipo da infecção. Em uma infecção secundária por outro sorotipo, há uma produção precoce de anticorpos IgGs, superando a quantidade de IgM (FIGUEIREDO, 1999).

Os anticorpos neutralizantes contra a proteína E, são os primeiros mediadores na proteção contra o vírus dengue, porém essa imunidade é de longa duração apenas para o sorotipo ao qual ocorreu a infecção (MURPHY, 2011). Durante um processo de reinfeção por um sorotipo diferente, o infectado não teria imunidade conferida, tornando a resposta

complexa, podendo inclusive haver um agravamento da doença. Uma hipótese é que a formação de imunocomplexos instáveis, vírus-anticorpo heterólogos, facilitaria a entrada do vírus em fagócitos mononucleares através de seu receptor Fc, fenômeno conhecido como ADE (*Antibody Dependent Enhancement*) (GUZMAN et al, 2010). O ADE corre presumivelmente quando os anticorpos da classe IgG estão em concentrações subneutralizantes, nível que não conseguem neutralizar o vírus, chegam a formar imunocomplexos, porém ao invés de promover a eliminação do vírus, findam por facilitar a entrada na célula através do receptor Fc (HALSTEAD, 2014).

Assim como os anticorpos a imunidade mediada por células, confere tanto proteção, quanto contribui para a patogênese da dengue. Segundo Loke (2001), a proteção pelas células TCD8 é plausível, tendo em vista que podem limitar a infecção viral pela lise de células infectadas e secreção de citocinas tais como $IFN\gamma$. Por outro lado, é proposto que um grande número de células infectadas se tornariam alvos para células T CD4+ e CD8+ liberando citocinas como IL-10, IL-2, INF e Fator de Necrose Tumoral (TNF) que separadamente, ou combinados contribuiriam para o dano endotelial e alteração na homeostase presentes na forma grave da doença (GUZMAN et al, 2010).

2.2.3 Importância diagnóstica

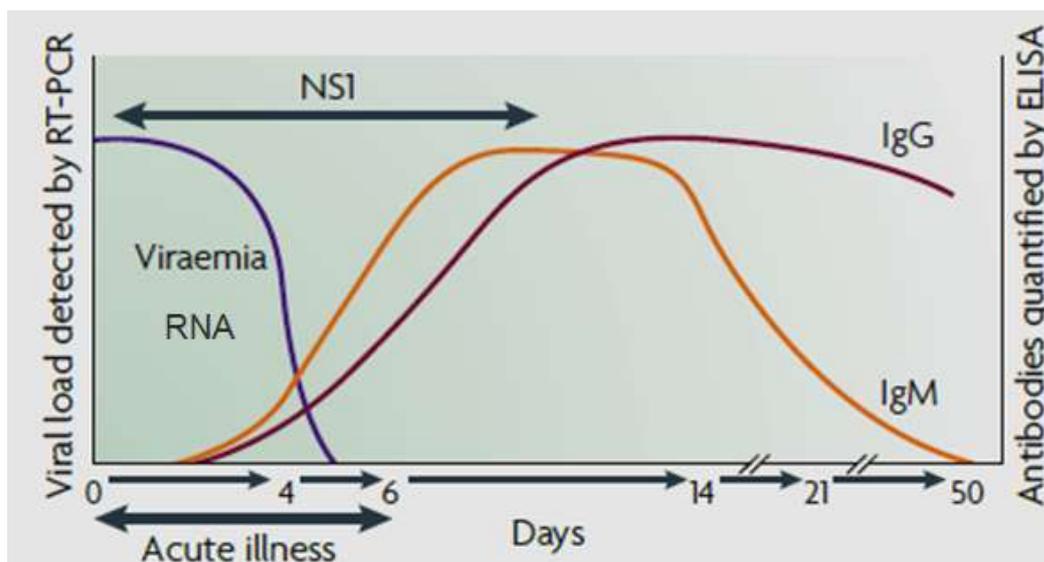
O diagnóstico da dengue geralmente é clínico e até o momento não existe tratamento específico para a doença. Dentro das unidades de saúde, são tratados apenas os sintomas, com posterior liberação do paciente (WHITEHORN, 2011). De uma maneira geral a doença é autolimitada e em muitas situações passa de forma imperceptível por seus portadores (DIAMOND et al, 2015). O problema é que em alguns pacientes existe a possibilidade de evolução para quadros graves o que ocorre após as manifestações clínicas iniciais. A evolução nos métodos diagnósticos para dengue tem contribuído para abordagens rápidas nos cuidados com esses pacientes, entre os quais um teste ELISA que permite a detecção do antígeno NS1 do vírus dengue (SANKAR et al, 2011).

Após a observação da liberação *in vitro* da proteína não estrutural 1 (NS1) dos flavivírus, ação restrita a células de mamíferos infectados, mas não em células derivada do mosquito vetor, o grupo de Alcon resolveu avaliar a relevância biológica da secreção de NS1 *in vivo*. Para tal foi desenvolvido um teste de ELISA, que detectasse a proteína no soro de pacientes infectados pelo vírus dengue. O teste mostrou capacidade em detectar a proteína do 1º ao 9º dia após o início dos sintomas. Permitiu ainda, detectar a proteína NS1 na ausência de anticorpos IgM e onde a reação em cadeia da polimerase (PCR) era negativa para o RNA viral (ALCON et al, 2002).

O diagnóstico laboratorial da dengue é determinado pela sequência de eventos após a infecção do vírus, em um indivíduo suscetível, pela fêmea de *Aedes aegypti* infectada. Primeiramente há um período de incubação de três a sete dias (em média) antes do início dos sintomas. Após o início dos sintomas a viremia permanece até cinco dias aproximadamente. Durante esse período o antígeno NS1 pode ser detectado em amostra de soro (HANNA, 2010).

A identificação da presença de NS1 no início da doença tem-se caracterizado como uma forma rápida de detecção indireta do vírus facilitando o diagnóstico (PEELING et al, 2010). Visando esse objetivo, foram desenvolvidos kits pelo método de ELISA e imunocromatográficos, que são capazes de identificar a presença do antígeno NS1, nos primeiros dias de início dos sintomas. Ressalta-se que a eficiência desses kits pode ser comprometida diante de uma infecção secundária (PEELING et al, 2010).

FIGURA 6 – Marcadores para o diagnóstico laboratorial de acordo com dias da doença

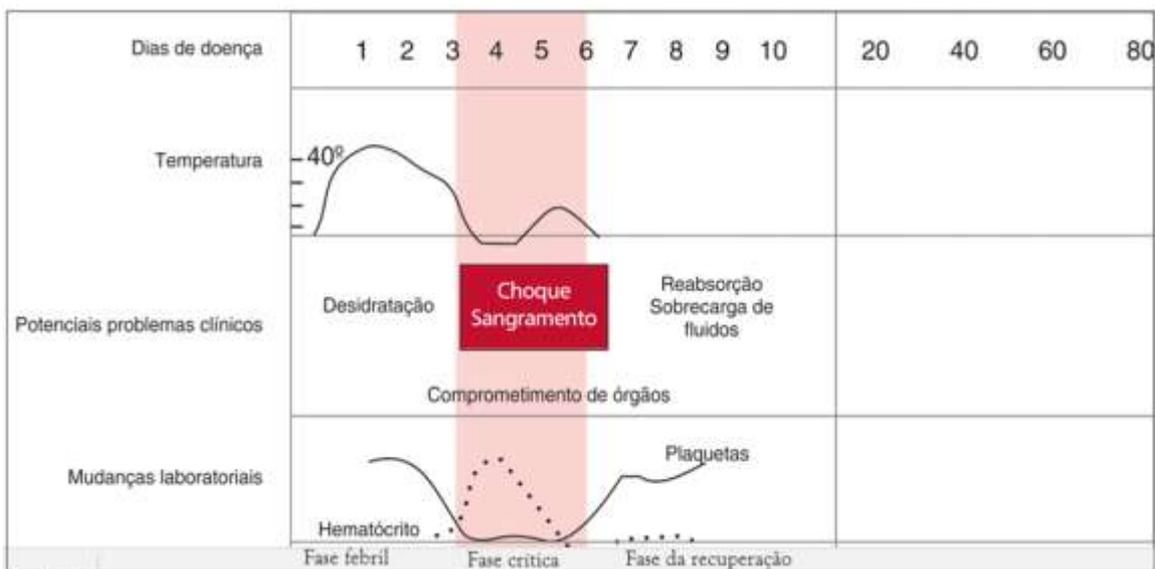


Fonte: Retirado de Guzman et al, 2010 – Dengue: a continuing global threat.

O diagnóstico laboratorial varia de acordo com os dias de início de sintomas da doença (PEELING, 2010). No início da viremia, do primeiro ao quinto dia, a probabilidade de detectar o material genético do vírus é muito maior do que nos dias subsequentes. A presença de anticorpos da classe IgM a partir do 5º dia de início dos sintomas é detectada em maior quantidade na infecção primária por qualquer um dos sorotipos do vírus dengue (GUZMAN et al, 2010; PEELING, 2010). Segundo diversos trabalhos, os resultados para IgM, em uma infecção secundária podem apresentar-se como falsos negativos, em virtude da baixa quantidade desse anticorpo e do aumento de IgG. A FIG. 06 ilustra o período propício para

detecção do antígeno NS1 e do material genético por RT-PCR. Observe-se, no momento que é possível detectar o material genético, também é possível encontrar NS1, mas o inverso não é verdadeiro, pois o período de detecção para NS1 é maior em comparação ao RNA viral (GUZMAN, 2003).

FIGURA 7 – Evolução da doença em diferentes estágios da infecção. Na primeira coluna a evolução da doença com exames laboratoriais simples, como a medida do hematócrito que demonstra pela sua alteração se há extravasamento de plasma para o interstício, ou um sangramento, a partir do nível basal. Na faixa em destaque entre o 3º e 6º dia, o potencial desenvolvimento de fase crítica da doença, observadas por alterações no hemograma. Ao lado direito da coluna em rosa a fase de recuperação.



Fonte: Adaptado de: <http://www.saude.go.gov.br/public/media/ZgUINSpZiwmb3/1000120219262619909.pdf>

A FIG.07 demonstra como a doença evolui em diferentes fases no hospedeiro humano, o momento em que a temperatura aumenta e o paciente pode desidratar levando a uma grande perda de líquido para o interstício e a importância do acompanhamento através de exames simples como o hemograma. Portanto, de acordo com o esquema apresentado, o agravamento pode ter início na diminuição da febre, outro fator importante é o hematócrito que aumenta durante o período de desidratação e diminui drasticamente durante o sangramento e choque, mostrando a gravidade da doença. (Disponível na web para consulta, Manejo clínico da dengue, site do MS, 2016).

A utilização de kits de diagnóstico rápido para a detecção da proteína NS1 pode ser uma importante ferramenta para otimizar os recursos, no monitoramento dos sorotipos do DENV circulantes, se utilizados como teste de triagem de amostras destinadas ao isolamento viral. Entretanto, é recomendável sempre o uso associado a outros critérios, como clínico e

epidemiológico, ou mesmo outras técnicas laboratoriais. É necessário levar em consideração na escolha de um teste diagnóstico a alta sensibilidade e especificidade (SILVA et al., 2011).

Em trabalhos recentes, foram realizados testes moleculares em amostras de pacientes supostamente diagnosticados com dengue, mas que apresentaram resultados negativos para a proteína NS1. Em um desses trabalhos, 150 amostras negativas para o antígeno NS1 (Platelia ELISA) foram analisadas pelo método RT-qPCR utilizando sondas TaqMan, dessas 33 apresentaram resultados positivos com um percentual de 77% para DENV-4. Segundo esse estudo há uma dificuldade dos testes tradicionais em detectar o antígeno NS1 quando o paciente é portador de uma segunda infecção, ou terceira infecção pelo DENV e o problema, aparentemente, se intensifica diante do quarto sorotipo (ACOSTA, 2014).

O teste *Platelia Dengue NS1 Ag* é um método imunoenzimático em uma fase do tipo sanduíche, em formato de microplaca, para detecção qualitativa ou semi-quantitativa do antígeno NS1 do vírus da dengue em soro ou plasma humano. O teste utiliza anticorpos monoclonais para a captura e revelação. Quanto à sensibilidade do teste, em soros confirmados por RT-PCR, o antígeno revelou uma positividade em 91% dos casos, esta sensibilidade é maior em amostras provenientes de infecções primárias negativas para IgG. Ainda segundo o fabricante, a especificidade é de 100% sem reação cruzada com outros arbovírus como o vírus da Febre Amarela, vírus do Oeste do Nilo e outras doenças que não a dengue. Essas informações são do próprio catálogo da BIO-RAD, fornecidos junto com os kits. O teste *Platelia Dengue NS1 Ag* da BIO-RAD, assim como o *Dengue NS1 Antigen Dx Select* da MEDVAX e PANBIO são usados nas redes de laboratórios públicos para o diagnóstico da dengue e são fornecidos pelo Ministério da Saúde.

O MS recomenda que o teste específico para dengue só deva ser usado em algumas situações, porém foi possível observar os aspectos positivos na implantação destes testes no município de São José do Rio Preto dos quais constam o teste rápido e ELISA para dengue NS1. Para a região significou diminuição do tempo de retorno do resultado, representando um fator importante para o paciente, médico assistente, vigilância epidemiológica e para as ações de controle dos vetores, incluindo neste tópico as ações de prevenção na mobilização social, técnica e política (BASSI et al., 2011).

O diagnóstico laboratorial por meio de biologia molecular, isolamento viral, ou sorológico, para ser solicitado necessita de conhecimento prévio sobre os eventos que ocorrem durante o período de infecção da dengue (SANKAR et al, 2011). A maioria dos testes aqui mencionados são realizados na fase aguda da doença. Entretanto, vale salientar que para cada um existe um período de tempo adequado, o limite entre um e outro é pequeno, o que não impede o encontro do anticorpo no limite do antígeno, ou a presença do antígeno na

ausência de fragmentos do RNA viral (CHAKRAVATI et al, 2011; ALCON, 2002; GUZMAN, 2010).

De modo geral é preciso saber, qual o momento oportuno para coleta de material quando se pretende pesquisar anticorpos da classe IgM. Os anticorpos IgM são detectados a partir do 5º dia de início dos sintomas e o antígeno NS1 do 1º ao 9º dia de início dos sintomas (CHAKRAVATI et al, 2011; ALCON, 2002; GUZMAN, 2010). Por biologia molecular pode-se encontrar fragmentos do RNA viral até o quinto dia de início dos sintomas, essas informações são importantes, principalmente quando se tenta estabelecer comparações entre os métodos utilizados (ALCON, 2002). Huhtamo e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre um novo PCR em tempo real, o antígeno NS1 e anticorpos IgM e observaram uma discrepância nos resultados entre a RT-qPCR e a NS1, ao qual atribuíram uma provável variação de tempo nos marcadores dos soros desses pacientes (HUHTAMO et al, 2010).

O diagnóstico laboratorial pode ainda sofrer interferências diante da circulação de outros patógenos, cujas doenças provocadas apresentem características similares à dengue, por exemplo, de outras arboviroses (GUZMAN, 1996). Atualmente o diagnóstico laboratorial conta com um arsenal da biologia molecular. Entretanto, nos serviços públicos de saúde, a disponibilidade desses testes é apenas para algumas dessas arboviroses circulantes entre a população em área de risco (GUZMAN, 1996; 2003, CABRAL-CASTRO, 2016).

2.3 Outros arbovírus de interesse

A Região amazônica apresenta grande potencial para circulação de diversos outros tipos de arbovírus, além do dengue. O clima presente na região é propício para o desenvolvimento e estabelecimento de vetores, como os do gênero *Aedes*, assim como outros envolvidos no ciclo de transmissão dessas doenças (PASTULA, 2016). O volume de chuvas é intenso na região, propiciando o aumento de criadouros silváticos e urbanos. Além disso, o ecoturismo é bastante movimentado na região, especialmente em áreas de floresta que ficam próximas aos grandes centros, resultando no potencial de dispersão viral em novas áreas urbanas (CLETON et al, 2012).

2.3.1 Vírus Zika

Da família *Flaviviridae*, outro arbovírus de importância médica que tem se destacado é o vírus Zika (ZIKV). Este vírus também é transmitido pelas espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, os quais encontram em regiões de clima tropical, condições propícias para sua proliferação (PASTULA, 2016). Ainda nessa família o vírus da Febre Amarela (YFV) urbana

pode também ser transmitido por este vetor, porém diferentemente dos outros membros citados, existe vacina capaz de bloquear a transmissão em uma população (THEILER, 1937). O YFV pode apresentar ciclos urbano e silvestre, sendo o silvestre mantido por mosquitos do gênero *Haemagogus e Sabethes*. Atualmente a febre amarela tem chamado à atenção em função de surtos em locais considerados como áreas de baixa incidência para o vírus (SBI, 2017).

No presente estudo propomos a busca por outros arbovírus, além do dengue, com provável circulação no estado do Amazonas. Dentro da família *Flaviviridae*, o ZIKV tem sido motivo de estudos por ter se tornado epidêmico em regiões fora do seu eixo de transmissão primário, na Ásia e África. Fora desse ambiente foi notificado um surto em humanos nas ilhas Yap da Micronésia em 2007, com um número absoluto relativamente pequeno de infectados. Porém em 2013 houve uma epidemia de casos suspeitos de infecção, entre 8.500 a 19.000 na Polinésia Francesa (PRIYAMVADA et al, 2017).

O ZIKV foi descoberto em 1947, quando pesquisadores na região de Uganda buscavam o YFV na natureza (DICK, 1952). Em grande parte sua alta na distribuição de casos tem ocorrido em função das principais espécies do mosquito transmissor (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus e Aedes africanus*) (FARIA et al, 2016). Outro fator contribuinte é o aumento nas viagens em função de grandes eventos ocorridos em diferentes países, bem como o turismo de aventura (CLETON et al, 2012).

O ZIKV causa uma doença com um quadro clínico inicial semelhante ao de outros vírus de sua família, ocasionalmente causa uma doença autolimitada conhecida como febre do Zika (IOSS, et al, 2014). O vírus infecta células do sistema nervoso central (SNC), e este neurotropismo fora observado apenas em camundongos, mas não em macacos, ou coelhos em estudos iniciais (DICK, 1952). Em 2015 no Nordeste do Brasil um aumento significativo dos casos de microcefalia chamou a atenção, mostrando o grande potencial teratogênico do ZIKV em gestantes infectadas (NORONHA et al, 2016).

Além dos casos de microcefalia relacionados ao ZIKV, com o avançar dos estudos foram observadas outras alterações envolvendo o SNC, sendo então os casos definidos como Síndromes Neurológicas (MS, OPAS, OMS, 2016). O envolvimento do SNC não foi observado somente em fetos, ou em recém-nascidos, mas em adultos que apresentavam perda da função temporária nos membros inferiores assemelhando-se a doença autoimune conhecida por síndrome de Guillain-Barré (NORONHA et al, 2016; TIWARI et al, 2017). Nas demais regiões brasileiras há uma ampla circulação do vírus, porém os números de casos relacionados à microcefalia, por exemplo, não se comparam aos casos do Nordeste do país (MS, 2016).

A situação epidemiológica do ZIKV no Brasil inicia-se com a primeira transmissão autóctone registrada em abril de 2015. Três casos de óbitos confirmados no país ainda em 2015, nos estados do Maranhão, Pará e Rio Grande do Norte e um caso em janeiro de 2016, no estado do Rio de Janeiro, (boletim epidemiológico (BE) nº 28/2016). Em 2016 até a semana epidemiológica (SE) 27, foram notificados 174.003 casos prováveis de febre pelo vírus zika no país, confirmados 78.121 casos, e um óbito para o Rio de Janeiro. A região Norte teve notificado 10.944 casos e o estado do Amazonas 4.055 (MS/SVS, 2017).

Em relação aos casos de microcefalia relacionados ao ZIKV no Brasil, o Ministério da Saúde informa que entre 22 de outubro de 2015 e 25 de junho de 2016, foram registrados um total de 8.165 casos suspeitos de microcefalia e outras más formações do SNC em recém-nascidos. Desses números, 1.638 casos foram confirmados, (270 por critérios laboratoriais); 3.466 descartados e 3.061 continuavam em investigação, BE nº 17/2017 (MS/SVS, 2017).

Fora do Brasil, o cenário para síndromes neurológicas relacionadas à gravidez se apresentou com a Colômbia notificando, entre a SE 1 a 24 de 2016, 11 casos de microcefalia associados ao ZIKV. Na Martinica até a SE 25 de 2016 foram registrados 02 casos de microcefalia e outros 04 de má formação congênita, relacionados ao ZIKV. Os Estados Unidos relataram até 23 de junho de 2016, 07 casos de defeitos congênitos e 05 perdas de gravidez confirmadas por ZIKV laboratorialmente (OPAS/OMS, 2017).

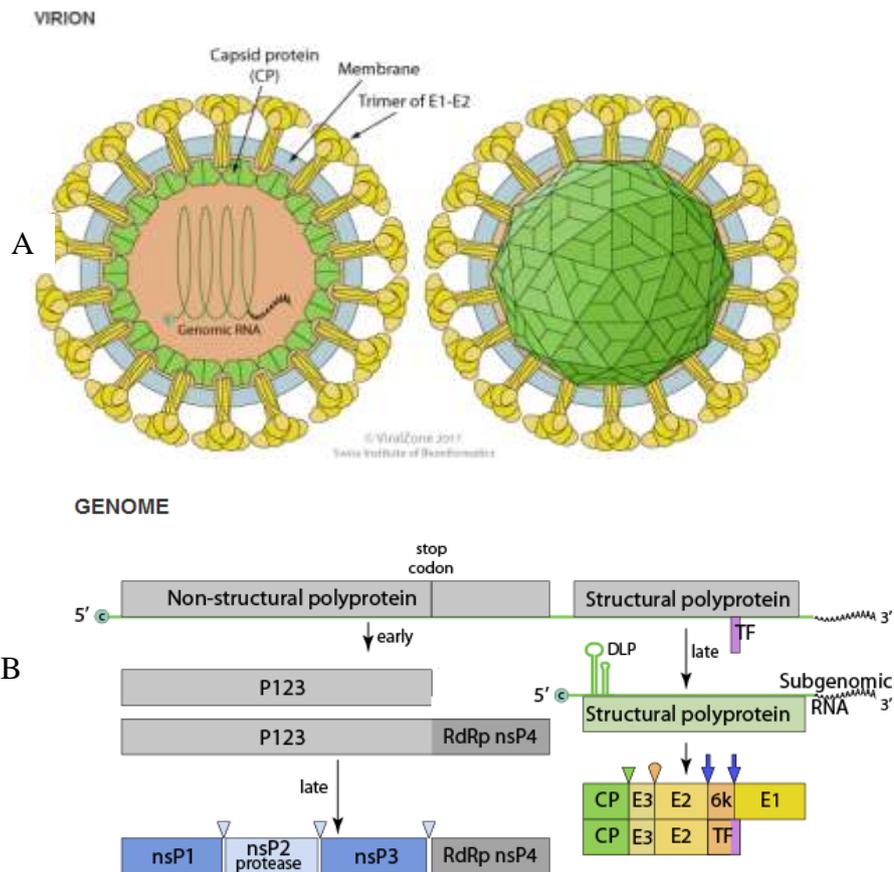
2.3.2 Vírus Chikungunya e vírus Mayaro

Da família *Togaviridae*, o vírus Chikungunya CHIKV também é transmitido por espécies do gênero *Aedes*. A doença provocada por este vírus apresenta quadro clínico geral similar às outras arboviroses citadas, porém o que chama atenção para a doença causada pelo CHIKV são quadros de poliartralgia severa, muitas vezes prolongadas. Além do CHIKV, o vírus Mayaro (MAYV), membro da mesma família e gênero viral, é transmitido por mosquitos do gênero *Haemagogus*. Tecnicamente é uma doença típica de áreas de florestas, comumente encontrada entre moradores de áreas rurais (TESH, 1999), contudo nas últimas décadas tem sido detectado em áreas urbanas (MOURÃO, 2013). Estudos mostram que o *Aedes aegypti* em laboratório, se mostrou competente para transmissão do MAYV, podendo representar um risco potencial para transmissão urbana (MACKAY e ARDEN, 2016).

Os membros da família *Togaviridae*, do gênero *Alphavirus*, são vírus envelopados, esféricos, com nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e diâmetro entre 65-70nm. O genoma é constituído por RNA de fita simples polaridade positiva de aproximadamente 11 Kb, o qual é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases do hospedeiro e viral. A

poliproteína dá origem as proteínas estruturais é codificada através de um mRNA subgenômico. (VIRALZONE, 2017; LOPES, 2014).

FIGURA 8 – Partícula infecciosa e o genoma de um membro do gênero *Alphavirus* – (A) O virion mostrado em corte transversal com exposição do genoma dentro da partícula viral. (B) Tradução do genoma em poliproteína estruturais (Capsídeo, Membrana e trimeros de E1-E2) e poliproteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e RdRp nsP4).



Fonte: <http://viralzone.expasy.org/625> - acesso em: 18/07/2017

Entre o gênero *Alphavirus*, são destacados nesta dissertação o CHIKV e MAYV, o primeiro se tornou de importância em saúde pública em função da distribuição em diversos países e do potencial em causar doença crônica, tornando o paciente por vezes inativo do ponto de vista laboral. O vírus ficou conhecido por causar epidemias na África, Índia e Sudoeste da Ásia, pode ainda ter causado epidemias no Caribe e Estados Unidos no início do séc. XIX (LANCIOTTI, 2007).

O potencial epidêmico do CHIKV é similar ao de outras arboviroses como a dengue e a zika, pois é transmitido pelo mesmo vetor de manutenção dessas doenças. Entre abril de 2005 e junho de 2006 foram reportados aproximadamente 270.000 casos nas Ilhas de Reunião, na costa leste africana, representando 40% da população local (LANCIOTTI, 2007).

No Brasil o sistema de vigilância ficou de sobreaviso em virtude dos casos preocupantes de cronicidade que a febre chikungunya pode desencadear. A partir da portaria de nº 204 de 17 de fevereiro de 2016, a doença passa a incorporar a lista de Doenças de Notificação Compulsória, onde todos os casos suspeitos devem ser notificados e registrados no SINAN, em caso de óbito a notificação é imediata, em até 24hs. No país os primeiros casos autóctones foram confirmados no segundo semestre de 2014 (MS, 2016).

Em 2015, da SE 01 a SE 52 foram registrados 38.332 casos prováveis de febre chikungunya, com a confirmação de 06 óbitos, 03 na Bahia e 01 em cada um dos demais estados: Sergipe, São Paulo e Pernambuco. Em 2016 até a SE 27 foram registrados 169.656 casos prováveis de febre chikungunya no país, nesse período foram confirmados 38 óbitos. A região Norte notificou 4.809 casos e o estado Amazonas registrou 568 casos prováveis* de febre chikungunya no período (MS, 2016).

O vírus *Mayaro*, tem ampla dispersão em regiões florestais, com sintomas clínicos similares a outras arboviroses. Esse vírus foi isolado de trabalhadores doentes da floresta em Trindade em 1954 e tem como principal vetor os mosquitos da espécie *Haemagogus janthinomys*, um vetor silvestre que vive em florestas e áreas de vegetação a beira dos rios, não sendo possível o seu controle, já que está no seu habitat natural (TESH et al, 1999; MOURÃO et al, 2013).

A doença tem características similares a dengue em sua fase inicial, com o aparecimento de erupções cutâneas em torno do quinto e sextos dias, a presença de artralgia semelhante à chikungunya, fato que dificulta o diagnóstico clínico da doença fortalecendo a importância do diagnóstico laboratorial (TESH et al, 1999). Por não ser uma doença de notificação compulsória e o diagnóstico laboratorial não está disponível na maioria dos laboratórios, pode haver um número subestimado de casos (DUTRA et al, 2016).

O MAYV tem um potencial de transmissão pelos mosquitos do gênero *Aedes* mostrado em estudos experimentais, onde foi observado que o vírus é altamente infeccioso tanto, ao *Aedes aegypti*, como ao *Aedes albopictus*, porém não há comprovação de transmissão entre os vetores e os seres humanos (SMITH, 1991; LONG et al, 2011). O aumento no desmatamento, bem como o ecoturismo, pode propiciar uma maior circulação do vírus em áreas periurbanas (DUTRA et al, 2016). Grandes eventos como a copa do Mundo de 2014 e as Olimpíadas de 2016 que ocorreram no Brasil, levaram a alguns estudos em torno das arboviroses principalmente apontando áreas na região Amazônica, na qual o potencial de transmissão seria maior (SLEGERS et al, 2014).

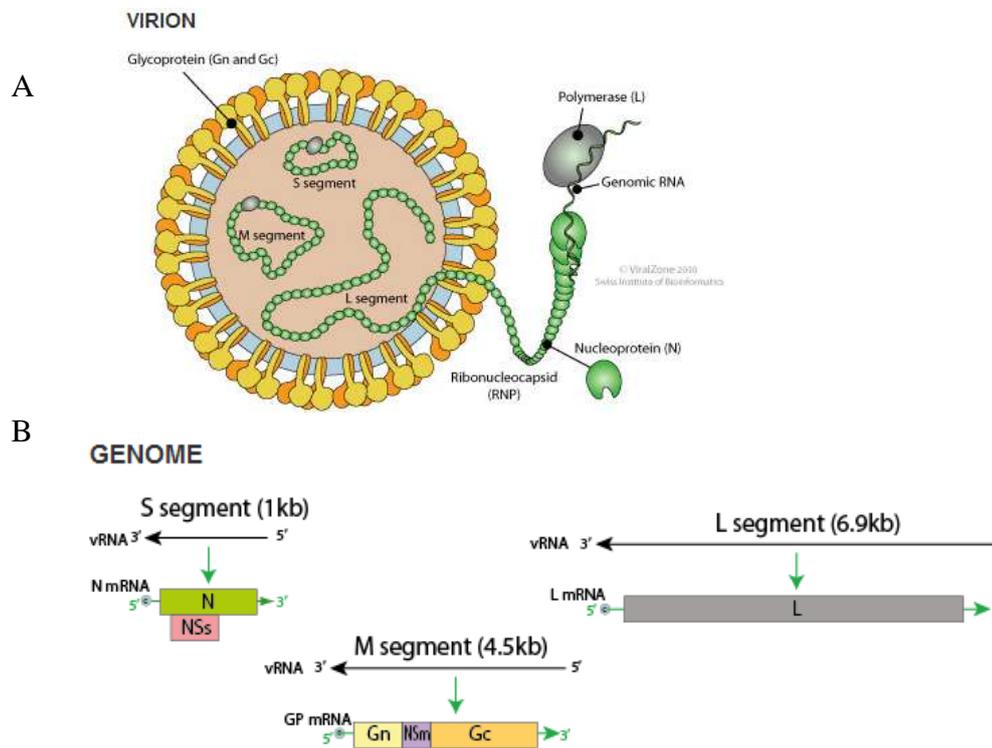
* Casos prováveis, sem confirmação laboratorial. Em julho de 2015 foram detectados os primeiros casos autóctones de Chikungunya no Amazonas com confirmação laboratorial.

A doença na fase aguda apresenta quadros febris acompanhados de erupções cutâneas, mialgia, diarreia e vômito, bem como poliartralgia intensa, assemelhando-se a causada pela febre chikungunya, (SLEGERS et al, 2014). Até o momento não existe uma droga eficaz para o tratamento da infecção pelo MAYV. Assim como para outras arboviroses o tratamento é voltado aos sintomas da doença, porém a expectativa de uma vacina que possa ser ativa contra os membros do gênero *Alphavirus* é promissora (MACKAY e ARDEN, 2016).

2.3.3 Vírus Oropouche

Pertencente à família *Peribunyaviridae* (ICTV, 2016), o OROV tem como vetor primário o *Culicoides paraensis*, conhecido pelo nome popular de maruim (MESSIAS, 2011). O transmissor do vírus é comumente encontrado na região Amazônica, o que pode acarretar na sua transmissão atingindo populações do ocidente ao oriente da região Amazônica (VASCONCELOS, 2009). O quadro clínico causado pela infecção por este vírus é similar aos de outras arboviroses o que dificulta o seu diagnóstico, especialmente quando se trata da região Amazônica, que é endêmica para outras arboviroses como a dengue, além da malária (TERZIAN, 2009).

FIGURA 9 – Partícula infecciosa de um vírus do gênero *Orthobunyavirus*. (A) expressão da partícula viral em corte mostrando os três segmentos genômico e (B) o genoma completo



Fonte: http://viralzone.expasy.org/250?outline=all_by_species – acesso em 18/07/2017

O gênero *Orthobunyavirus* compreende 48 espécies, na qual está o *Oropouche orthobunyavirus*, são vírus esféricos, envelopados, medindo entre de 80 a 120nm. O genoma é de RNA polaridade negativa de cadeia simples, constituído por três segmentos, os quais são representados por L (Large) de 6.9Kb; M (Medium) de 4.9Kb e S (Small) de 1kb (ICTV, 2016; VIRALZONE, 2017). O segmento L codifica para uma proteína que tem atividade de polimerase e na transcrição do RNA genômico. O segmento médio codifica uma poliproteína precursora, a qual dá origem a duas glicoproteínas de superfície viral, Gc e Gn, e uma proteína não estrutural (NSm). O pequeno segmento codifica uma proteína estrutural (N) do nucleocapsídeo e uma proteína não estrutural (NSs) (VASCONCELOS et al, 2008; VASCONCELOS et al, 2011).

O vírus foi inicialmente isolado em 1954, no município Vega de Oropouche em Trinidad, o nome é originário do local de isolamento. No Brasil foi isolado pela primeira vez em 1960 do sangue de uma preguiça (VASCONCELOS et al, 2008). O vírus apresenta grande potencial epidêmico e sua transmissão se dá pelo vetor *Culicoides paraensis*, conhecido popularmente pelo nome de maruim, mosquito pólvora, entre outros. São insetos bem pequenos medindo aproximadamente 1 a 2 mm e só as fêmeas se alimentam de sangue. São muito comuns em regiões urbanas próximas a florestas, pois se reproduzem em ambientes úmidos (MESSIAS, 2011).

A descrição do vírus em epidemias tem seu início marcado com o envolvimento de aproximadamente 11.000 pessoas atingidas por um surto na década de 1960 no Brasil no estado do Pará. Atualmente a febre causada pelo OROV está distribuída entre outros países além do Brasil, como Argentina, Panamá e Peru (VASCONCELOS et al, 2008; TILSTON-LUNEL, et al, 2016); A doença causada pelo OROV, assim como pelo MAYV, pode acometer milhares de pessoas anualmente em áreas endêmicas para os vírus (VASCONCELOS et al, 2011).

Talvez o número de casos de febre Oropouche seja superior ao de Febre Mayaro, em virtude do transmissor estar presente em áreas urbanas e periurbanas. O fato da doença não ser de notificação compulsória e estar presente no mesmo ambiente que outras arboviroses de importância médica como, por exemplo, a dengue possa favorecer que a mesma, passe de forma despercebida (ROSA et al, 2017). Há registros que até a década de 1980, várias epidemias envolvendo o OROV, ocorreram na região Amazônica, envolvendo principalmente o estado do Pará. Desde então outras áreas da região foram comprometidas como a capital Manaus e município de Barcelos no estado do Amazonas (VASCONCELOS et al, 1989).

A febre oropouche é caracterizada por dor de cabeça, mialgia, artralgia, anorexia, tontura, arrepios, erupções cutâneas, fotofobia, náuseas e vômito, porém em alguns casos os

pacientes podem manifestar quadros de encefalite e meningite (TILSTON-LUNEL et al, 2016). Casos envolvendo o vírus e pacientes com meningoencefalite no estado do Amazonas foram descritos em 2011, sugerindo a capacidade do vírus de transpor a barreira hematoencefálica (BASTOS et al, 2012; ROSA et al, 2017). Um fato interessante envolvendo a patogênese do vírus é a recorrência dos sintomas uma a duas semanas após a manifestação da fase aguda (VASCONCELOS et al, 1989).

2.4 Controle do *Aedes aegypti*

O Brasil tem uma luta histórica contra os mosquitos do gênero *Aedes*, chegando inclusive a erradicá-lo em dois momentos no século XX, nas décadas de 1950 e 1970 (VALE-BRAGA, 2007). A espécie *Aedes aegypti* é o principal vetor de transmissão de vírus como Dengue, Zika e Chikungunya em todo mundo e é capaz de transmitir outros diferentes tipos de arbovírus (KRAEMER et al, 2015). Atualmente entre as arboviroses, a dengue é a doença que apresenta o maior impacto, pois acomete milhões de pessoas anualmente elevando as taxas de morbidade e mortalidade (KASSIM, 2011).

Situado no cone Sul do continente Americano, o Brasil se destaca por apresentar o maior número de casos suspeitos de dengue nas Américas (OMS, 2016). Além da dengue, o risco para a emergência de novas arboviroses está relacionado diretamente com a expansão das cidades, o crescimento demográfico de forma desordenada e as viagens internacionais (GUBLER, 2006). A falta de infraestrutura e saneamento básico inadequado também contribui para infestação do vetor em áreas urbanas, (FIGUEIREDO, 2007).

O *Aedes aegypti* foi considerado erradicado nas Américas, especialmente no Brasil na década de 1970, porém ainda na mesma década houve o retorno de focos por falha no sistema de controle e vigilância (VALE-BRAGA, 2007). Outro vetor da dengue e de vários outros arbovírus, o *Aedes albopictus*, é encontrado nas Américas e no Brasil, apresentando ampla dispersão em todas as regiões do país. O *Aedes albopictus* é o principal vetor de manutenção da dengue na Ásia, no entanto a importância do seu papel nos casos de dengue nas Américas é incerta (MS, 2014). Esse vetor está mais relacionado à transmissão em áreas periurbanas e ambientes rurais (KRAEMER, 2015).

O controle da transmissão é praticamente nulo para os vetores silvestres. Quando o homem invade o habitat natural dos vetores, seja por ecoturismo, ou para atividades de agricultura, podem-se tornar hospedeiros acidentais. Nesse contexto os repelentes, vacina no caso da febre amarela e a proteção através de vestimenta, são as principais formas de prevenção (KRAEMER et al, 2015). Recentemente foi observado que além de albergar mais

de um arbovírus, o *Aedes aegypti* é capaz de transmitir ambos simultaneamente (RUCKERT et al, 2017).

3 OBJETIVOS

Detectar e caracterizar a presença do vírus dengue, em amostras biológicas com resultados Não Reagentes nos testes NS1, avaliando se houve falha diagnóstica, ou se existem outras arboviroses circulando no estado do Amazonas, cujos sintomas confundem com a dengue.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Pesquisar a presença de material genético do vírus dengue em amostras com resultados Não Reagentes para o antígeno NS1.

3.1.2 Identificar os sorotipos e genótipos das amostras que apresentarem resultados positivos para vírus dengue;

3.1.3 Pesquisar anticorpos das classes IgG e IgM para o vírus dengue.

3.1.4 Investigar a presença de material genético de outros arbovírus circulantes no estado do Amazonas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Esta é uma pesquisa de aspectos epidemiológicos, na qual se aplica o modelo de estudo transversal para o seu desenvolvimento. A pesquisa transversal é definida por ROUQUAYROL, 1994 como “*o estudo epidemiológico no qual fator e efeito são observados em um mesmo momento histórico*”. Os recursos utilizados para ao desenvolvimento da pesquisa envolveram levantamento de literatura, testes laboratoriais e informações pertinentes aos sujeitos envolvidos, as quais foram adquiridas por meio de ficha epidemiológica, ou banco de dados epidemiológicos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos da Universidade Estadual do Amazonas, PARECER: 1418156.

4.2 Obtenção das amostras

Para esse estudo, foram usadas amostras biológicas pertencentes à soroteca do Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Amazonas (LACEN-AM), vinculado a Fundação de Vigilância em Saúde (FVS-AM). O LACEN trabalha no diagnóstico laboratorial das doenças de notificação compulsória, conforme portaria 1.271 de 06 de junho de 2014, dando suporte às ações de vigilância no estado do Amazonas. Portanto as amostras recebidas para análises são originárias de aproximadamente 62 municípios, incluindo a capital Manaus.

O Amazonas está dividido em nove Regiões de Saúde e um Centro Regional. Tal processo visa à descentralização do SUS dos estados, ou seja, passando as responsabilidades cabíveis da atenção básica aos municípios. Com a regionalização os recursos para os serviços de saúde centraram-se nos municípios polos, os quais somam o atendimento aos seus circunvizinhos, teoricamente aumentando a qualidade no atendimento à saúde da população. O Centro Regional compreende o município de Manaus e as regiões estão representadas a seguir com os seus respectivos municípios polo.

I – Alto Solimões: Tabatinga e São Paulo de Olivença;

II – Triângulo: Fonte Boa e Tefé;

III – Purus: Lábrea e Boca do Acre;

IV – Juruá: Eirunepé;

V – Madeira: Manicoré e Humaitá;

VI – Alto Rio Negro: Barcelos e São Gabriel da Cachoeira;

VII – Rio Negro e Solimões: Autazes, Careiro, Coari e Manacapuru;

VII – Médio Amazonas: Itacoatiara;

IX – Baixo Amazonas: Maués e Parintins.

Das Regiões de saúde, sete foram contempladas no estudo com um, ou mais municípios representantes, entre elas estão: o Centro Regional; regiões do alto Rio Negro; baixo Amazonas; médio Amazonas; rio Madeira; rios Negro/Solimões e região do Triângulo (rios Jutáí, Solimões e Juruá).

4.3 Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN-AM

O Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amazonas – LACEN-AM foi criado através da Port. N° 126/72 SESAU, considerando os termos do decreto n° 2.136, de 07 de julho de 1971, no seu capítulo II, artigo 15 do decreto n° 2.349, de 03 de agosto de 1972, no seu artigo 1º, item I, sendo inaugurado em outubro de 1973, pelo então Secretário de Saúde Antônio Ricci. No ano de 2004, foi incorporado à Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas, pela lei 2.895 de 03 de junho do mesmo ano.

O LACEN tem suas atividades voltadas ao trabalho de prevenção, controle de doenças e promoção da saúde, integrando a Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB), atendendo às demandas do Sistema Único de Saúde (SUS) nas áreas relacionadas às vigilâncias sanitária, epidemiológica e ambiental. Faz parte do SISLAB instituído por meio da Portaria Ministerial n.º 280, de 21 de julho de 1977, com a finalidade de apoiar o Sistema Nacional da Vigilância Epidemiológica, bem como definir ações para apoiar o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária.

4.4 Seleção das Amostras do estudo

As amostras biológicas analisadas compreendem o período de janeiro de 2011 a junho de 2016, as quais estavam armazenadas em freezers -30° e -80°C, pertencentes à demanda espontânea do LACEN-AM. Durante esse período o LACEN recebeu aproximadamente 3.400 amostras para pesquisa do antígeno NS1 do vírus dengue, as quais estavam distribuídas entre sangue total, soro e plasma.

Desse total de amostras, constavam aquelas, com resultados “Reagentes”, “Não Reagentes” e “Indeterminados”. Durante a catalogação das amostras, observou-se que nem todas elas estavam dentro do período oportuno para pesquisa do antígeno NS1. Portanto, foram criados os seguintes critérios de elegibilidade para este estudo:

a) as amostras para entrar no estudo precisaram estar com resultados “Não Reagentes” para o antígeno NS1 do vírus da dengue;

b) tiveram que obedecer aos critérios de coleta conforme protocolo do Ministério da Saúde para a pesquisa do Antígeno NS1, constante no Guia de Vigilância Epidemiológica de 2014;

c) apresentar ficha de notificação, nas quais constassem pelo menos data de coleta e início de sintomas;

d) tinham que ter no mínimo 200ul de material;

e) precisavam ser soro, ou plasma.

Após a seletiva as amostras que atenderam aos requisitos para participarem do estudo totalizaram 1.512.

4.5 Desenho amostral

Partindo da premissa de um estudo anterior (não publicado) onde em universo de 368 amostras negativas para NS1, 86 apresentaram resultados positivos para anticorpo IgM. Traçou-se uma estimativa com erro amostral de 5% e um intervalo de confiança de 95% que no universo de 1.512 amostras, um percentual máximo de aproximadamente 48% apresentaria resultados positivos para dengue, ou outros arbovírus.

A partir desse cálculo obtivemos um quantitativo de 306 amostras, as quais foram sorteadas entre as 1.512 amostras, de maneira que representassem as variáveis categóricas e numéricas: sexo, municípios, idade, bem como o ano de recebimento das amostras. Com exceção de 2012 todos os anos foram contemplados no sorteio. É fato que entre as 1.512 amostras, o número de amostras da capital foi superior as do interior, representando um percentual de 85% (1299) e o interior representado por 15% (213).

Diante desses percentuais, não foi possível usar a pirâmide de frequência populacional na qual o percentual representativo da idade é feito de 5 em 5 anos. Buscando critérios para agrupar por idade de maneira que atendesse a necessidade do estudo, usamos como referência as categorias adotadas pelo SUS. De acordo com o DATASUS os indivíduos são agrupados em: menor de 01 ano; de 01 – 04 anos; de 05 – 09 anos; de 10 – 19 anos; de 20 – 39 anos; de 40 a 59 anos e maiores de 60 anos. Essas faixas são usadas nos indicadores de morbidade e fatores de riscos.

4.6 Sorteio das amostras

Para o sorteio das amostras o primeiro passo foi separar a população do interior da capital, a qual foi feita após o cálculo de 15% sobre as 213 amostras do interior e 85% sobre as 1299 da capital, obtendo-se 46 amostras para o interior e 260 para a capital, em seguida os indivíduos foram agrupados por idade e sexo. As amostras de 2012 que atendiam aos critérios

de participação no estudo totalizaram 38, porém não foram contempladas no sorteio. Os grupos receberam numeração sequencial de acordo com o quantitativo de amostras e foram submetidos a um sorteio eletrônico.

4.7 Dados dos Sujeitos da Pesquisa

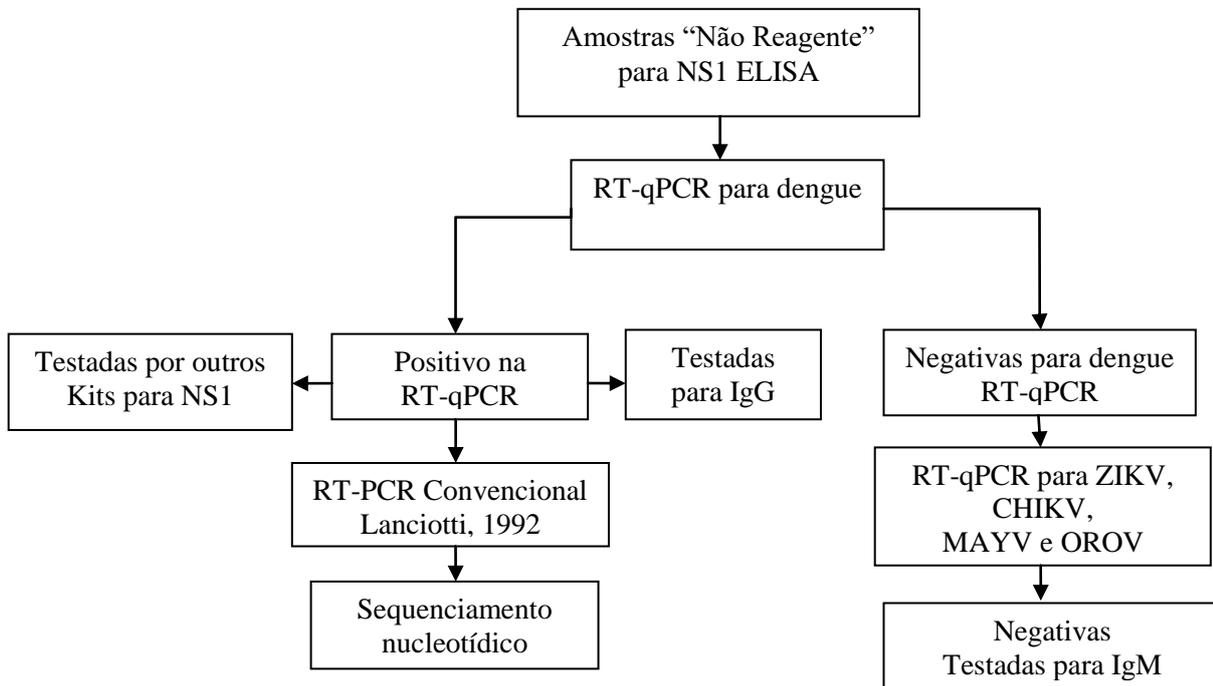
Para esse estudo, alguns dados referentes aos sujeitos da pesquisa foram necessários, como: idade, sexo, local de residência, local de trabalho, últimas viagens, data de início dos sintomas da doença e data de coleta do material biológico. Os dois últimos informes se constituem como fator chave para a pesquisa do agente etiológico e a metodologia empregada no diagnóstico, tendo em vista que existe um período oportuno para que cada teste seja executado. O local de viagem, trabalho e residência, são dados estimáveis para as ações de vigilância

ia e bloqueio em caso de surtos. Todos esses dados foram fornecidos pelo LACEN-AM, por meio eletrônico e/ou físico. Aqui os dados divulgados são apenas os de importância para o agente viral e epidemiologia o sujeito em si, permanece protegido em anonimato. Além disso, não houve nenhum contato com os participantes da pesquisa, apenas com o material biológico, para o qual se buscou o agente viral.

4.8 Etapas para testagem das amostras

Todo processo de testagem das amostras aconteceu nos laboratórios do ILMD/FIOCRUZ, seguindo as etapas de acordo com o fluxograma a seguir, o qual mostra de forma resumida a sequência dos procedimentos.

FIGURA 10 – Fluxograma de inclusão de amostras na sequencia de testagem



4.9 Extração do material genético viral

Nos laboratórios da FIOCRUZ as amostras de soro, plasma, foram submetidas à extração de RNA utilizando o kit comercial *QIAamp viral RNA mini kit*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

FIGURA 11 – kit usado na extração do material genético



Fonte: [https://www.selectscience.net/products/qiaamp-viral-rna-mini-kit-\(250\)/?prodID=114984](https://www.selectscience.net/products/qiaamp-viral-rna-mini-kit-(250)/?prodID=114984) – acesso em: 12/08/2017

4.10 Pesquisa do material genético do vírus dengue

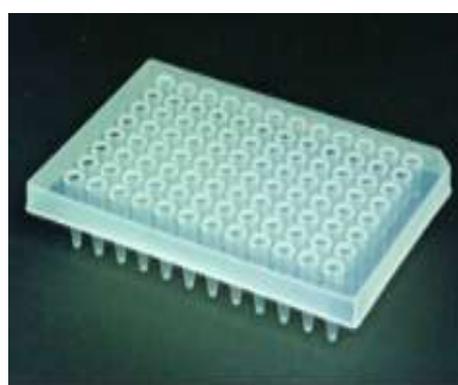
Todas as amostras incluídas no estudo foram submetidas aos protocolos de detecção por RT-qPCR para dengue (GURUKUMAR et al 2009), utilizando o equipamento StepOnePlus, (Thermo Scientific), pertencente à Plataforma de PCR em tempo Real (RPT009G) da FIOCRUZ, para confirmação da presença do genoma viral. Amostras positivas na RT-qPCR foram submetidas ao protocolo de RT-PCR convencional (Lanciotti et al 1992).

FIGURA 12 – Equipamento utilizado na RT-qPCR (A) e microplacas utilizadas para amplificação (B)

A



B



Fonte: http://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/applied-biosystems-steponeplus-real-time-pcr-system_9777/ <http://www.prolab.com.br/produtos/materiais-de-plastico/microplacas-para-pcr/microplaca-para-pcr-96-pocos-meia-borda> - acesso em 12/08/2017

4.11 Caracterização do sorotipo do vírus dengue

Para a caracterização dos sorotipos foi realizado o ensaio de RT-PCR descrito por Lanciotti (1992), o qual é feito em duas etapas. Na primeira rodada é feita a transcrição reversa das sequências de RNA, seguida do primeiro round de amplificação por PCR. Em seguida é realizada uma reação de semi-nested PCR para aumentar a sensibilidade do teste e promover a identificação dos sorotipos, os quais são identificados pelo tamanho do fragmento na eletroforese em gel de agarose.

Os produtos de amplificação foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico capilar. Os arquivos gerados foram utilizados para montagens do *contig*, edição das sequências e obtenção das sequências finais em formato FASTA no programa Geneious 10.2.2. Posteriormente os genótipos das amostras do vírus Dengue foram identificados com a ferramenta Dengue, Zika & Chikungunya Viruses Typing Tool Version 1.0, disponível em: <http://bioafrica2.mrc.ac.za/reg-a-genotype/typingtool/aedesviruses/>

4.12 Testagem por métodos clássicos

O LACEN utilizou três diferentes Kits comerciais, no período de 2011 a 2016, para testagem do antígeno NS1, entre eles o *DxSelect* da FOCUS diagnóstico, *PANBIO* da ALERE e *PLATELIA* da BIO-RAD, conforme imagem.

FIGURA 13 – Kits utilizados para testagem por ELISA: (A) FOCUS, (B) PANBIO e (C) BIORAD.

A



B



C



Fonte: <http://www.bio-rad.com/en-se/sku/72830-platelia-dengue-ns1-ag>/<http://www.alere.com/en/home/product-details>/<https://www.indiamart.com/focus-diagnostics/dxselecttm-serology-products.html> - acesso em 12/08/2017

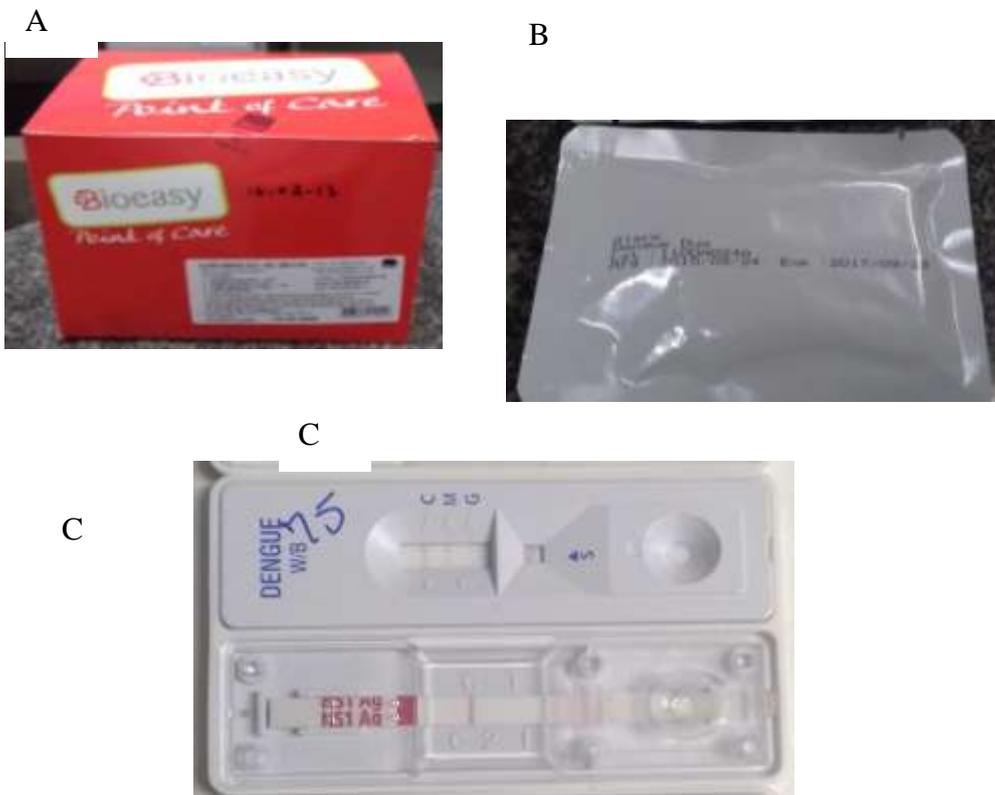
Os testes comerciais de ELISA para detecção do antígeno NS1 são constituídos por:

- Placa contendo micropoços revestidos com anticorpos Anti-NS1;
- Anticorpos monoclonais Anti-NS1 conjugados com HRP;
- Solução tampão de lavagem (salina tamponada com fosfato e Tween 20);
- Diluente de amostras (solução salina tamponada com Tris);
- Cromógeno TMB (mistura de 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio em tampão citrato);
- Solução de parada (ácido fosfórico 1M);

- Controle positivo (antígeno recombinante);
- Controle Negativo (soro humano);
- Calibrador (antígeno recombinante).

As análises sorológicas nesse estudo foram realizadas pelo método imunocromatográfico, com o teste comercial da Bioeasy DENGUE DUO – NS1, IgM e IgG da ALERE, e pelo método de ELISA para pesquisa da proteína NS1 e de anticorpos das classes IgM e IgG, foram usados os kits da PANBIO/Alere e VIRION/SERION respectivamente.

FIGURA 14 – Teste rápido para dengue (A) kit, (B) cassete fechado e (C) cassete pronto uso.



Fonte: Acervo pessoal

4.13 Pesquisa de outros arbovírus

As amostras negativas nos testes para dengue foram submetidas à pesquisa de outros arbovírus de importância médica pelo método de RT-qPCR. Foram pesquisados os vírus Chikungunya, Zika, Mayaro e Oropouche utilizando os protocolos desenvolvidos pela equipe de virologia do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD). O método para a detecção de

CHIKV e ZIKV não está publicado, enquanto que o método para MAYV e OROV multiplex foi publicado recentemente (NAVECA et al, 2017)

4.14 Análises estatísticas

Os dados iniciais (p. ex. quantitativo de amostras anual entre outros) foram analisados por estatística descritiva. Os demais dados sócio-demográficos, incluindo status sorológico (IgG positiva para dengue) foram analisados quanto ao seu significado em relação ao desfecho do diagnóstico laboratorial por NS1, como covariáveis em modelo de regressão logística múltipla, o software estatístico utilizado foi o R 3.4.1, com pacotes diversos. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Os testes estatísticos utilizados nos cruzamentos com variáveis qualitativas foi o Teste Quiquadrado e o Teste Exato de Fisher Generalizado para qualquer tabela cruzada (AGRESTI e FINLAY, 2012). Foi utilizado o intervalo de confiança (95%) para média utilizando o método bootstrap. Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

5 FONTE DE FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado com recurso do projeto: Epidemiologia molecular da Dengue no Estado do Amazonas: Filogeografia e fatores associados à falha na detecção sorológica do antígeno NS1- CHAMADA FAPEAM//SUSAM-SES/MS/CNPq 001/2013 – PPSUS.

6 RESULTADOS

Entre janeiro de 2011 e junho de 2016, o LACEN recebeu 3.573 amostras para pesquisa do antígeno NS1 do vírus dengue. De abril de 2012 a junho de 2016, 2.930 (dois mil, novecentos e trinta) pacientes foram cadastrados no Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), com suspeitas clínicas de dengue e solicitação de pesquisa para o antígeno NS1 do DENV. Desse total foram recebidas pelo LACEN-AM 2.709 (duas mil setecentos e nove) amostras biológicas, das quais 53 (cinquenta e três) por vários fatores não tiveram suas análises concluídas, entre eles: cadastro incorreto da amostra, requisição sem amostra, preenchimento inadequado da requisição/ficha de investigação, recipiente sem amostra, amostra imprópria para análise solicitada, entre outras. Dessa maneira restaram 2.654 (duas mil, seiscentos e cinquenta e quatro) amostras, dentre essas, 2.409 (duas mil, quatrocentos e nove) com resultados “Não Reagentes”, 53 (cinquenta e três) “Indeterminadas” e 247 (duzentos e quarenta e sete) “Reagentes” para o antígeno NS1 do DENV, valores apresentados na tabela 03. Para esse estudo os resultados das análises foram interpretados como: negativo, positivo e indeterminado (diferentes da interpretação do LACEN-AM: Reagente, Não Reagente e Indeterminado).

TABELA 1 – Total de amostras recebidas no LACEN para a pesquisa do antígeno NS1 do vírus dengue por ano. Na coluna 1: ano de recebimento; coluna 2 amostras recebidas, mas não realizadas; coluna 3 amostras “Reagentes” para o antígeno NS1; coluna 4 “Não reagentes”; coluna 05 “Indeterminadas”.

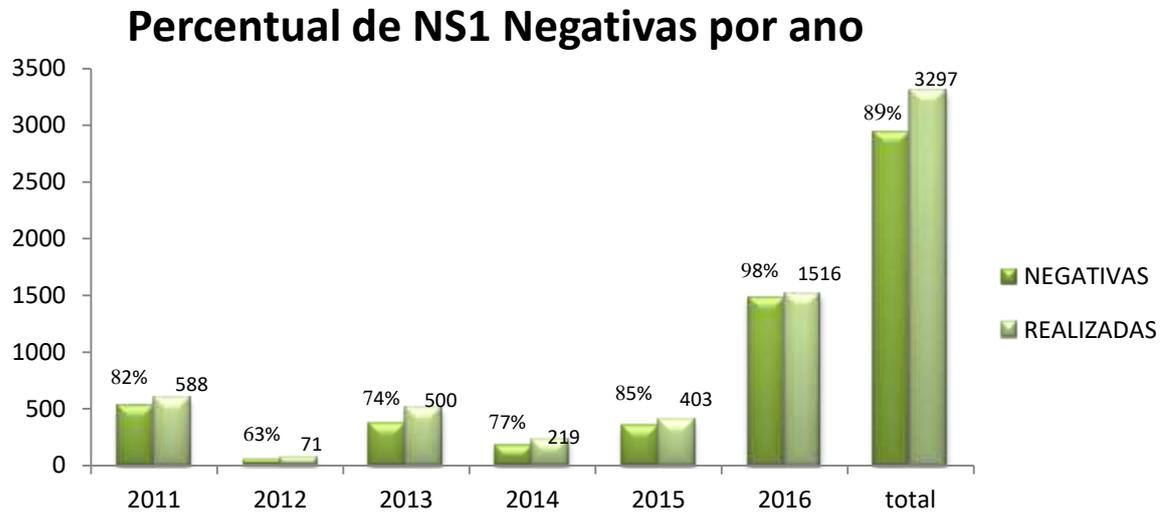
Ano	Não realizadas	Reagentes	Não Reagentes	Indeterminadas	Total
2011	55	39	527	22	643 (18%)
2012	02	20	45	06	73 (2%)
2013	13	101	370	29	575 (16%)
2014	01	41	172	06	229 (6,4%)
2015	07	54	341	08	439 (12,6%)
2016	30	31	1481	04	1614 (45%)
Total	108(2,6%)	286(8%)	2936(82,6%)	75(2%)	3573(100%)

Fonte: LACEN-AM

Em 2011 foram testadas 588 amostras para pesquisa do antígeno NS1 do vírus dengue, desse número, 527 (82%) foram negativas. Em 2012, das 71 amostras testadas, 45 (63,3%) apresentaram resultado negativo para NS1. Em 2013 de 500 amostras testadas, 370 (74%) foram negativas. Em 2014 de 219 amostras testadas, 172 (77%) foram negativas. Em 2015 de 403 amostras testadas, 341 (85%) foram negativas. Em 2016, até o mês de junho, das 1516 amostras testadas, 1481 (98%) apresentaram resultado negativo. No GRAF. 01 estão

representados os resultados em percentual, das amostras com resultados Negativos para o antígeno NS1, e a representação do quantitativo realizado por ano de recebimento.

GRÁFICO 1– Representação em percentual das amostras Negativas por ano, em relação ao total de realizadas.



Fonte: LACEN-AM

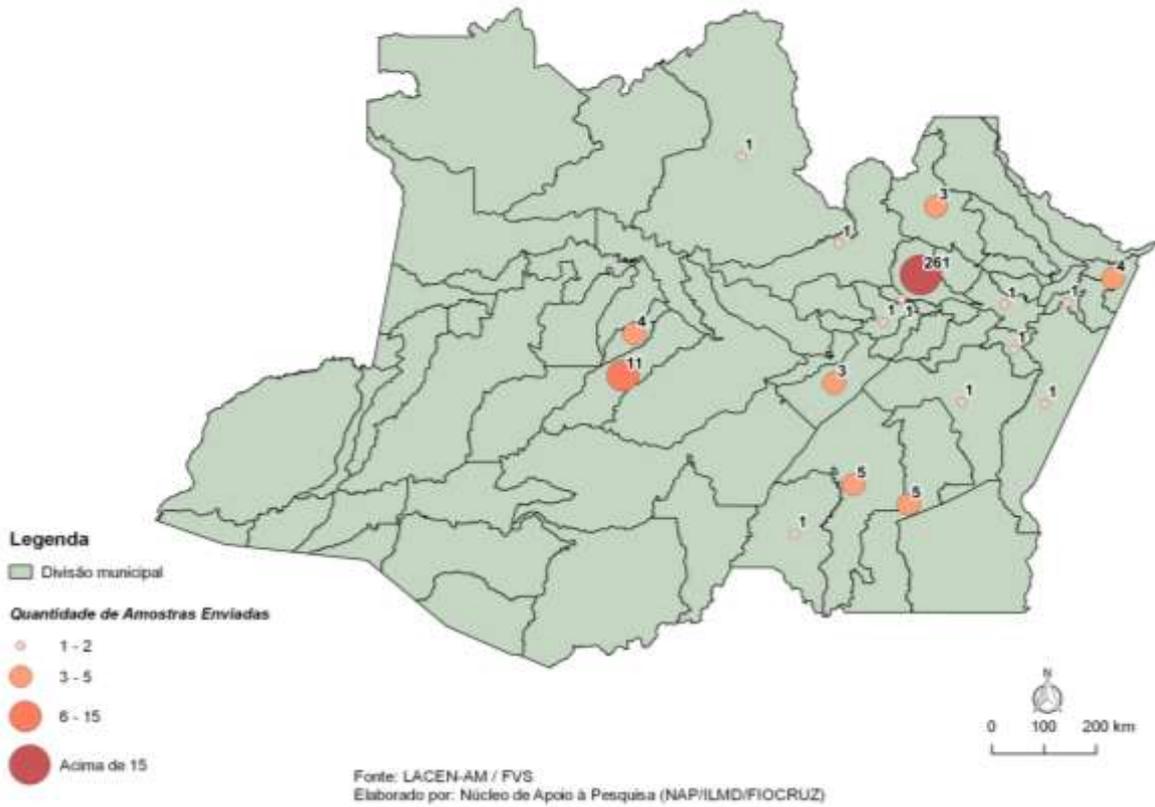
As solicitações para a pesquisa do vírus dengue por meio do antígeno NS1 ocorrem durante o ano todo, porém em alguns anos esses pedidos tendem a se exacerbar. A partir das amostras sorteadas foi traçado um perfil de solicitação para cada ano, bem como os municípios com maior frequência de envio, dados observados no QUADRO 02 e FIG. 15.

QUADRO 1– Solicitação para pesquisa do antígeno NS1, segundo distribuição anual e mensal das 306 amostras do estudo.

Município	2011	2013	2014	2015	2016	Total Geral
Alvarães	0	0	0	4	0	4
Barcelos	0	0	0	1	0	1
Beruri	0	0	0	0	3	3
Boa Vista do Ramos	0	0	0	0	1	1
Borba	0	1	0	0	0	1
Humaitá	0	0	0	0	1	1
Iranduba	0	0	0	0	1	1
Itacoatiara	0	0	0	0	1	1
Manacapuru	0	0	0	1	0	1
Manaus	66	3	2	24	166	261
Manicoré	0	0	0	1	4	5
Maués	0	0	0	1	0	1
Nova Olinda do Norte	0	0	0	0	1	1
Novo Airão	0	0	0	0	1	1
Novo Aripuanã	0	0	0	1	4	5
Parintins	0	0	1	2	1	4
Presidente Figueiredo	0	1	0	1	1	3
Tefé	0	0	2	5	4	11

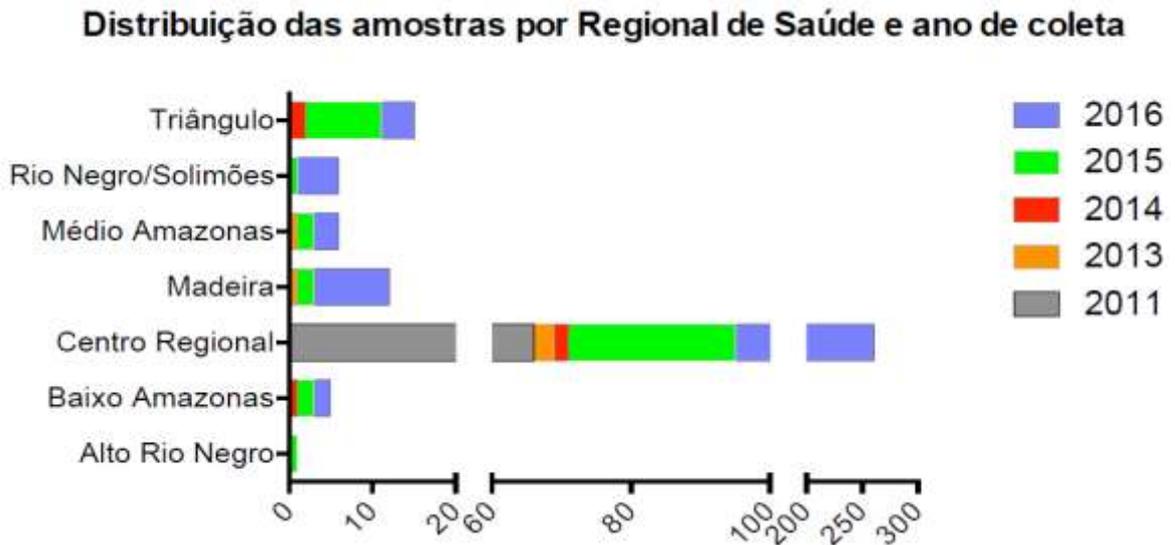
Fonte: LACEM-AM

FIGURA 15 – Mapa representativo da distribuição das 306 amostras incluídas no estudo, por municípios de origem.



Quando observamos os pedidos por Regionais de Saúde, há uma concentração maior para o centro Regional, seguido pela região do Madeira e Triângulo, as demais regiões apresentam baixa expressividade, GRAF. 02.

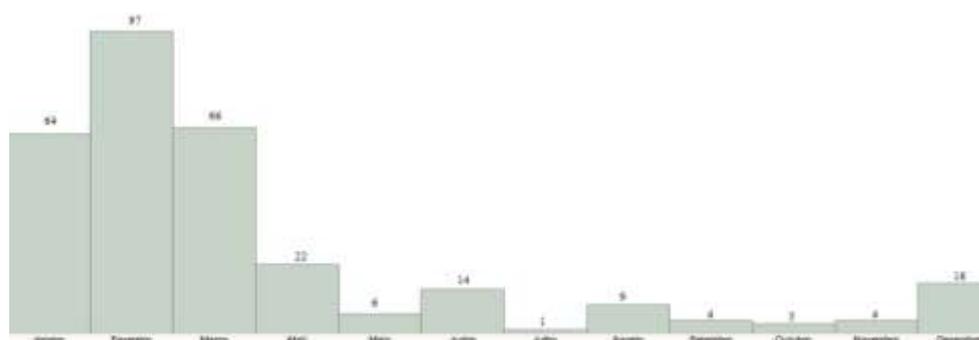
GRÁFICO 2 – Solicitação de pesquisa para antígeno NS1 pelas regiões de Saúde do estado do Amazonas e sua distribuição anual.



Fonte: LACEN – AM

Os casos de dengue podem ser observados ao longo de todos os meses do ano, porém quando observamos os pedidos, há uma concentração maior para os meses onde há maior índice de pluviosidade, com predomínio para dezembro a abril, dados representados no GRAF. 03.

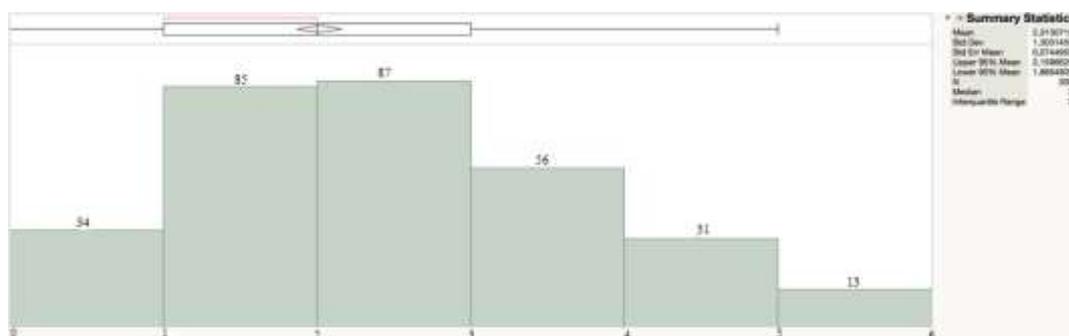
GRÁFICO 3 – Distribuição das 306 incluídas no estudo por meses do ano



Fonte: LACEN – AM

De acordo com os requisitos para solicitação das sorologias, quando se trata da pesquisa do antígeno NS1, a solicitação para esse exame deve ser feita em até no máximo o quinto dia de início dos sintomas, conforme as recomendações do Ministério da Saúde. De acordo com as informações constantes nas fichas de investigação dos pacientes, as amostras do estudo estavam entre o dia 0 e 6º da doença, dados mostrados no GRAF. 04.

GRÁFICO 4 – Frequência dos dias de doença das 306 amostras incluídas no estudo.



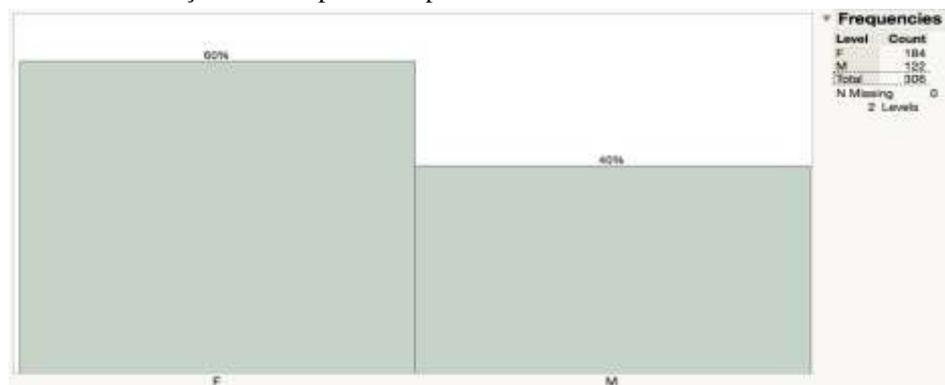
Fonte: LACEN – AM

O LACEN testou as amostras para o antígeno NS1 ao longo desses seis anos, por diferentes kits comerciais fornecidos pelo MS, ou comprados pela própria FVS, das marcas PANBIO, FOCUS e PLATELIA. Nas 306 amostras do estudo, usamos kits da PANBIO para completar as que ainda não haviam sido testadas, além do kit da BIOEASY, esse último é um teste rápido e foi usado para comparar entre os diferentes kits já testados. Entre todas as

diferentes marcas de testes comerciais usados, nenhum apresentou resultado POS, ou IND, para as amostras, mantendo-se os resultados não reagentes para todos os kits.

Quanto à distribuição das amostras por sexo, no geral ficaram com uma representatividade de 60% para o sexo feminino e 40% para o sexo masculino, GRAF. 05.

GRÁFICO 5 – Distribuição das 306 para NS1 por sexo

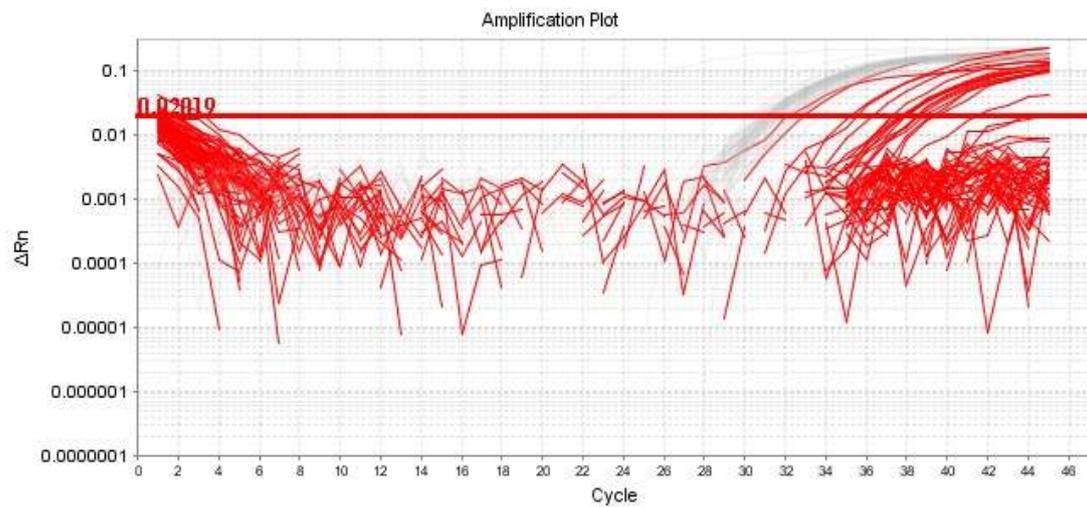


Fonte: LACEN – AM

Após a extração de RNA e amplificação das amostras para o vírus dengue, obtivemos 17 (5,5%) amostras com resultado detectável na RT-qPCR, com valores de Ct variando de 33 a 41,7 (FIG. 16). Todas as amostras foram submetidas ao protocolo de semi-nested RT-PCR (Lanciotti et al 1992), para amplificação e determinação de sorotipo de todas elas. Obtivemos resultados positivos apenas para três amostras que na RT-qPCR haviam apresentado Cts de: 37,3, 37,8 e 39, as quais foram identificadas como DENV-4, duas do ano de 2011 e uma de 2013 FIG.17.

A distribuição espacial desses resultados está representada na FIG. 18, duas do ano de 2011 e uma de 2013, todas da capital Manaus, uma da zona Sul (São Francisco) e duas da zona Leste (Jorge Teixeira). Nos GRAF. 6 e 7 observa-se a distribuição dessas amostras positivas em relação ao sexo e a frequência por faixa etária, respectivamente.

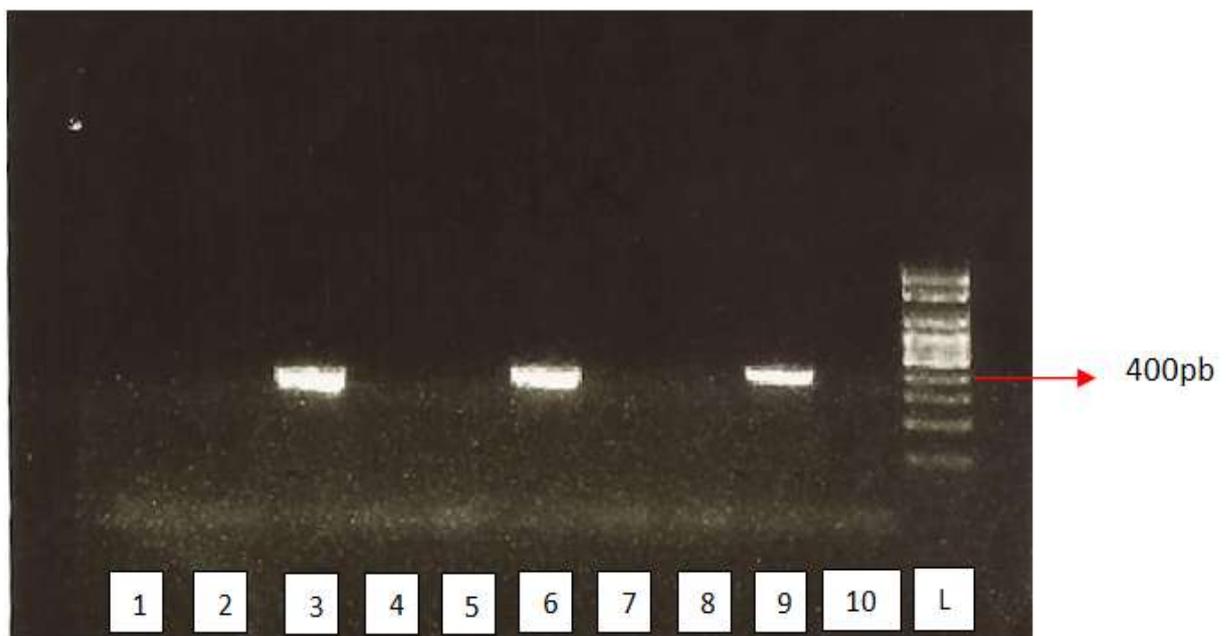
FIGURA 16- Amplificação de 17 amostras na RT-qPCR para dengue entre as 306 não reagentes para NS1.



Fonte ILMD/FIOCRUZ-AM

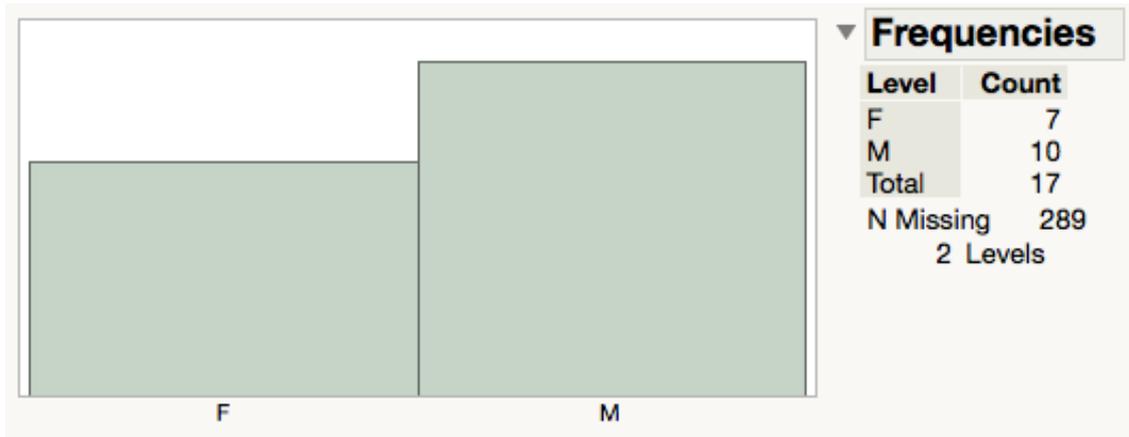
Com a utilização da reação de RT-PCR convencional (LANCIOTTI, 1992) foi possível sorotipar três destas amostras como DENV-4. Posteriormente foi possível obter as sequências nucleotídicas destas amostras utilizando sequenciamento capilar, resultado este que confirmou o sorotipo. Com os dados das sequências também foi possível analisar o genótipo das amostras de DENV-4 utilizando a ferramenta Dengue, Zika & Chikungunya Viruses Typing Tool Version 1.0.

FIGURA 17 – Imagem do Gel de 3 amostras positivas na nested-PCR (Lanciotti, 1992) para dengue.



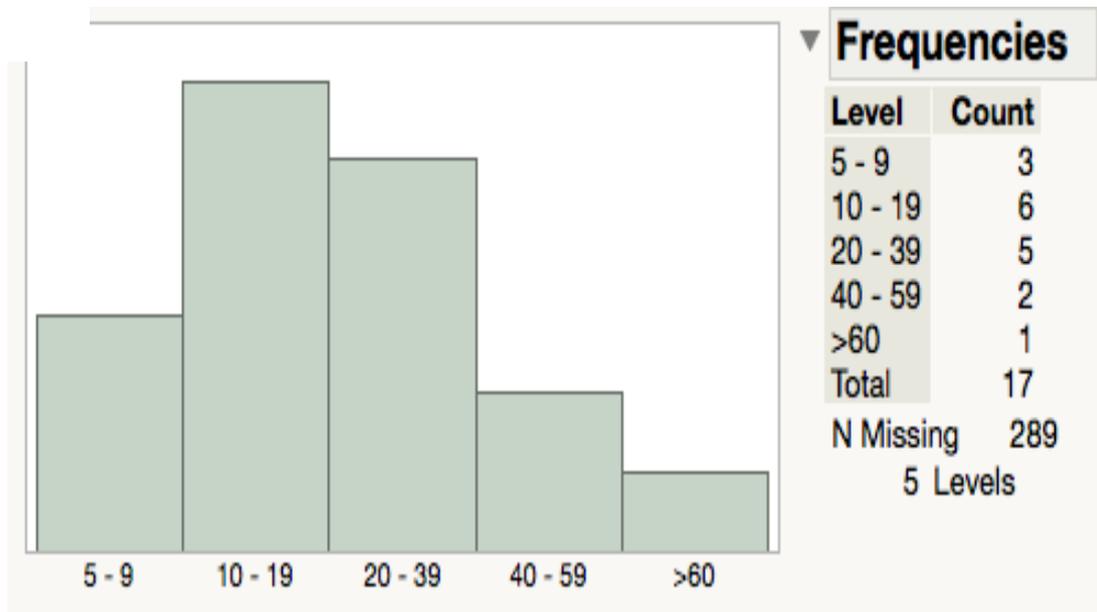
Fonte ILMD/FIOCRUZ-AM

RÁFICO 6 – Representação gráfica da frequência entre os sexos.



Fonte ILMD/FIOCRUZ-AM

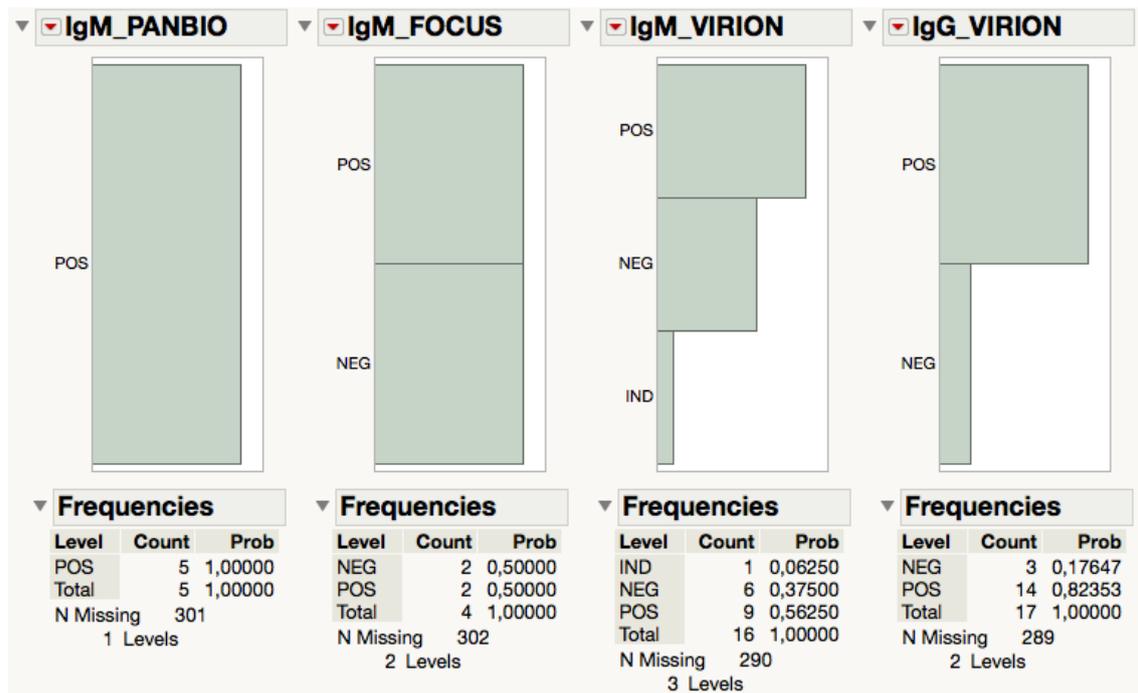
GRÁFICO 7 – Distribuição por idade para amostras positivas na RT-qPCR para o vírus dengue.



Fonte ILMD/FIOCRUZ-AM

Diante dos primeiros resultados para DENV, as amostras foram testadas para os anticorpos IgM por kits comerciais de fabricantes diferentes e para os anticorpos IgG foram testadas por kits comerciais de um único fabricante (VIRION), conforme mostrado no GRAF. 8. Para os anticorpos IgM da PANBIO com (n=05) o índice de positividade foi de 100%; para FOCUS (N=04) foi de 50% e para a VIRION (n=16) 56%.

GRÁFICO 8- Resultado dos testes de anticorpos para as 17 amostras positivas para dengue na RT-qPCR.

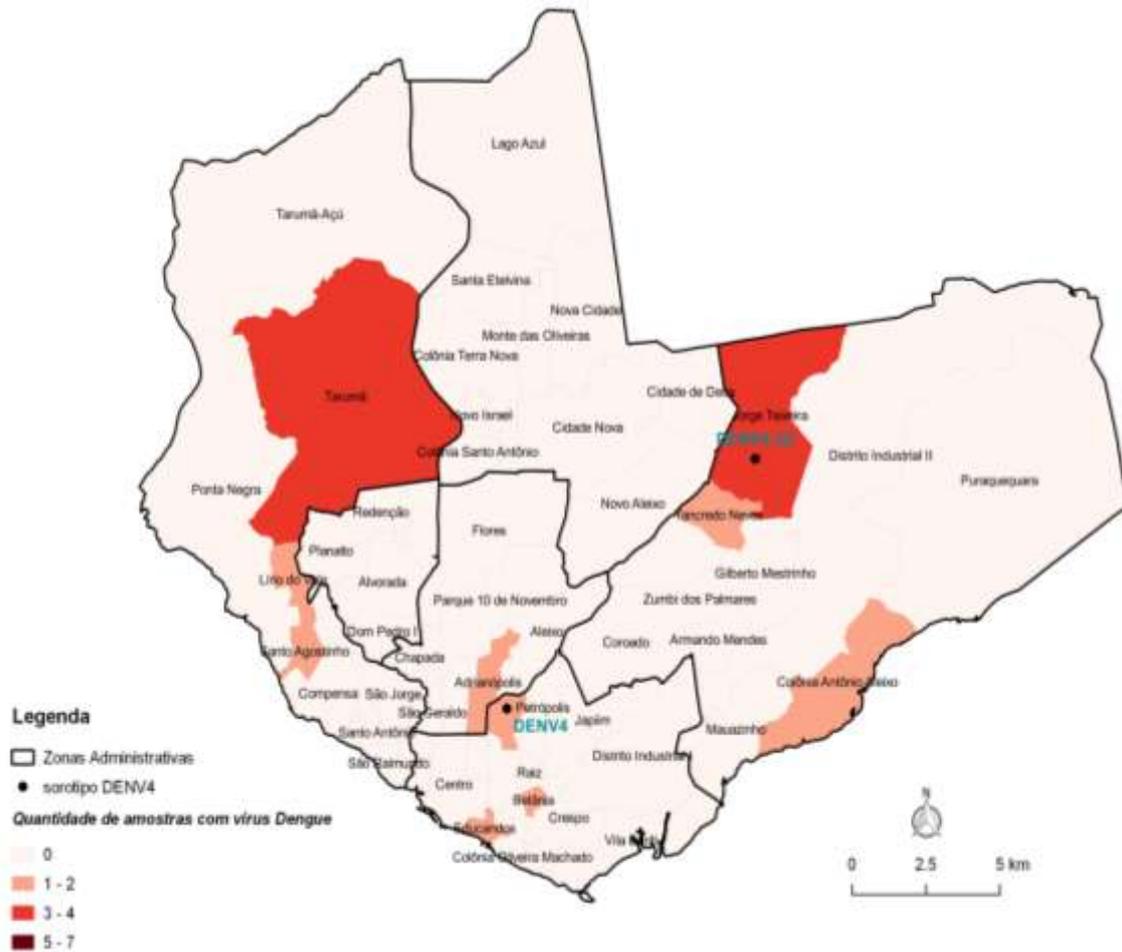


Fonte: ILMD/FIOCRUZ/LACEN-AM

Questionamos se entre os resultados NEG para NS1, haveria uma possível infecção secundária, para tanto, relacionamos os resultados dos anticorpos IgG com os resultados das 17 amostras positivas para DENV, na RT-qPCR. Dentre essas amostras, 14 (82,4%) foram POS para a IgG e 3 (17,6%) apresentaram resultados NEG. A diferença entre a positividade para IgG nas amostras positivas na RT-qPCR é estatisticamente significativa ($P=0,0056$).

As 17 amostras POS para dengue na RT-qPCR tiveram distribuição nas diferentes zonas: Oeste, Centro-Oeste, Leste, Sul e Centro-Sul da cidade, as quais estão representadas na FIG. 18, mostrando na imagem os números aproximados, bem como os bairros para cada uma delas. De acordo com as informações constantes nas fichas de investigação epidemiológica, uma esta localizada na zona Sul e duas na zona Leste.

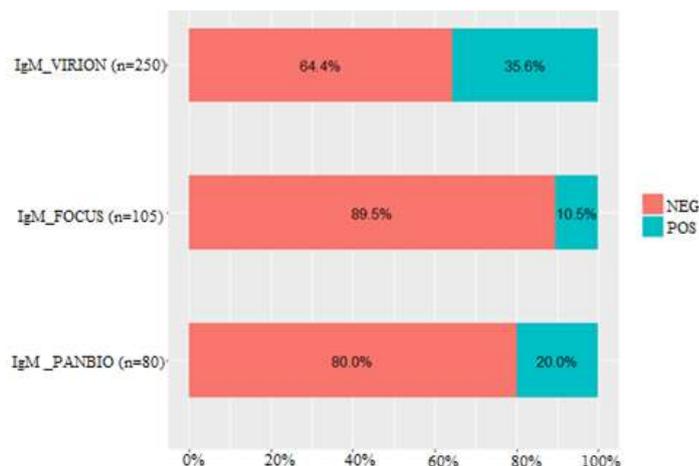
FIGURA 18 – Mapa representativo das amostras positivas para DENV na RT-qPCR por zonas e bairros de Manaus, entre as 306 NS1 negativas incluídas no estudo.



Fonte: ILM/D/FIOCRUZ-AM

Questionamos se, entre os fatores interferentes para o grande número de NS1 NEG, haveria relação com a perda do período oportuno para a coleta, o que poderia levar ao encontro de anticorpos da classe IgM. Algumas das amostras já haviam sido testadas pelo próprio LACEN com os kits comerciais PANBIO e FOCUS. As que não possuíam resultado foram testadas pelo método de ELISA usando o Kit comercial da VIRION. Os resultados estão apresentados em percentual no GRAF.09, considerando o número para todos os kits usados. Para VIRION (n=250) 35,6% POS e 64,4% NEG; para FOCUS (n=105) 10,5% POS e 89,5% NEG; para PANBIO (N=80) 20% POS e 80% NEG.

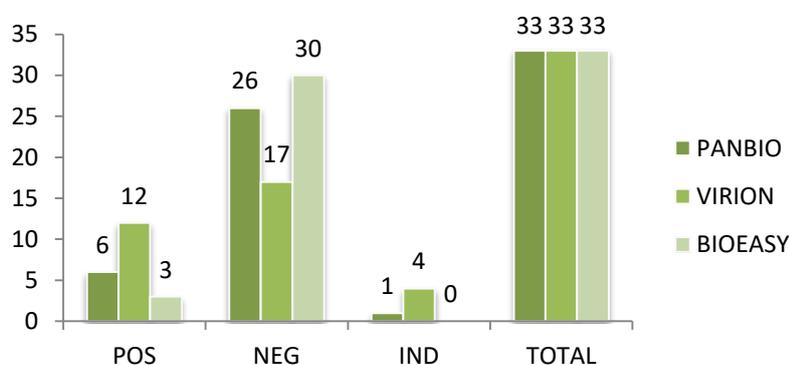
GRÁFICO 9 – Resultados das 306 amostras testadas por diferentes kits para anticorpo IgM.



Fonte: LACEN-AM

No GRAF. 09 observamos que os resultados para IgM com o kit da VIRION apresentou maior positividade em relação aos demais. Então fizemos o comparativo usando 33 amostras das 306 testando por dois kits diferentes: um pelo método de ELISA da PANBIO e o outro um teste rápido da BIOEASY, conforme representado no GRAF. 10, no qual a quantidade de Positivas da VIRION continuou predominante.

GRÁFICO 10 – Comparativo entre 33 amostras, das 306, para anticorpos da classe IgM com três diferentes kits comerciais, dois ELISA e um imunocromatográfico.

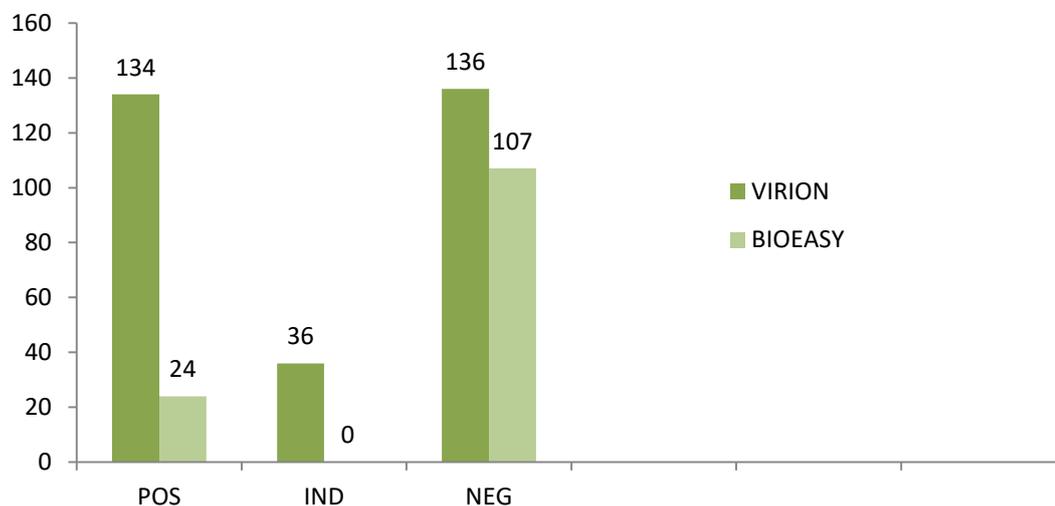


Fonte: LACEN-AM/ILMD/FIOCRUZ-AM

Em uma infecção secundária a presença de anticorpos IgG é superior aos IgM logo no início da doença, e a presença prévia destes anticorpos poderia interferir na identificação do antígeno NS1 no soro. Partindo dessa premissa, além das 17 positivas para dengue na RT-qPCR, o restante 289/306 foram testadas para anticorpos da classe IgG pelo kit comercial (ELISA) da VIRION, das quais 134 (43,8%) apresentaram resultados POS, 136 (44,4%) NEG e 36 (11,8%) tiveram resultados IND. Foram testadas ainda 131 amostras pelo teste rápido (TR) da BIOEASY, com índice de NEG de 81,7% e 18,3% de POS, cujo resultados estão

expressos no GRAF. 11. A concordância entre os testes da BIOEASY e da VIRION foi de 83%.

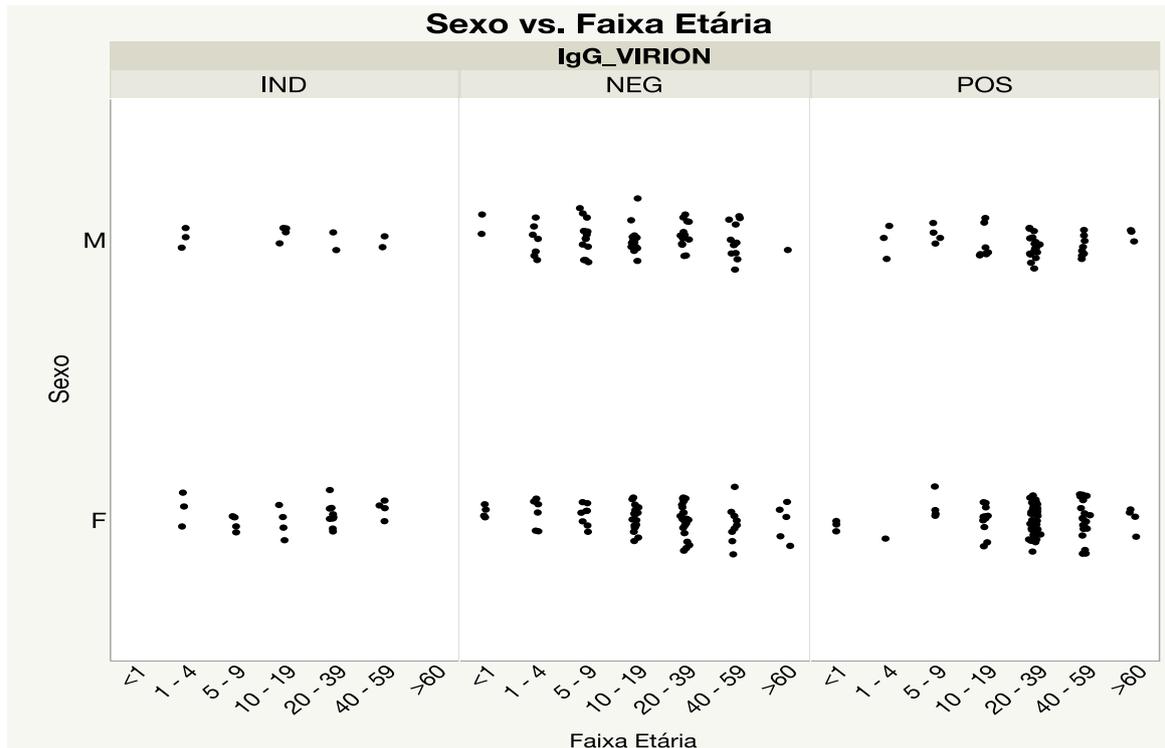
GRÁFICO 11 – Resultados para IgG por método de ELISA e imunocromatográfico de todas as 306 amostras analisadas.



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

Representamos graficamente os resultados da IgG para as 306 amostras testadas apenas pela VIRION quanto a idade e o sexo, GRAF.12. Observamos nos resultados que houve predominância para o sexo feminino entre as indeterminadas com 69,5% (11) e 30,5% (25) para os homens, com maior concentração para as faixas etárias foi de 10 - 19 a 20 - 39 anos. Quanto às negativas em relação ao sexo, a frequência foi de 52,2% (71) para as mulheres e 47,3% (65) para os homens. Quanto à faixa etária para os homens a maior frequência ficou de 1 - 4 a 40 - 59, para as mulheres houve concentração maior de negativas maior nas faixas de 10 - 19 a 20 - 39. Em relação às positivas o percentual para as mulheres foi de 34,2% (46) e para os homens 65,8% (88). Quanto a faixa etária para os homens a maior frequência ficou entre 20 – 39 anos e para as mulheres entre 29 -39 a 40 -59 anos.

GRÁFICO 12 – Resultado das 306 testadas para IgG por idade e sexo.



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

As amostras que apresentaram resultados não Detectáveis para o DENV na RT-qPCR, ou que tiveram Ct acima de 38 foram submetidas à amplificação para outros possíveis arbovírus, entre os quais os vírus: ZIKV, CHIKV, MAYV E OROV. Do total de 296 amostras, 68 amplificaram para um dos quatro tipos de vírus, cujos resultados estão representados na TAB. 2, bem como a sua distribuição anual. No QUADRO 3 está representado a média de Ct encontrado para cada um dos quatro tipos de vírus.

TABELA 2 – Resultados positivos para outras arboviroses em RT-qPCR

ANO	ZIKV +	CHIKV+	MAYV	OROV	TOTAL
2011	00	00	08	00	08
2013	00	00	03	00	03
2014	00	00	01	00	01
2015	02	00	01	02	05
2016	32	01	00	07	40
Total	34	01	13	09	57

Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

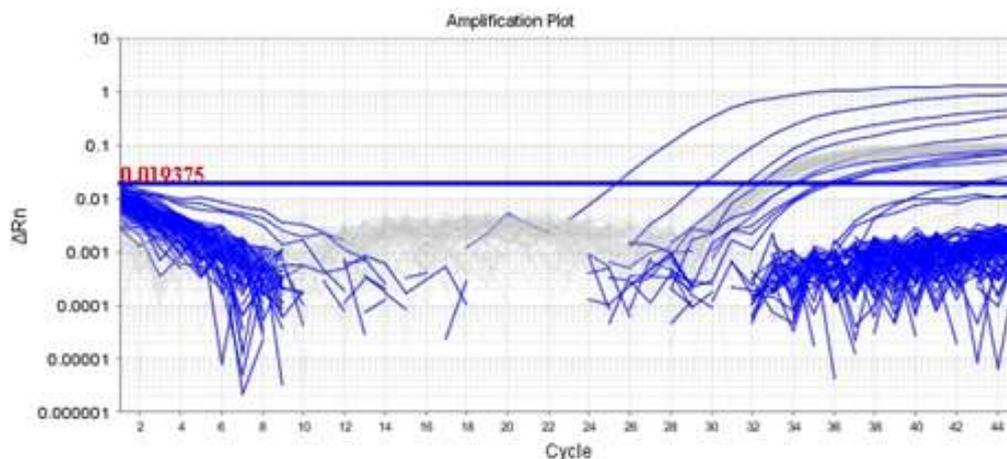
QUADRO 2 - Média de CT para os diferentes vírus com aís de um resultado positivo, encontrados nas amostras.

Ct RT-qPCR DENV	Median	37,9
Ct NS5 ZIKV SORO	Median	33,445
Ct RT-qPCR OROV	Median	23,79
Ct RT-qPCR MAYV	Median	32,9

Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

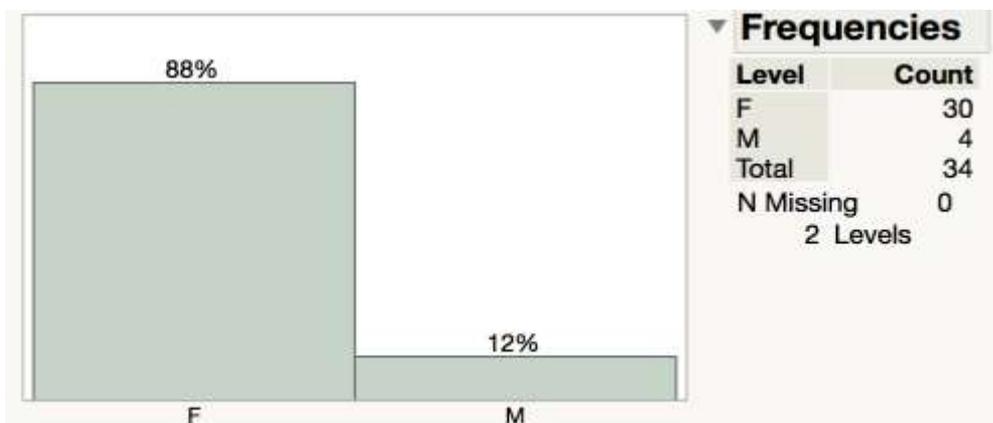
Entre os vírus detectados nas testagem por RT-qPCR (FIG. 19) nas amostras negativas para o DENV, o ZIKV foi o que teve um maior percentual de positividade, quando relacionado aos demais, inclusive o DENV. Os dados relacionados ao sexo, idade e dias de sintomas da doença estão representados nos gráficos 13, 14 e 15.

FIGURA 19 – Amplificação na RT-qPCR para o vírus Zika



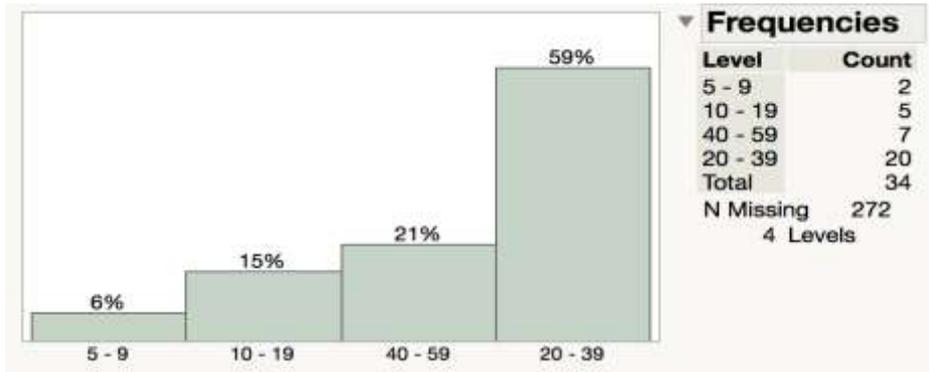
Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

GRÁFICO 13 – Distribuição das 34 amostras positivas para ZIKV por sexo.



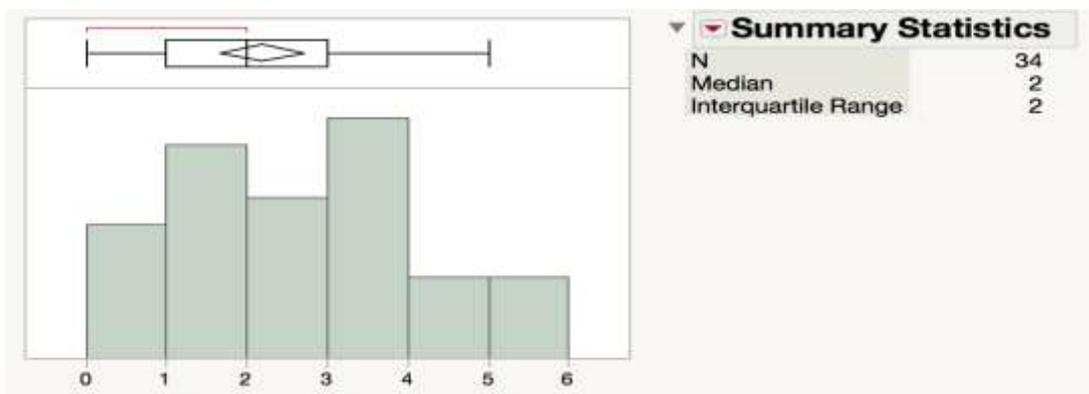
Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

GRÁFICO 14 – Distribuição por idade das 34 amostras positivas para ZIKV.



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

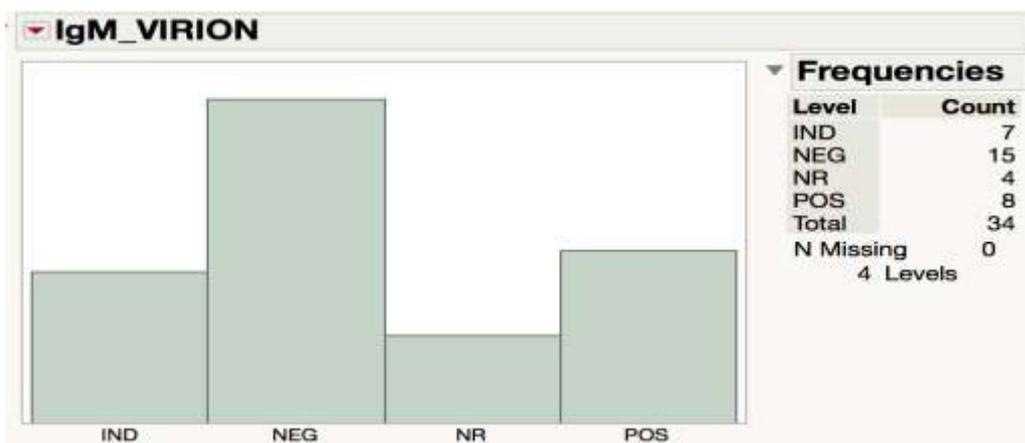
GRÁFICO 15 – Distribuição dos resultados de ZIKV por dias de doença



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

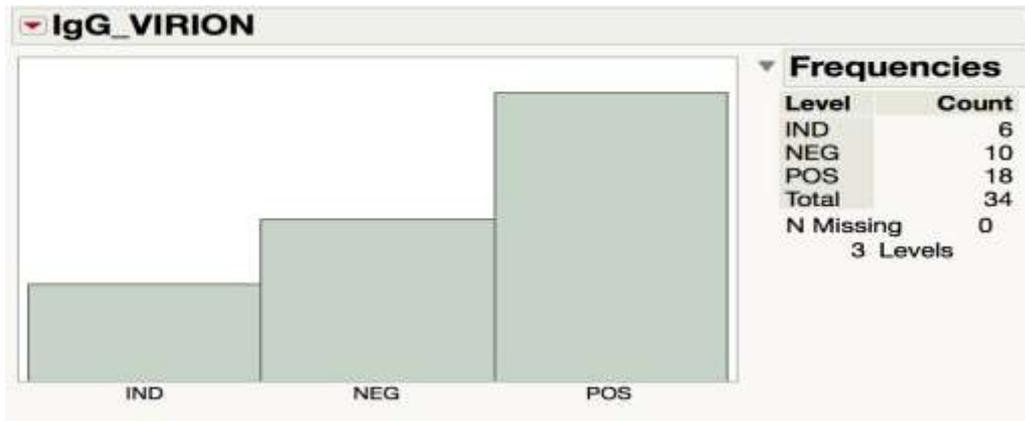
Analisamos ainda quanto dessas amostras apresentaram positividade para os anticorpos do DENV, foram analisados tanto para os anticorpos da classe IgM quanto para os da classe IgG, dados mostrados nos GRAF. 16 e 17.

GRÁFICO 16 – Resultados para os anticorpos IgM do DENV em amostras POS para ZIKV



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

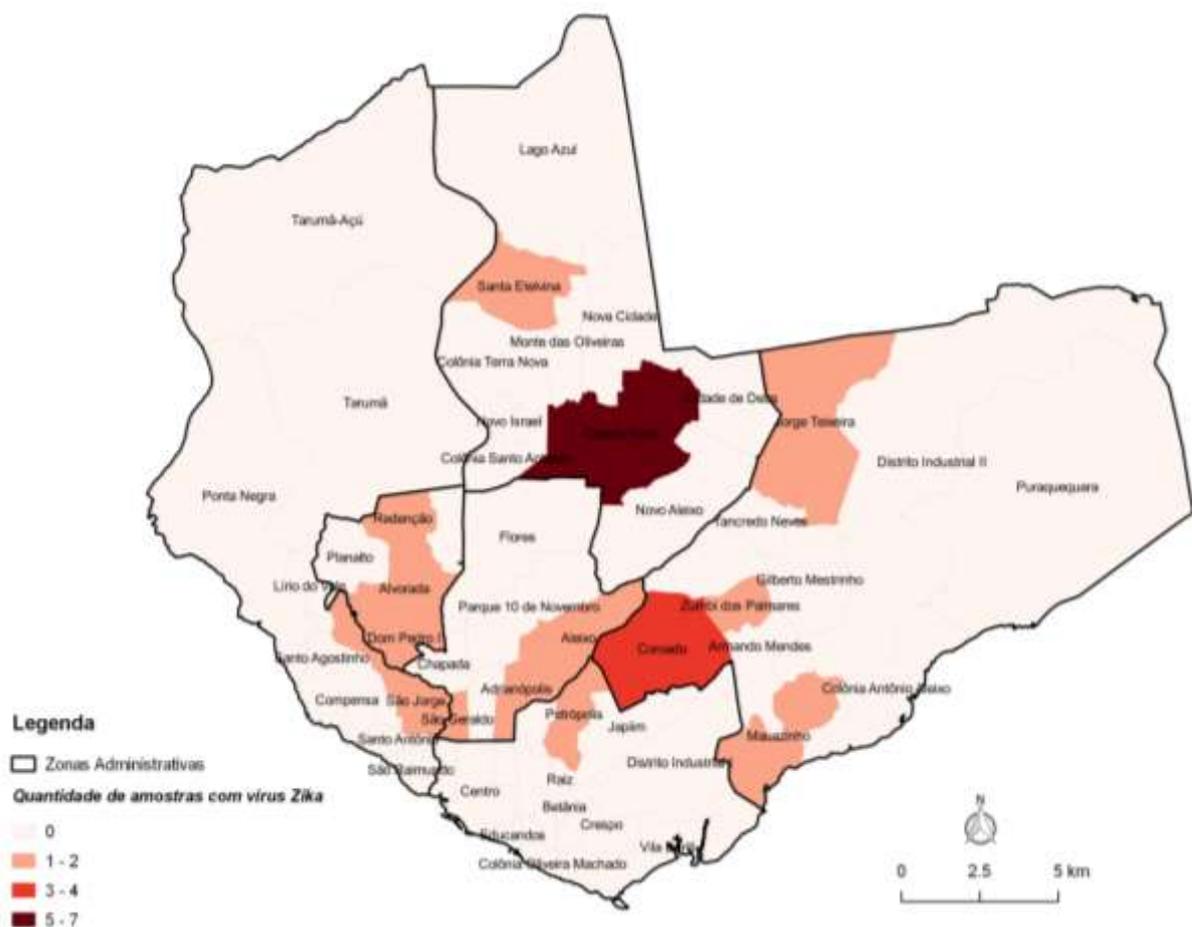
GRÁFICO 17 – Resultados para os anticorpos IgG do DENV em amostras POS para ZIKV



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

A distribuição dos resultados POS para o ZIKV é mostrada na FIG. 20, nela é possível observar a positividade no centro Regional por bairros e zonas da cidade. Apesar de estar distribuído em todas as zonas, verificou-se uma concentração maior para as zonas norte e leste da capital, com predomínio nos bairros da Cidade Nova e Coroado, respectivamente. O primeiro caso, de acordo com as 306 amostras do estudo, foi detectado em novembro de 2015 na zona Centro-Sul, bairro de Petrópolis e o último caso em junho de 2016 na região do Madeira, no município de Manicoré.

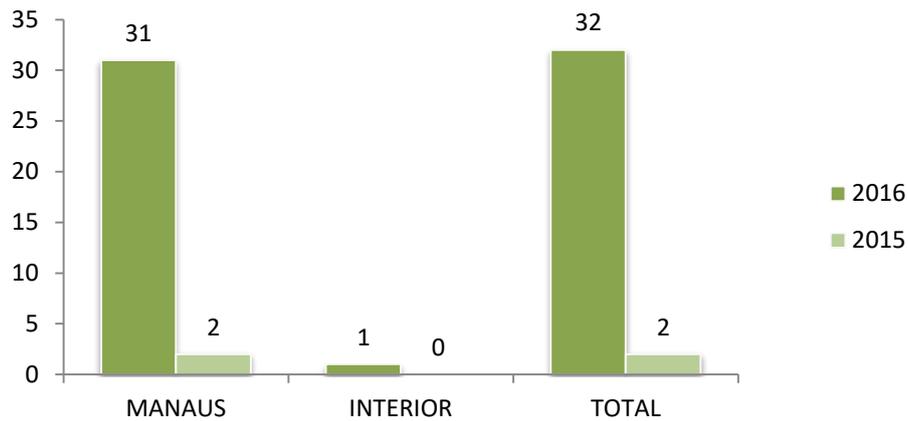
FIGURA 20 – Distribuição de amostras POS para o ZIKV no centro Regional (Manaus) com a detecção do primeiro caso em novembro de 2015, no bairro de Petrópolis zona Centro-Sul e a última em maio de 2016, no bairro do Coroado, zona Leste.



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

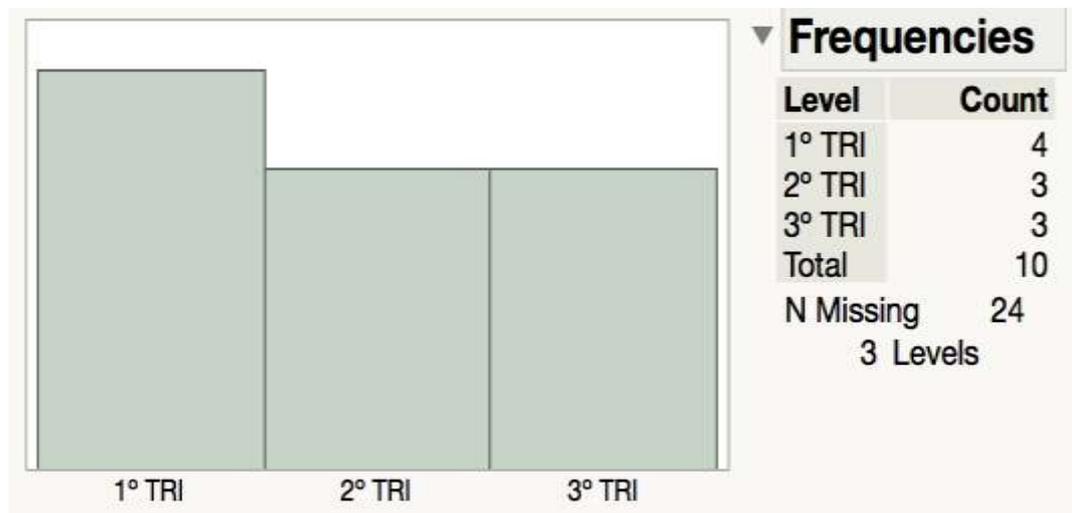
Os achados para ZIKV correspondem aos anos de 2015 e 2016, incluindo uma amostra do município de Manicoré do ano de 2016, cujos resultados estão representados no GRAF. 18. Um número expressivo de resultados POS para pacientes grávidas foi encontrado, os quais estão demonstrados no GRAF. 19.

GRÁFICO 18 – Distribuição das amostras POS para o ZIKV por ano.



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

GRÁFICO 19 – Paciente grávida com resultados POS para o ZIKV

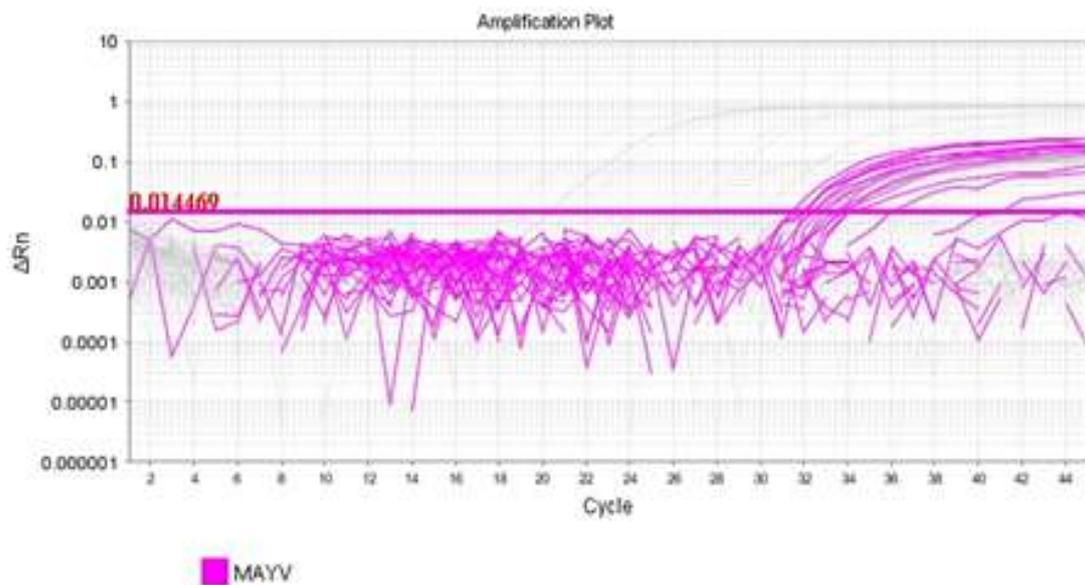


Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

As 10 grávidas para ZIKV tinham como local de residência as zonas Norte e Leste da cidade de Manaus, 03 tinham como residência os bairros: 01 no Mauazinho, 01 no Ouro Verde e 01 no Coroado (zona Leste); 07 estavam distribuídas nos seguintes bairros: 02 no Novo Aleixo, 02 na Cidade Nova, 02 no João Paulo e 01 no Vale do Sinai (zona Norte). Segundo informe do serviço de saúde do município de Manaus, sete dessas pacientes tem informação quanto a declaração de nascido vivo, onde segundo essa declaração as crianças nasceram normais sem alterações. Quatro fizeram partos normais (vaginais) e três foram cesarianos. Apenas uma dessas pacientes de parto cesariano deu a luz a uma criança de baixo peso de 1,880 kg, do sexo masculino. As outras três grávidas não apresentaram nenhum dado no sistema de informação.

Um número significativo foi encontrado para outros dois arbovírus, por meio de uma RT-qPCR multiplex para MAYV e OROV, a primeira visualização da amplificação é para o vírus Mayaro (FIG. 21). Primeiramente são mostrados os dados para o MAYV e sua distribuição pelos diversos bairros de Manaus, os resultados foram analisados quanto à frequência por sexo, faixa etária e distribuição anual, os quais podem ser visualizados nos GRAFs. 20, 21 e 22.

FIGURA 21- Amplificação das amostras para o vírus Mayaro na RT-qPCR



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

GRÁFICO 20 – Frequência dos casos positivos para MAYV por sexo

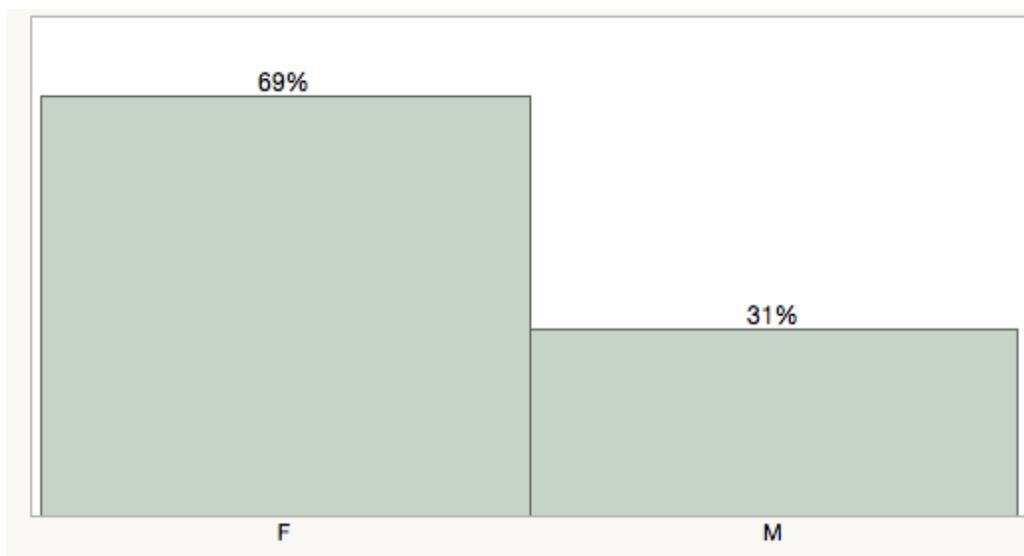
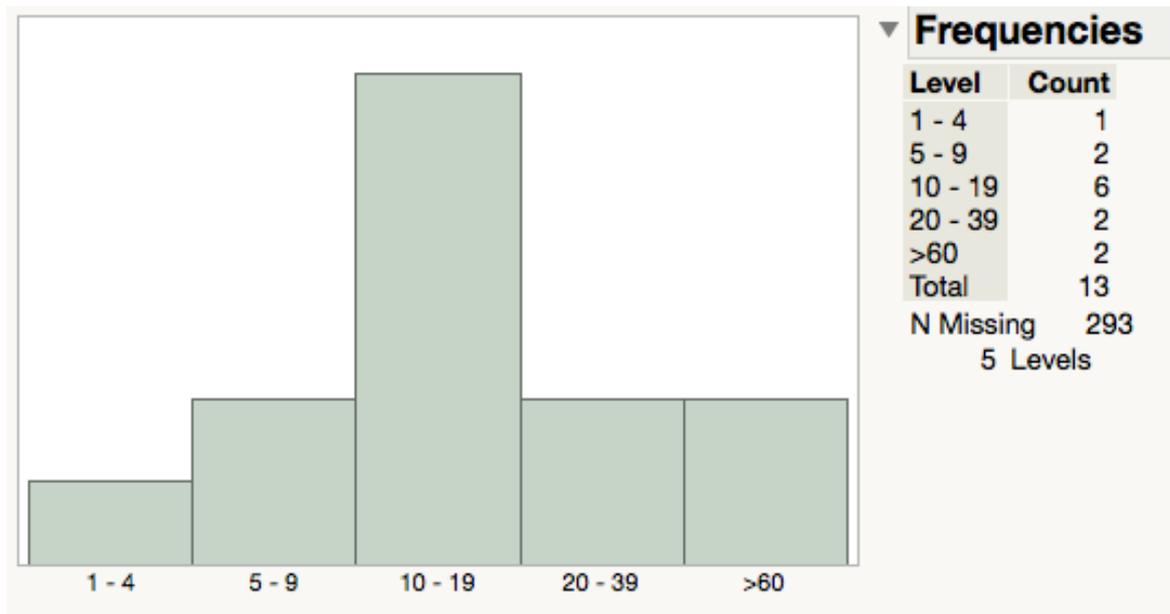
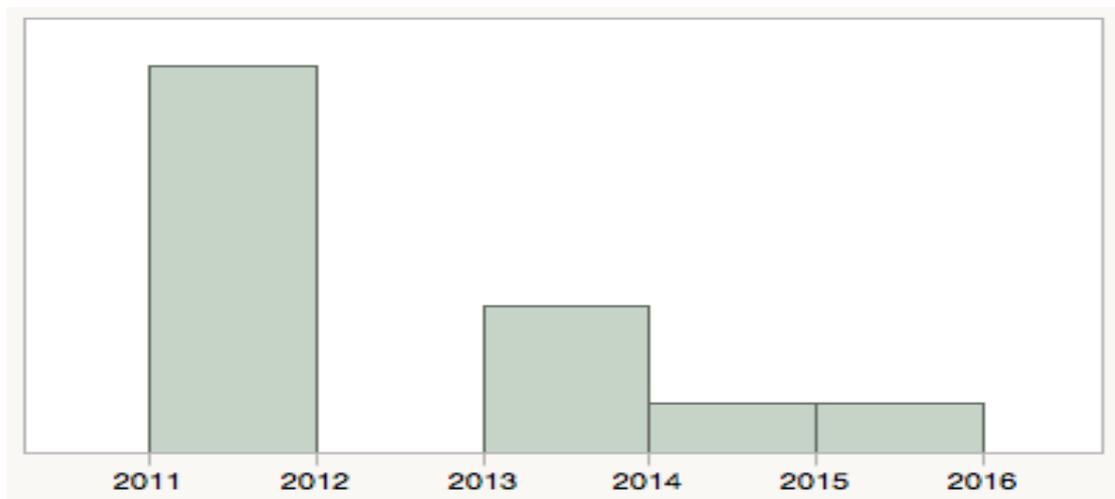


GRÁFICO 21 – Distribuição dos casos de MAYV POS por faixa etária



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

GRÁFICO 22 – Distribuição de MAYV POS por ano. As primeiras amostras encontradas para o MAYV nesse estudo datam de fevereiro de 2011 e a última em novembro de 2015

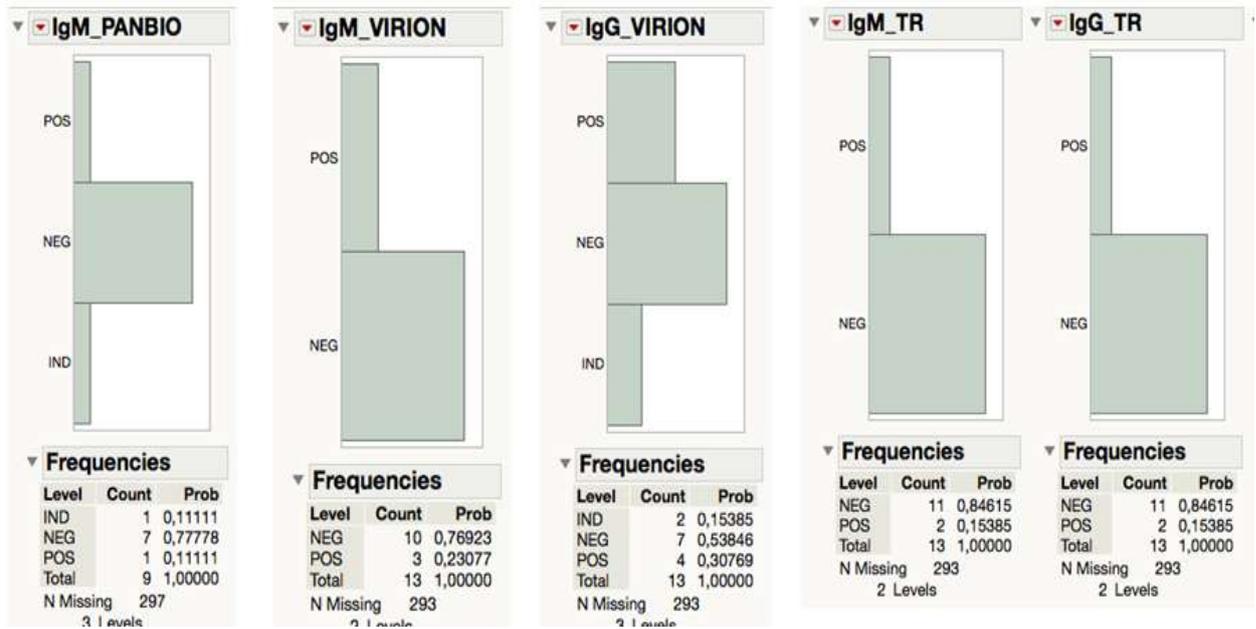


Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

F

A frequência de anticorpos IgM e IgG para o DENV foi analisada quanto a sua presença nas amostras POS para MAYV. Foram testadas para os anticorpos IgM por três diferentes marcas PANBIO, VIRION e BIOEASY, com 01 amostra POS do total de 09 para PANBIO, 03 para a VIRION e 02 para BIOEASY de um total de 13 amostras respectivamente. Para os anticorpos IgG, foram testadas pela VIRION e BIOEASY um total de 13 amostras, com resultados POS para 04 e 02 respectivamente os quais podem ser observados no GRAF. 23.

GRÁFICO 23 – Resultado de anticorpos IgM e IgG nas amostras POS para MAYV



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

A distribuição do vírus por zona e bairros da capital Manaus também foi analisada, cuja representação encontra-se na FIG 22.

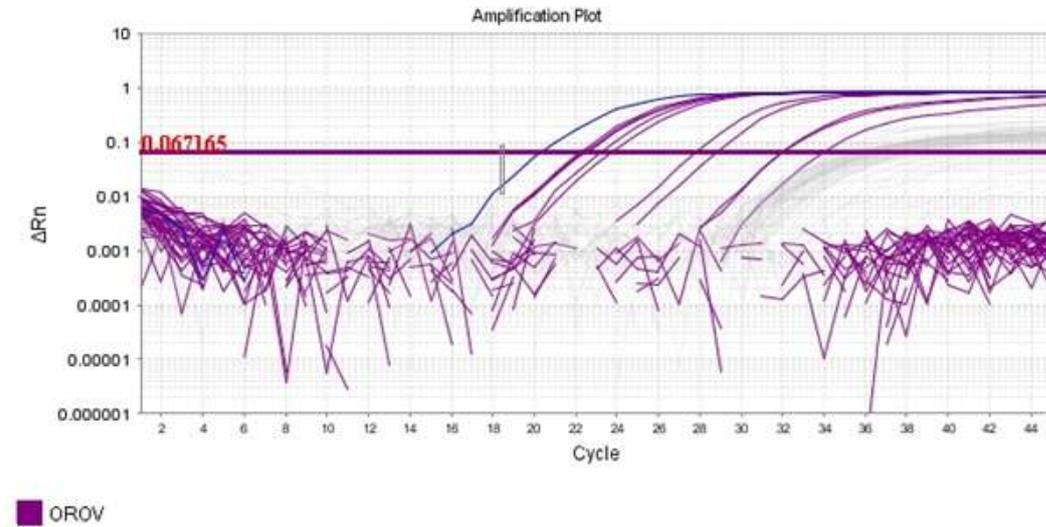
FIGURA 22 – Distribuição de casos positivos para MAYV nas zonas e bairros de Manaus de janeiro de 2011 a dezembro de 2015



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

O vírus Oropouche (FIG. 23) foi detectado entre as amostras desse estudo. A frequência dos casos por sexo, faixa etária e ano de ocorrência estão representados nos GRAFs. 24, 25 e 26.

FIGURA 23- Amplificação das amostras para o vírus Oropouche na RT-qPCR



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

GRÁFICO 24 – Distribuição do resultado de OROV por sexo

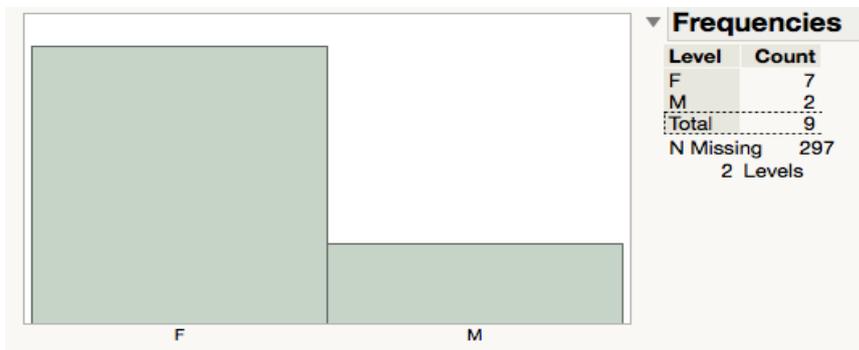


GRÁFICO 25 – Distribuição de OROV por faixa etária

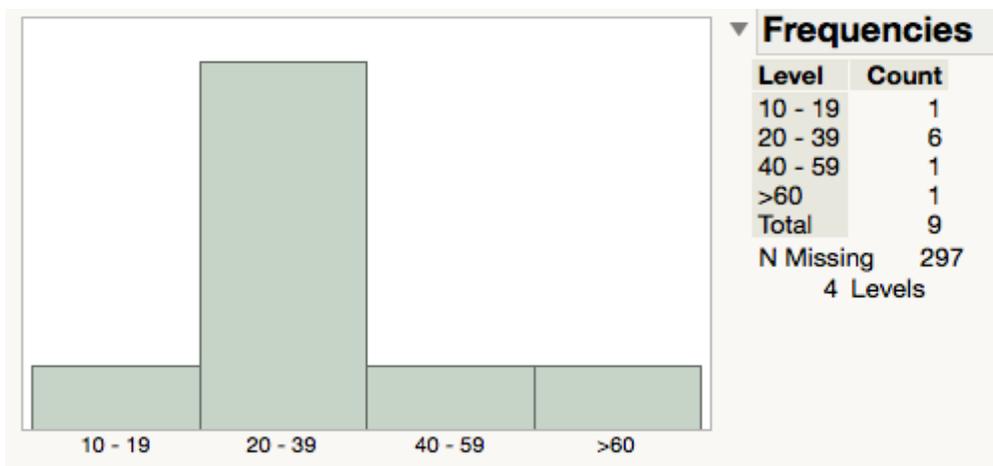
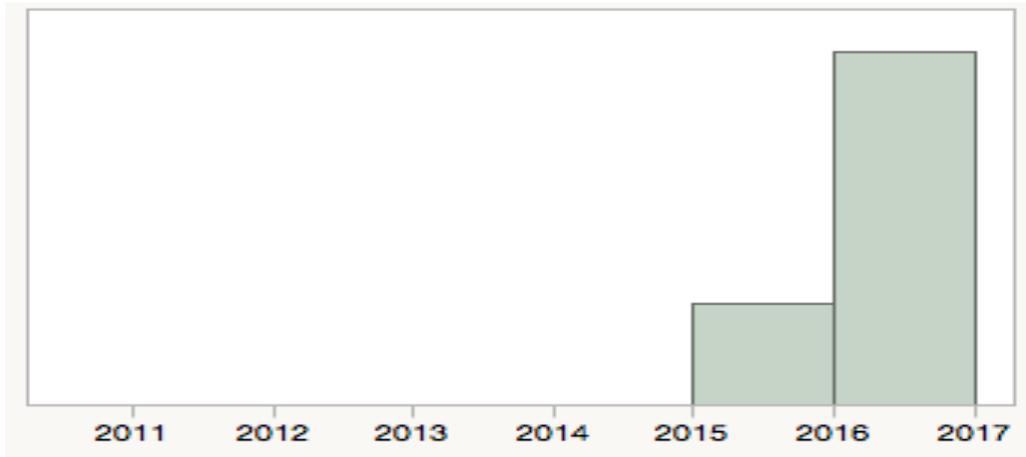


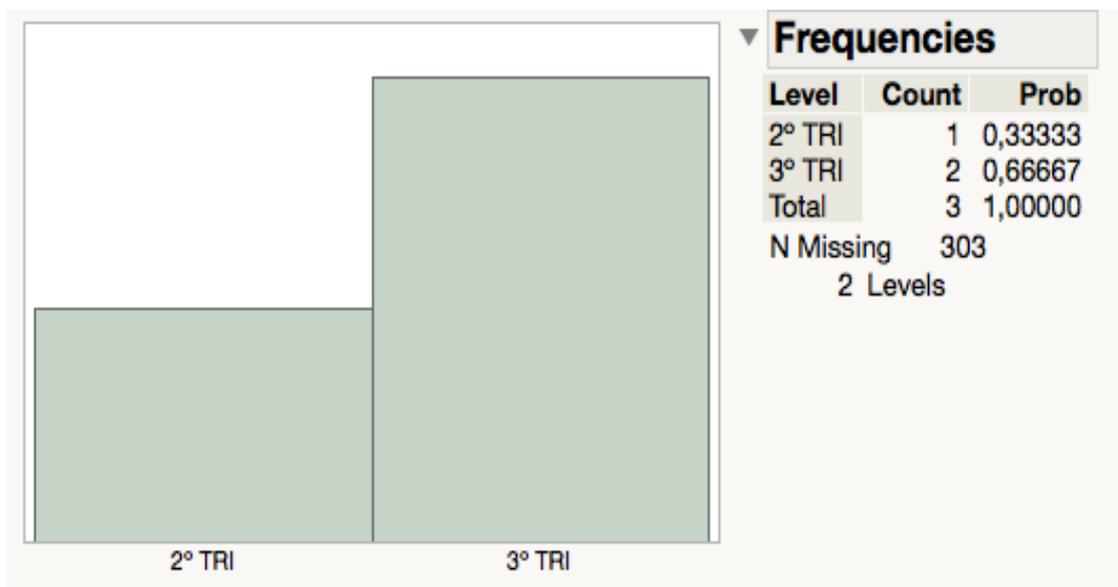
GRÁFICO 26-Distribuição de OROV por ano



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

Entre as amostras POS para o vírus Oropouche, três pacientes estavam grávidas uma com notificação em 2015 e duas em 2016, entre o 2º e 3º trimestre, dados apresentados no GRAF. 27. Na ficha de investigação constavam as seguintes informações, para a de 2015: febre, artralgia, mialgia e prurido. Para as de 2016, uma apresentava: febre com temperatura de 39°C, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia e prurido e a outra constava apenas dados pessoais, data da coleta e de início de sintomas.

GRÁFICO 27 – Frequência de pacientes grávida com OROV.



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

Em relação as grávidas o serviço de saúde do município de Manaus foi contatado imediatamente. Segundo as informações obtidas quanto à evolução da doença em duas das pacientes, não foi observada nenhuma anormalidade. Ambas as crianças nasceram saudáveis,

com os seguintes informes: Uma criança do sexo masculino nasceu no dia 07/03/2016 as 17h15min, de parto normal, pesando 2,960kg, sem nenhuma anomalia congênita e perímetro cefálico normal. A outra criança do sexo feminino nasceu no dia 09/06/2016 as 08h31min, de parto normal, pesando 3,060kg, sem nenhuma anomalia congênita e perímetro cefálico normal. Quanto a terceira paciente, havia relatos em sua ficha de notificação sobre dores no baixo ventre. No exame de ultrassom obstétrico, foi detectado pequeno hematoma subcoriônico, porém não conseguimos nenhuma informação complementar nos serviços de saúde sobre a mãe ou a criança.

Analizamos quantos das amostras POS para OROV, reagiam nos testes para os anticorpos IgM e IgG do vírus dengue, do total de 09 amostras analisada 03 (33%) reagiram para IgM e 04 (44%) para IgG, cujos resultados podem ser observados no GRAF. 28. Na FIG. 24 apresentamos a distribuição dos casos de OROV nas zonas e bairros da cidade de Manaus.

GRÁFICO 28 – Resultado de Anticorpos IgM e IgG do DENV nas amostras POS para OROV.

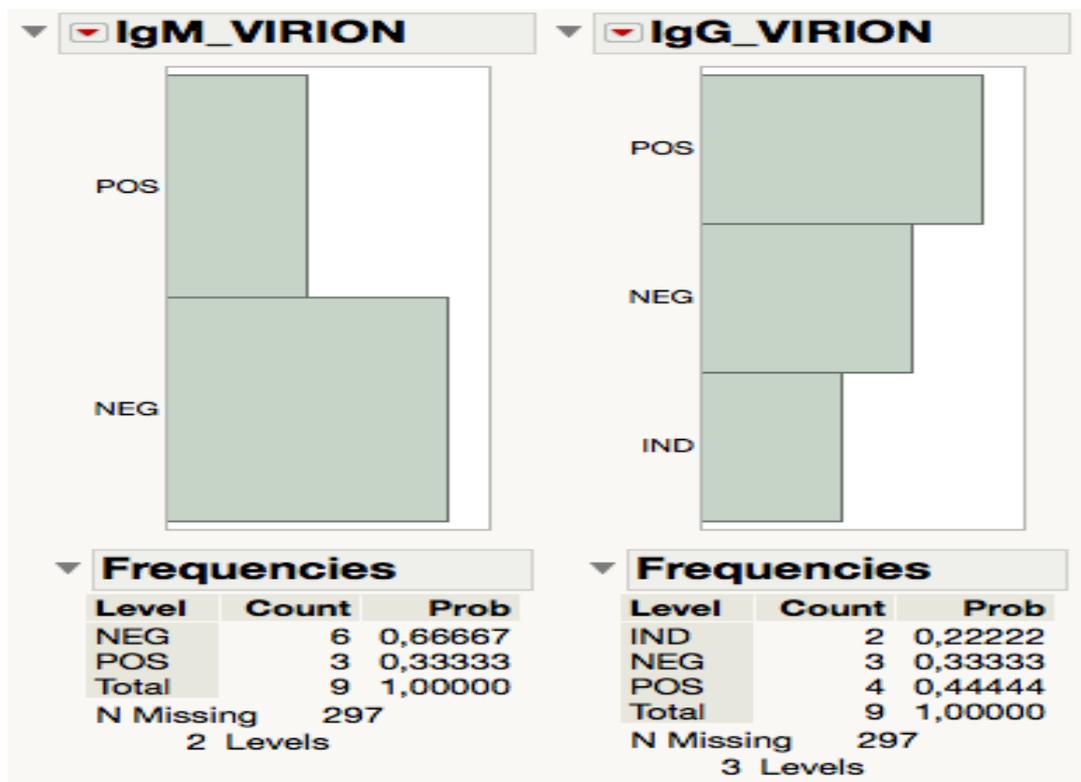
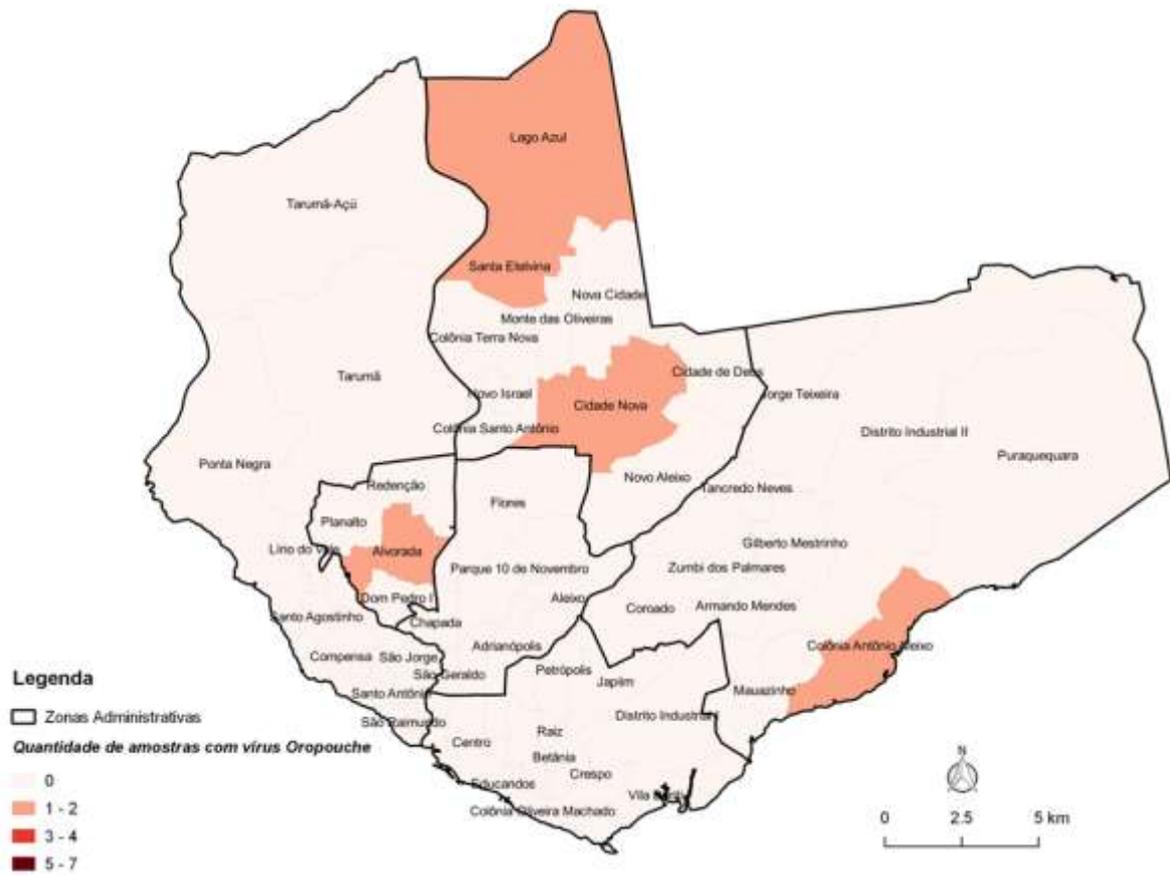


FIGURA 24 – Distribuição do OROV nas zonas e bairros de Manaus entre 2015 e 2016



Fonte: ILMD/FIOCRUZ-AM

Em relação aos sintomas apresentados pelos pacientes incluídos no estudo, os dados foram resgatados das fichas de notificação, as quais são preenchidas no momento em que o paciente procura o serviço de saúde, durante a solicitação do exame específico para doença. Dentre as 306 fichas analisadas dos pacientes do estudo, apenas algumas estavam preenchidas com informações relevantes ao quadro do paciente, dados mostrados no QUADRO 03.

QUADRO 3 – Dados clínicos constantes nas fichas de investigação

SINTOMAS APRESENTADOS	QTDE
Febre	83
Urina Escura	02
Olhos hiperemiados	05
Esplenomegalia	01
Cefaleia	49
Astenia	15
Diarreia	05
Náuseas	14
Sangramento	02
Prurido	26
Temperatura aferida	02
Coriza	07
Anorexia	15
Prostração	09
Exantema	39
Tosse	05
Dor abdominal	15
Artralgia	33
Mialgia	38
Vômito	10
Dor retro-orbitária	25

Fonte: LACEN-AM

Entre as amostras positivas para os diferentes vírus na PCR em Tempo Real, havia alguns dados clínicos anotados na ficha de investigação, esses dados foram extraídos e colocados em uma planilha. A partir dessas informações foi montado um quadro comparativo entre os sintomas apresentados e o vírus encontrado. No QUADRO 4 essas informações estão dispostas na mesma coluna para todos os vírus de maneira que se possa estabelecer o que há em comum entre os sintomas e os diferentes vírus na fase inicial da doença.

QUADRO 4- Dados clínicos relacionados às amostras Positivas na RT-qPCR para os diferentes vírus encontrados

ZIKV																
Febre	Edema	Anorexia	Dor retro-orbitária	Prostração	Artralgia	Mialgia	Astenia	Náuseas	Vômito	Exantema	Cefaleia	Dor abdominal	Diarreia	Prurido	Urina Escura	Olhos hiperemiados
06	01	00	01	00	03	02	01	01	02	06	02	00	00	05	00	02
DENV																
Febre	Edema	Anorexia	Dor retro-orbitária	Prostração	Artralgia	Mialgia	Astenia	Náuseas	Vômito	Exantema	Cefaleia	Dor abdominal	Diarreia	Prurido	Urina Escura	Olhos hiperemiados
07	01	02	03	00	02	05	04	01	01	03	04	00	00	03	00	00
OROV																
Febre	Edema	Anorexia	Dor retro-orbitária	Prostração	Artralgia	Mialgia	Astenia	Náuseas	Vômito	Exantema	Cefaleia	Dor abdominal	Diarreia	Prurido	Urina Escura	Olhos hiperemiados
02	00	00	01	00	02	02	00	00	00	00	00	00	00	02	00	00
MAYV																
Febre	Edema	Anorexia	Dor retro-orbitária	Prostração	Artralgia	Mialgia	Astenia	Náuseas	Vômito	Exantema	Cefaleia	Dor abdominal	Diarreia	Prurido	Urina Escura	Olhos hiperemiados
08	00	02	04	03	05	05	00	02	01	02	05	05	01	01	02	00
CHIKV																
Febre	Edema	Anorexia	Dor retro-orbitária	Prostração	Artralgia	Mialgia	Astenia	Náuseas	Vômito	Exantema	Cefaleia	Dor abdominal	Diarreia	Prurido	Urina Escura	Olhos hiperemiados
00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00

Fonte:LACEN-AM

7 DISCUSSÃO

O diagnóstico clínico da dengue é complexo, especialmente em áreas onde há circulação de outras doenças com características similares (GUZMAN, 2004; VASCONCELOS, 2009; MOURÃO, 2013). Nesse trabalho avaliamos amostras de pacientes com suspeita clínica de dengue e exame para pesquisa do antígeno NS1 com resultados negativos.

Os dados referentes ao recebimento de amostras para a pesquisa do antígeno NS1 estão representados na TAB. 01 dos resultados, dados computados pelo LACEN-AM através do programa GAL e fichas de notificação, referentes ao período de 2011 a 2016. Infelizmente um maior detalhamento das amostras recebidas em 2011 não foi possível, pois nesse ano o cadastro dos pacientes era feito em um programa diferente do GAL, o qual não está mais em uso, dificultando o acesso de forma precisa a algumas informações.

É importante observar que os dados exatos só são computados com maior precisão a partir de abril de 2012, quando o sistema GAL passa a ser usado no estado do Amazonas. Conforme observado nas amostras analisadas nesse período, os resultados negativos para NS1 aumentaram nos anos subsequentes, com exceção de 2012 onde houve um baixo número de amostras recebidas no LACEN. Cabe destacar que em 2011 houve a maior epidemia de dengue no estado do Amazonas até o momento. É então possível supor que a queda do número de casos suspeitos de dengue em 2012, pode ter ocorrido devido a diferentes fatores, como o esgotamento de susceptíveis e o reforço nas ações de controle do vetor, em função do grande número de casos em 2011.

Conforme já descrito na literatura, resultados negativos para o teste NS1 em pacientes suspeitos para dengue não significam ausência de infecção (CHAKRAVARTI et al, 2011; KASSIM et al, 2011; ACOSTA et al, 2014). Nossos resultados, utilizando a RT-qPCR, mostram a presença do material genético do vírus dengue em 17 das 306 amostras analisadas, negativas para o antígeno NS1. Desse total, três foram confirmadas para o DENV-04, genótipo II, genótipo que foi encontrado primeiramente em Boa Vista em 2010 (TEMPORÃO et al, 2011; ACOSTA et al, 2014), diferente do genótipo encontrado previamente em Manaus (FIGUEIREDO et al, 2008).

A detecção do DENV-4 em amostras NS1 negativas já havia sido observada no trabalho de ACOSTA e colaboradores (2014). Neste manuscrito os autores analisaram 150 amostras com resultados negativos no teste ELISA (PLATELIA – BIO_RAD) para o antígeno NS1, das quais 33 (22%) foram positivas pela técnica de RT-qPCR. Das 33 amostras positivas na RT-qPCR, 28 (75%) foram sorotipadas como DENV-4, as demais ficaram distribuídas

entre os DENV-3, DENV-2, DENV-1. Segundo os autores, em relação ao DENV-4 a maioria das infecções não se caracterizava como infecção secundária (ACOSTA et al, 2014). O que levaria a outro questionamento, o problema maior em relação ao diagnóstico falso negativo para NS1, estaria relacionado com o DENV-4?

A infecção secundária é sugerida como um dos interferentes na detecção do antígeno NS1 (WANG e SEKARAN, 2010; ACOSTA et al, 2014;), das 306 amostras analisadas em nosso estudo, 134 (44%) apresentaram resultados positivos para anticorpos IgG anti-dengue, indicativo de infecção anterior. Entre as 17 amostras positivas por RT-qPCR para dengue, 14 tinham anticorpos IgG anti-dengue positivos, incluindo as três amostras sequenciadas para DENV-4, corroborando o estudo de ACOSTA, que diz que o problema quanto a detecção do antígeno NS1 pode acontecer diante de infecção secundária, porém pode se intensificar diante de uma segunda infecção por DENV-4 (ACOSTA et al, 2014).

Em outro estudo realizado com diferentes kits comerciais, foi observado menor sensibilidade em detectar o antígeno NS1, quando o paciente era portador do DENV-3. Em relação à infecção secundária a sensibilidade dos kits diminuía significativamente, independente do sorotipo (LIMA et al, 2010). Nossas amostras foram testadas por diferentes kits comerciais para o antígeno NS1 e em todos, os resultados se confirmaram como negativos. Outro estudo demonstrou que os níveis de NS1 caem consideravelmente na presença de anticorpos IgM/IgG anti-dengue, isso demonstra que diante de uma infecção secundária, é possível um diagnóstico falso-negativo para o antígeno NS1 (WANG e SEKARAN, 2010). Apesar das amostras serem de pacientes de área endêmica para dengue o percentual de amostras com resultados positivos para o IgG anti-dengue foi relativamente baixo (GRAF. 11).

O período oportuno para a coleta do espécime a ser analisado é fundamental para o diagnóstico laboratorial com maior precisão. As chances da presença de anticorpos IgM, por exemplo, em uma amostra solicitada para NS1 é menor, se a coleta for feita entre o 1º e o 4º dias de início dos sintomas (LIMA et al, 2010). Os dados aqui apresentados mostram a presença de anticorpos IgM, segundo informações constantes na ficha de investigação, em 14 amostras que estariam entre os dias 1 e 4 da doença, resultados obtidos em dois diferentes kits de ELISA comercial. Cinco dessas amostras apresentaram resultados positivos, concomitante para os anticorpos IgM, IgG e RT-qPCR. Por esses pacientes estarem no início dos sintomas, a presença dos anticorpos anti-dengue juntamente com o teste molecular, não descarta a possibilidade de esses pacientes terem sido infectados por outro sorotipo nos últimos 60 dias. Os anticorpos IgM em algumas situações podem ser detectados a partir do 3º dia de sintomas e até 60 dias após a infecção (FIGUEIREDO et al, 1989; HU et al, 2011). A presença de

anticorpos IgG é justificável pois os pacientes vivem em área endêmica e a dengue tem circulação desde 1998 no estado (FIGUEIREDO et al, 2004). Em um estudo realizado por Hu e colaboradores com 313 pacientes, o antígeno NS1 foi detectado até o 14º dia de sintomas, a IgM a partir do 3º dia tendo um percentual de 100% no 8º dia e a IgG teve o seu encontro já na primeira semana com 100% no 15º dia (HU et al, 2011).

Nossas análises encontraram outros arbovírus que estavam circulando no estado, no período em que essas amostras foram coletadas. Esses achados justificariam em parte o alto índice de resultados negativos para o antígeno NS1 da dengue. O que vem de encontro com trabalho desenvolvido por MOURÃO e colaboradores entre os anos de 2007 e 2008, no qual foram detectados outros arbovírus que não dengue em pacientes da Fundação de Medicina Tropical – Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Esses pacientes foram recebidos nessa instituição com casos de síndrome febril, aparentemente com suspeita clínica de dengue, porém apresentaram resultados negativos para o vírus (MOURÃO, 2013). A rede pública de saúde no estado do Amazonas, até o ano de 2015, só disponibilizava exames sorológico para dengue através da pesquisa de anticorpos e do antígeno NS1 assim como na maioria dos estados da Federação. O conhecimento em relação à circulação de outros arbovírus na região se dá por meio de instituições de pesquisas (FMT-HVD e ILMD/FOCRUZ AMAZONAS). Os arbovírus encontrados nas amostras do estudo datam a partir de 2011, provavelmente esses casos foram fechados como dengue, o arbovírus de maior circulação no período e possível de identificação laboratorial na rede pública. Observemos o que diz o Guia de Vigilância Epidemiológica para os casos suspeitos de dengue: “Indivíduo que resida em área onde se registram casos de dengue e apresentar febre, usualmente entre 2 e 7 dias, e duas ou mais das seguintes manifestações: náuseas/vômitos, exantema, mialgia/artralgia, cefaleia com dor retro-orbital.” (GVE v. 02, 2017). Essas são características apresentadas pela maioria dos casos positivos para outras arboviroses encontradas nesse estudo, conforme as fichas de alguns pacientes com informações relevantes, dados esses disponíveis no quadro 04.

Entre as amostras dos anos de 2015 e 2016 foram encontrados 09 casos de infecção pelo OROV, essas amostras estavam entre o dia 1º e o 2º dias de início de sintomas. Os casos de OROV estão distribuídos em diferentes zonas da cidade de Manaus e dois municípios do interior do Amazonas em regiões de saúde diferentes. VASCONCELOS e colaboradores já descreviam sobre a dispersão do OROV no estado do Amazonas no período de 1980-81, quando foi detectado na capital Manaus e em Barcelos, região do alto Rio Negro, após esse período outros surtos foram descritos (VASCONCELOS et al 1989, NUNES et al, 2007; VASCONCELOS et al, 2009). A forma grave da doença é pouco comum, porém achados de

material genético do vírus em fluidos cérebrós espinhal sugerem que na forma grave acometa o SNC. Diferentes estudos realizados em modelos animais demonstram a presença de antígenos virais em alta concentração em células neuronais, o vírus Oropouche mostrou um grande potencial de replicação no cérebro, provocando inflamação nas meninges e apoptose de neurônios (SANTOS et al, 2014; ROSA et al, 2017).

Entre os 09 casos positivos para OROV, três dos pacientes eram mulheres grávidas. As mulheres grávidas recebem sempre atenção diferenciada durante todo o curso da gestação, os cuidados que têm por objetivo priorizar a vida da grávida e do recém-nascido, evitando assim a mortalidade materna e perinatal (MARTINS, 2014). Várias doenças podem afetar a gestante e o feto, especialmente no início da gravidez. Para a mãe pode ocorrer diversas complicações que levam ao abortamento e para o feto interferência direta no seu desenvolvimento intrauterino. Entre as doenças que podem causar esse tipo de agravamento estão as TORCH (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes) das quais o vírus Zika está sendo considerado como provável membro a apresentar mecanismos de infecção semelhante, bem como, potencial de causar danos ao desenvolvimento fetal e doenças neurológicas (COYNE e LAZEAR, 2016; NORONHA et al, 2016).

Em relação ao vírus Oropouche em mulheres grávidas não se tem relatos envolvendo o vírus, entretanto uma das pacientes apresentou hematoma subcoriônico. O hematoma subcoriônico é tratado pelos obstetras como uma situação comum nas primeiras semanas de gravidez, segundo alguns autores o fator causal de tal ocorrência não é bem conhecido. (SAUERBREI, 1986; COUTO et al, 2002). Normalmente esse tipo de situação tem resoluções sem necessitar de interferência, apenas com repouso, porém o agravamento pode acontecer levando ao deslocamento da placenta e ao abortamento, situação não muito comum (COUTO et al, 2002). Quanto a grávida com OROV que apresentou o hematoma, não foi possível saber o desfecho da situação, nenhuma informação foi encontrada sobre as condições em que a criança nasceu, ou se nasceu.

O MAYV, outro arbovírus comumente encontrado em áreas rurais (TESH et al, 1999), foi detectado entre as amostras colhidas nos anos de 2011, 2013, 2014 e 2015, em um total de 13 pacientes com apenas um paciente da região do médio Amazonas, município de Presidente Figueiredo. A cidade de Manaus é cercada por grandes fragmentos de florestas, no entanto, o fato de pacientes residentes na cidade encontrarem-se infectados com o vírus Mayaro não significa confirmar que o vírus esteja circulando em área urbana. Caso envolvendo uma pesquisadora que viajara para a bacia Amazônica, foi descrito por SLEGERS e colaboradores, com diagnóstico de MAYV, se tratava de uma mulher Holandesa, ou seja, o vírus foi contraído provavelmente em áreas de floresta e o diagnosticado laboratorial juntamente com a

clínica ocorreu no retorno ao seu país de origem. Fato que evidencia a importância do preenchimento completo na ficha de investigação, para o rastreamento de casos. Os passeios em áreas rurais nos fins de semana, onde a maioria dos balneários se localiza, podem estar influenciando nos achados deste arbovírus em moradores residentes na capital Manaus.

As manifestações clínicas apresentadas pelo MAYV são similares aos de outras arboviroses como já fora mencionado, porém há uma relação maior com outro vírus do seu grupo, o Chikungunya em função da poliartralgia desencadeada por ambos (DUTRA et al, 2016). Dos 13 pacientes com resultados positivos para MAYV apenas alguns possuíam em suas fichas de notificação informações relacionadas aos sintomas (Quadro 4). Observe que o trabalho aqui apresentado foi pautado em amostras da demanda espontânea do LACEN-AM, bem como os dados resgatados das fichas de investigação dos pacientes, o que de certa maneira restringe as informações. A instituição em questão dá apoio ao serviço de vigilância tendo, portanto, apenas dados informados por esse serviço.

Três dos pacientes positivos para MAYV, apresentaram resultados positivos para os anticorpos da classe IgM e IgG do vírus dengue, possivelmente pode ter havido contato com esse vírus em período próximo, tendo em vista que esses eram paciente do ano de 2011. No estado do Amazonas nesse ano conforme dados disponíveis no portal saúde, em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Dengue-at---2014.pdf>, houve um número expressivo de pessoas infectadas nesse período pelo vírus dengue. O que se mostra aqui é que são vários arbovírus circulando ao mesmo tempo, sem o auxílio laboratorial, fica quase impossível fazer a distinção entre eles. Pesquisas mostram que há circulação de outros arbovírus que causam doença semelhante a dengue na região Amazonas, como o próprio MAYV, OROV, CHIKV, entre outros para os quais ainda não se tem testes disponíveis na rede pública de saúde (FIGUEIREDO, 2007; SLEGGERS et al, 2014; MOURÃO et al, 2015). Os casos positivos para MAYV são praticamente de todas as zonas da cidade com exceção da amostra do interior do estado do Amazonas, as demais da capital passaram por uma unidade de pronto atendimento, ou foram atendidos no próprio LACEN-AM. Mostrando que os profissionais da rede de atendimento básico precisam estar preparados, no que se refere ao conhecimento da circulação de diferentes arbovírus.

Além desses achados, outros dois arbovírus de interesse em saúde público foram encontrados entre as 306 amostras negativas para NS1 o ZIKV e o CHIKV. Em relação ao último apenas uma amostra apresentou-se de forma positiva na RT-qPCR, no ano de 2016 de um paciente de Manicoré, região do Rio Madeira. Esse vírus apesar de ser transmitido pelo mesmo vetor da dengue e zika, aparentemente, não se dispersou pelo estado do Amazonas até

o fechamento desse estudo. No entanto, outros estudos identificaram a circulação autóctone do CHIKV em Manaus em 2015 (Felipe Naveca, comunicação pessoal).

O vírus Zika foi aquele encontrado em maior quantitativo entre as amostras analisadas neste estudo 34 positivas, entre 2015 e 2016. Os primeiros casos autóctones do vírus foram detectados em 2015 no nordeste do Brasil (ZANLUCA et al, 2015). Dessas amostras positivas para ZIKV, uma era proveniente da região do Madeira, especificamente de Manicoré, as demais todas da capital Manaus. O ZIKV tem sua importância pautada nos casos relacionados à microcefalia, descritos no Nordeste do Brasil (CAUCHEMEZ et al, 2016; WU et al, 2016). Até esses achados era o vírus que gerava menor preocupação entre os arbovírus transmitidos por espécies do gênero *Aedes*. É importante observar que antes dos casos descritos de microcefalia no Brasil, estudos já reportavam neurotropismo do ZIKV em camundongos infectados (DICK, 1952). Porém nenhuma observação relevante havia sido feita em relação às grávidas e à infecção por este vírus. Diferentemente do CHIKV, que teve sua introdução na lista de doenças de notificação compulsória em fevereiro de 2016, o ZIKV tecnicamente não representava grande ameaça para vigilância, quando comparado aos casos de dengue e chikungunya. Apesar de ter sido divulgado, quase ao mesmo tempo que o vírus Chikungunya pela vigilância do país, quando os primeiros casos apareceram, foi inicialmente pensado em Dengue e Chikungunya (ZANLUCA et al, 2015). A zika é uma doença, na maioria dos casos autolimitada, porém a sua relação com os casos de microcefalia foi fortalecida, a partir de achados do vírus no líquido amniótico e em tecido placentário (MINER et al, 2016). O número de casos de zika pode ser superior aos aqui descritos, os casos detectados nesse estudo são apenas os negativos para o antígeno NS1 da dengue. O LACEN-AM, sendo um laboratório ligado ao sistema de vigilância do país, obedece ao que é estabelecido pelo MS. Em função da grande demanda para os prováveis casos de zika e a falta de exames sorológicos disponíveis para a detecção de anticorpos foi estabelecido que, somente as grávidas fizessem os exames em casos de suspeitas de infecção em função da microcefalia relacionada ao vírus (MS, 2016).

Coincidentemente detectamos 10 mulheres grávidas entre as 34 positivas para o vírus, entre essas pacientes duas estavam com anticorpos IgM e IgG para o vírus dengue, facilmente os casos poderiam ter sido diagnosticados como dengue a partir desses resultados sorológicos. O perfil de atendimento quanto aos pacientes suspeitos de zika, foi mudando de acordo com os avanços científicos. Atualmente os casos são tratados como Síndromes Neurológicas e não somente, casos suspeitos de microcefalia, apesar de estudos anteriores já mostrarem essa relação com o comprometimento do SNC (DICK, 1952; BELL et al, 1971). Mais de 50% (18) dos casos positivos para zika apresentaram resultados positivos para anticorpos IgG da

dengue, mostrando o contato prévio com o vírus. Esse achado é importante levando em consideração que estudos apontam para a possível relação entre o fenômeno ADE e o agravamento da doença causada pelo ZIKV (HALSTEAD, 2014; PRIYAMVADA et al, 2017), porém nesse estudo não foi houve aprofundamento para essa relação. Para os anticorpos IgM do DENV, 08 (23%) dos 34 pacientes apresentaram resultados positivos, o que pode representar uma infecção prévia pelo vírus dengue, como já foi reportado, esses anticorpos podem ser detectados até 90 dias após o início dos sintomas da doença, mas também podem ser resultados de reação cruzada entre os vírus, fato comum entre os flavivírus (STEINHAGEN et al, 2016; PRIYAMVADA et al, 2017). Não é possível apenas com esses resultados afirmar nenhuma das situações citadas em se tratando de anticorpos.

Observando os resultados para as amostras do interior, é nítida a inferioridade no montante em relação a capital. O antígeno NS1 é um pouco mais exigente quanto a questão do armazenamento e acondicionamento para envio, as amostras biológicas requerem temperatura menor que -20°C (GVE, 2017), o que não é fácil para os municípios do interior do estado. É importante observar que mesmo com essas dificuldades, foram identificadas amostras positivas em Parintins, Manicoré, Alvarães, Boa Vista do Ramos e Presidente Figueiredo por RT-qPCR, com diferentes Ct, alguns maiores que 38, onde provavelmente a questão do acondicionamento pode ter interferido nesse resultado. Porém essa dificuldade não está pautada apenas em torno do armazenamento e acondicionamento, mas no transporte via área e fluvial. Uma alternativa pensada para melhorar as condições de envio dessas amostras para que cheguem com qualidade para análise na capital seria o uso de papel de filtro, tanto para as amostras de sorologias, como as para de biologia molecular.

O presente estudo tem suas limitações em informações dos pacientes. A falta de preenchimento correto das fichas de notificações que acompanhavam as amostras impediu, algumas análise, por exemplo, avaliar os locais prováveis da infecção, os sintomas que esses pacientes apresentavam durante a coleta para a realização dos exames sorológicos, entre outros. Pedimos prorrogação para o fechamento das análises, pois solicitamos a central de dados da FVS, para complementar as informações que não foram encontradas nas fichas de investigação, no entanto, até o fechamento desse estudo não recebemos as informações. É fato que os sistemas de informações (GAL, SINAN, entre outros) são alimentados a partir dos dados constantes nas fichas de notificações, se não estiverem preenchidas, não há como alimentar. A ficha das doenças de notificação compulsória é uma ferramenta importante para a vigilância, é a partir do seu preenchimento correto, que as informações são geradas e as ações podem ser efetivas na prevenção e contenção dessas doenças. Para o diagnóstico laboratorial se constitui em tomada de decisão para escolha do exame que possa dá uma

resposta de forma precisa, tanto para o corpo clínico, como para própria vigilância, que a partir dos resultados de laboratório pode confirmar, ou não se determinada doença está em circulação (GVE, 2017).

Resultados negativos para a presença do antígeno NS1 do vírus dengue, não é significado de ausência da circulação do vírus. Por exemplo, não podemos excluir uma mutação na proteína NS1 pode estar dificultando a sua detecção pelo o anticorpo. Em um estudo no qual foi analisado o genoma completo do DENV-3 foram observadas 14 alterações nucleotídicas na sequência única de NS1 (WANG et al, 2017). Por outro lado em 2010 outro estudo com amostras de DENV-2 detectou grande número de falsos negativos para o antígeno NS1 com Platélia da BIORAD, quando comparado ao RT-qPCR, porém quando as amostras foram sequenciadas não foi observada nenhuma mutação na proteína que estivesse interferindo na ligação do anticorpo (FELIX et al, 2012). Outro fator importante é a presença de outros arbovírus circulando concomitante ao vírus dengue, como os encontrados MAYV, OROV, CHIKV e ZIKV. Portanto, a importância para um diagnóstico mais amplo, a nível laboratorial nas redes pública de saúde, é uma necessidade, contemplando o maior número de agravos com características semelhantes entre os arbovírus de importância médica. Os testes para diagnóstico da dengue precisam ser analisados de forma complementar (ZHANG et al, 2014).

A proposta de analisar as amostras negativas para o antígeno NS1 buscava a presença de anticorpos ou mesmo de material genético, duas situações distintas, apesar da possibilidade de encontrar os dois em alguns casos simultaneamente (HU et al, 2011). Outra situação esperada era um percentual alto de amostras positivas para IgG do vírus dengue, já que a região é endêmica para o vírus desde a década de 1980 (FIGUEIREDO et al, 2011; BASTOS et al, 2012). O percentual de negativas para IgG anti-dengue foi superior ao de positivas, mesmo levando em consideração que a maioria dos casos apresentava idade superior a 5 anos. Consideramos como possível fator interferente em nossos resultados: a) o tempo de armazenamento e b) variáveis como falta de energia. Porém segundo estudo realizado pela equipe do Instituto Adolfo Lutz, congelamento e descongelamento de amostras não são fatores interferentes no diagnóstico de anticorpos (CASTEJON et al, 2012). Apesar do estudo de CASTEJON vale ressaltar, por exemplo, que em análise de outras amostras que não a do estudo, congeladas e descongeladas somente uma vez para o teste de IgG, a DO (densidade ótica) que é emitida pelo leitor do teste de ELISA, foi mais alta do que nas 306 amostras do estudo. Em relação aos anticorpos IgM 83 amostras das 306 apresentaram resultados positivos, das quais 09 apresentaram resultados positivos na RT-qPCR. Quatro dessas amostras estavam com Ct acima de 38, situação possível se o período entre a data de coleta e

início de sintomas foi maior que 4 dias, porém segundo as informações constantes na ficha de investigação dessas amostras, esse período estava entre o 1º e 4º dias. Uma possível reação cruzada com outro flavivírus, ou infecção por outro sorotipo do vírus dengue nos últimos dois ou três meses, justificaria a presença desses anticorpos nessas amostras, esses resultados foram reproduzidos por diferentes kits comerciais de ELISA. As cinco que apresentaram Ct menor que 38, todas foram positivas tanto no IgG, quanto no IgM, porém há um questionamento para as que apresentaram resultados positivas para IgM, pois o kit usado foi o da VIRION.

Na rotina do LACEN-AM foi observado um número expressivo de amostras positivas e indeterminadas para dengue com esse kit, quando comparado a outros kits. Foi feito um comparativo com o kit da PANBIO e os resultados foram divergentes. Segundo o fabricante, o kit da VIRION apresenta uma alta sensibilidade, no entanto a discordância com as análises realizadas com o kit da PANBIO foi reportado ao representante da empresa fornecedora. Nas 306, foi feito o comparativo com três diferentes kits comerciais (GRAF. 11), onde os resultados positivos com o kit da VIRION aparecem em maior número. Os kits comerciais atuais ampliaram o limite de detecção segundo os fabricantes com o objetivo de pegar o maior número de indeterminados, o que finda por aumentar a sensibilidade e diminuir a especificidade. Um exemplo é o comparativo entre os kits comerciais para detectar anticorpos IgM anti-chikungunya e o MAC-ELISA, os resultados são discrepantes com quase nenhuma concordância (estudo não publicado). O kit da VIRION está entre os de alta sensibilidade com menor especificidade, o que para laboratório de referência não é ideal. Segundo representante da empresa, tal situação foi corrigida a partir dos nossos informes.

8 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostra que os testes para o antígeno NS1 do vírus dengue são importante para o diagnóstico inicial em casos suspeitos de dengue, porém não deve ser analisado de forma isolada. A ausência do antígeno deve ser analisada com cautela pelo responsável clínico sempre contextualizando com o histórico do paciente, visto que das 306 amostras analisadas, 17 apresentaram resultados positivos para o vírus dengue na RT-qPCR, das quais três foram sequenciadas para o genótipo II do DENV-4. Quando testadas para os anticorpos IgG, 14 obtiveram resultados positivos indicativo de infecção secundária e 3 apresentaram resultados negativos na IgG, indicativo de infecção primária pelo vírus dengue.

Em relação aos resultados para o antígeno NS1 as 306 amostras foram testadas por diferentes kits comerciais, inclusive por um teste rápido, havendo concordância em todos para negatividade. Ao serem testadas para os anticorpos anti-dengue IgG, 134 apresentaram resultados positivos, indicativo de infecção prévia. Outras 136 apresentaram resultados negativos e 36 ficaram no nível de indeterminadas. A busca por respostas para os índices de negatividade para o antígeno NS1 é uma necessidade que não só esse estudo, mais outros aqui citados já haviam detectado.

Quanto à infecção recente pelo DENV, 30 amostras apresentaram resultados positivos para anticorpos IgM anti-dengue, havendo concordância entre três diferentes testes realizados. No entanto devido à janela de tempo em que esses anticorpos podem ser detectados, esse resultado não comprova que o quadro febril agudo foi causado pelo DENV.

Em se tratando de outras arboviroses circulando no estado, entre interior e capital, quatro outros diferentes vírus foram encontrados: ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV, mostrando a relevância desse estudo para implantação de diagnóstico laboratorial para outras arboviroses na rede pública de saúde. Destacando ainda a melhoria no diagnóstico já existente, a importância do preenchimento correto da ficha de investigação, pois para a vigilância atuar de forma eficiente é necessário que os serviços se complementem.

9 EQUIPE DO PROJETO

QUADRO 5 – Demonstrativo da equipe que constitui e suas respectivas funções no projeto

INTEGRANTES	INSTITUIÇÃO DE VÍNCULO	TITULAÇÃO	FUNÇÃO NO PROJETO
Dana Cristina da Silva Monteiro	<i>Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ)</i>	Graduada em Biomedicina	Colaboração em ensaios de RT-qPCR, e cultura de células.
Felipe Gomes Naveca	<i>Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ)</i>	Doutor em Microbiologia	Coordenador e orientador do projeto.
Glauco Coelho Mota	<i>Laboratório Central (LACEN/AM) - Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (FVS/AM)</i>	Especialista em Citologia	Colaborador
Marineide Souza da Silva	<i>Laboratório Central (LACEN/AM) - Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (FVS/AM)</i>	Mestranda em Imunologia	Colaboração na captação e transporte de amostras, em ensaios de RT-qPCR, sorologia e análises de dados.
Rosemary Costa Pinto	<i>Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (FVS/AM)</i>	Especialista em informação e Informática em Saúde	Colaboração nas análises epidemiológicas.
Valdinete Alves do Nascimento	<i>Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ)</i>	Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia	Colaboração em ensaios de RT-qPCR/biologia molecular, sorologia e análises de dados
Victor Costa de Souza	<i>Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ)</i>	Mestre em Ciências da Saúde	Colaboração em ensaios de sequenciamento e análises de dados.

BIBLIOGRAFIAS

- ACOSTA, P.O.A. et al. **False-negative dengue cases in Roraima, Brazil: an approach regarding the high number of negative results by NS1 ag kits.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 56, 447–450, 2014.
- ALCON, S. et al. **Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during acute phase of disease in patient experiencing primary or secondary infection.** Am J. Trop. Med. Hyg, v. 83, n. 3, p. 690-695, 2010.
- AMORIM, J. H. et al. **The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits.** Vírus Research, vol. 181 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170214000033>>. Acessado em 23/03/2016.
- AVIRUTNAN P. et al. **Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the e nonstructural viral protein NS1 and complement.** J Infect Dis, 2006. 193(8):1078-1088. doi:10.1086/500949. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/193/8/1078>>. Acessado em 25/05/2016.
- AVIRUTNAN P. et al. **Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1.** Journal of Experimental Medicine, 2010. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/207/4/793.short>> Acessado em: 25/03/2016.
- BAHIA, M. T. et al. **Utilização do eluato de sangue dessecado em papel de filtro no diagnóstico sorológico da toxoplasmose caprina.** Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v.32, n.2, p.83-8, 1995. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/7266/1/ARTIGO_Utiliza%C3%A7%C3%A3oEluatoSangue.pdf> Acesso em: 23/08/2017.
- BARRETO, M. L. e TEIXEIRA, M. G. **Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa.** Estudos Avançados 22, Scielo. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ea/v22n64/en_a05v2264.pdf>. Acesso em: 18/08/2017.
- BASSI, M. G. et al. **Results of the actions performed by the Regional Laboratory Center of the rapid and Elisa .** 2011;8(89):16-24.
- BASTOS, M. de S. F. et al. **Short report: Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 86, n. 4, p. 732-735, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/Articles/PMC3403753>> Acesso em: 31/10/2017.
- BELL, T. M, et al. **Zika virus infection of the central nervous system of mice by intracerebral inoculation of newborn and 5-week-old mice with Zika virus.** Arch. für dea Gesamte Virusforschung. 193.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.** Brasília: DF, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança** [recurso eletrônico] – 5. ed. Brasília : MS, 2016. <<http://www.saude.gov.br/public/media/ZgUINSpZiwmb3/10900120219262619909.pdf>> Acesso em 13/03/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde. 7º ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014

CABRAL-CASTRO M J. et al. **Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients.** *J Clin Virol.* 2016;. doi:10.1016/j.jcv.2016.07.017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27479173>>. Acesso em: 15/08/2017.

CASTEJON, M. J. et al. **Avaliação dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade dos soros para a detecção de anticorpos anti-HIV.** *Rev Inst Adolfo Lutz.* 71: 573-581, 2012. Disponível em: <<http://ses.sp.bvs.br/lildbi/docsonline/get.php?id=4070> > Acesso em: 28/10/2017.

CAUCHEMEZ, S. et al. **Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study.** Published online March 15, 2016. Disponível <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673616006516>. Acesso em: 10/03/2018.

CHAKRAVARTI, A. et al. **Detection of dengue infection by combining the use of an ns1 antigen based assay with antibody detection.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011;42(2):297-302.

CHAMBERS, T. J. et al. **Flavivirus Genome Organization, expression and replication.** *Revista de Microbiologia*, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHEN R.; VASILAKIS N. **Dengue-Quo tu et quo vadis?** *Viruses*, v. 3, n. 9, p. 1562-1608, 2011. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/3/9/1562>> Acesso em 25/03/2016.

CHUNG, S. J. et al. **Two cases of false-positive dengue non-structural protein 1 (NS1) antigen in patients with hematological malignancies and a review of the literature on the use of NS1 for the detection of dengue infection.** *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(2):367-369. doi:10.4269/ajtmh.14-0247. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/92/2/367>> Acessado em: 25/03/2016.

CLETON, N. et al. **Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers.** *Journal of Clinical Virology*, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.

COUTO, J. C. F. et al. **Chronic Placental Abruptio - A Case Report.** *RBGO* - v. 24, nº 3, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v24n3/a09v24n3.pdf>> Acesso em: 21/10/2017.

COYNE, C. B. e LAZEAR, H. M. **Zika virus — reigniting the TORCH.** *Nat Rev Microbiol.* 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573577>> Acesso em 20/10/2017.

DARNEL, J. E. et al. **Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins.** *Science*, v. 264, junho/1994.

DECEMBRE, E. et al. **Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells.** *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 10, 2014.

DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. **Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control.** *Cell*, v. 162, n. 3, p. 488–492, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.005>>. .

DICK, G. W. A. et al. **Zika Vírus (I). Isolations and Serological Specificity.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, p. 521-534, 1952.

DICK, G. W. A. **Zika Vírus (II) Pathogenicity and Physical Properties**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 46, maio/1952.

DUTRA, H. L. C. et al. **The re-emerging arboviral threat: Hidden enemies: The emergence of obscure arboviral diseases, and the potential use of Wolbachia in their control**. BioEssays, v. 39, p. 1-10, fevereiro/2017.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. **Co-infection with zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014**. Emerging Infectious Diseases, v. 21: 381-382, 2015. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1553_article > Acesso em: 21/10/2017.

FELIX, A. C. et al. **Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos, Brazil, in 2010**. Journals AS Morg, v. 19: 1972-1976, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535870/pdf/Zcd1972.pdf> > Acesso em: 31/10/2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. **Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using infected mosquito cells as antigen**. Trans R Soc. Trop. Med. Hyg. 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2575811> Acesso em: 15/10/2017

FIGUEIREDO, L. T. M. **Patogenia das Infecções pelos Vírus do Dengue**. Medicina, Ribeirão Preto, 32: 15-20, jan./mar. 1999. Disponível em: < http://www.fmrp.usp.br/revista/1999/vol32n1/patogenia_infecoes_pelos_virus_do_dengue.pdf > Acesso em: 16/11/2011.

FIGUEIREDO, L. T. M. **Emergent arboviruses in Brazil**. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(2):224-229. doi:10.1590/S0037-86822007000200016. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid > Acessado em 25/03/2016

FIGUEIREDO, R. M. P. et al. **Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 37(6):476-479, nov-dez, 2004. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v37n6/22453.pdf> > Acesso em: 24/08/2017

FIGUEIREDO, R. M. P. et al. **Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil**. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 4, April 2008. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570911/pdf/07-1185_finalD.pdf > Acesso em: 23/08/2017.

FIGUEIREDO, R. M. P. et al. **Co-infection of Dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil**. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 2011. 53, 321–323.

GANDINI, M. et al. **Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF- α and IFN- α profiles**. Memórias Inst Oswaldo Cruz, v. 106, p. 594–605, agosto/2011.

GÓMEZ, J. F. B. et al. **Comparação da Coleta das Amostras de Sangue na Triagem Pré-Natal, Utilizando o Papel de Filtro e Punção Venosa na Técnica de ELISA para Detecção de Sífilis**. DST - J bras Doenças Sex Transm; 22(3):123-128- ISSN: 0103-4065 - ISSN on-line: 2177-8264, 2010. Disponível em: <<http://www.dst.uff.br/revista22-3-2010/Comparacao%20da%20Coleta%20das%20Amostras%20de%20Sangue.pdf>> Acesso em: 23/08/2017.

GUBLER, D. J. **Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century**. Dengue Bulletin, v. 21, p. 1-14, 1997.

GUBLER, D. J. **Human arbovirus infections worldwide**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 951, p. 12-34, 2006.

GUBLER, D. J. **The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems**. Archives of Medical Research, v. 33, p. 330-342, 2002.

GURUKUMAR, K. R. et al. **Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses**. Jornal de Virologia, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2651855/pdf/1743-422X-6-10.pdf>> Acesso em 04/04/2016.

GUZMAN, M. G. et al. **Dengue: a continuing global threat**. Nat Rev Microbiol [Internet]. Nature Publishing Group; 2010; 8(12):S7–16. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2460>> Acesso em: 25/03/2016.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. **Dengue diagnosis, advances and challenges**. International Journal of Infectious Diseases, v. 8, n. 2, p. 69–80, 2004.

HALSTEAD, S. B. **Dengue Antibody-Dependent Enhancement : Knowns and Unknowns**. Microbiology Spectrum, v. 2, n. 6, p. 1-18, dezembro/2014.

HANNA, J. N. **Dengue Diagnostics: Recommendations From the Asia-Pacific and the Americas Dengue Prevention Boards**. 2010. Disponível em: <http://www.denguevaccines.org/sites/default/files/Dengue%20Diagnostics_Recommendations%20from%20the%20Asia-Pacific%20and%20the%20Americas%20DPBs.pdf> Acesso em: 25/03/2016.

HU, D.; DI, B.; DING, X. et al. **Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection**. Virology Journal, v. 8, n. 1, p. 47, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-47>>.

HUHTAMO E, et al. **Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology**. *J Clin Virol*. 2010;47(1):49-53. doi:10.1016/j.jcv.2009.11.001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653209005423>>. Acesso em: 18/08/2017.

KASSIM, F. M.; IZATI, M. N.; TGROGAYAH, T. et al. **Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection**. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, v. 42, n. 3, p. 562–569, 2011.

KRAEMER, M. U. G. et al. **The global compendium of Aedes aegypti and Ae. albopictus occurrence**. Scientific Data, v. 2, julho/2015.

KHROMYKH, A. A. et al. **cis- and trans-Acting Elements in Flavivirus RNA Replication**. Journal of virology, 0022-538X/00/\$04.0010. 2000, p. 3253–3263. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/74/7/3253>>. Acesso em 25/08/2017.

LAMBRIS, J. D. et al. **Complement evasion by human pathogens**. Nature Reviews Microbiology, v. 6, p. 132-142, fevereiro/2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. **Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic , Yap State** . Doenças Infecciosas Emergentes, vol. 24, n. 03 - 2008. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article>. Acesso em 15/08/2017.

LEUNG, J. Y.; PIJLMAN, G. P. et al. **Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly**. Journal of Virology, v. 82, n. 10, p. 4731–4741, 2008. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00002-08>>.

- LIBRATY, D. H, et al. **Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever.** The Journal of Infectious Diseases 2002;186:1165–8, setembro/2002. Disponível em: < <http://jid.oxfordjournals.org/>> Acesso em: 18/11/2016.
- LIMA, M. da R. Q. N. et al. **Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of Dengue in Brazil.** PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 04 – 2010. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000738>>. Acesso em: 16/08/2017.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. **trans-Complementation of Yellow Fever Virus NS1 Reveals a Role in Early RNA Replication.** Journal of virology, v. 71 n. 12, p. 9608–9617, Dezembro/1997.
- LOKE, H. et al. **Strong HLA class I - restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword?** J Infect Dis, v.184, p. 1369–1373, 2001. Disponível em: < <http://jid.oxfordjournals.org/content/>> Acesso em: 25/03/2016.
- LONG, K. C. et al. **Experimental transmission of Mayaro virus by Aedes aegypti.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 85, p. 759-757, abril/2011.
- LOPES, N., et al. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil.** Rev Pan-Amaz Saude 2014; 5(3):55-64. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v5n3/v5n3a07.pdf>>. Acesso em: 25/08/2017.
- MACKAY, I. M. e ARDEN, K. E. **Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city?** *Microbes Infect.* 2016. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27989728>> Acesso em: 20/10/2017.
- MARTINS, M. F. da S. V. **O programa de assistência pré-natal nos Cuidados de Saúde Primários em Portugal – uma reflexão.** Revista Brasileira de Enfermagem – REBEN, 2014.
- MASERA, D. C.; LARA, G. M. **Febre Hemorrágica do Dengue: Aspectos clínicos, epidemiológicos e Laboratoriais de uma arbovirose.** Revista Conhecimento online, ano 3 v. 2 Setembro/2011. Disponível em: <www.feevale.br/revistaconhecimentoonline> Acesso em: 18/11/2015.
- MESSEIAS, M. C. **Vivendo com os insetos.** Rio de Janeiro, RJ: Biomanguinhos/FIOCRUZ, 2011.
- MINER, J. J. et al. **Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise.** Cell. May 2016; 165(5): 1081–1091. doi:10.1016/j.cell.2016.05.008 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4874881/pdf/nihms-785736.pdf>> Acesso em 23/08/2017.
- MORRISON, J. et al A. **Innate immunity evasion by dengue virus.** Viruses. 2012. 4(3): 397–413. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1999-4915/4/3/397>> Acesso em: 25/03/2016.
- MOURÃO, M. P. G. et al. **Arboviral diseases in the western brazilian amazon: A perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, state of Amazonas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 48, p. 23-27, agosto/2013.
- MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. **The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker.** Antiviral Research, v. 98, p. 192-208, fevereiro/2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S>> Acesso em: 25/03/2016.

MUKHOPADHYAY, S; KUHN, R. J. et al. **A structural perspective of the flavivirus life cycle.** Nature Reviews Microbiology, v. 3, p. 13-22, janeiro/2005.

MURPHY, B. R, WHITEHEAD, S.S. **Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine.** Annu Rev Immunol. 2011, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101315. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101315>. Acesso em 15/08/2017.

MURRAY, C. L. et al. **Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis.** Nature Reviews Microbiology, v. 6, p. 699-708, setembro/2008.

MUSSGAY, M. et al. **Growth cycle of Arboviruses in vertebrate and Arthropode Cells.** Progr. Med. Virologia, v. 19, p. 257-323, 1975.

NAVECA, F. G. et al. **Complete genome sequence of a Dengue virus serotype 4 strain isolated in Roraima, Brazil, 2012** J. Virol. 86, 1897–1898. doi:10.1128/JVI.06731-11.

NORONHA, L. et al. **Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.111 n°. 5 Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016000500287> Acesso em 25/10/2017.

NUNES, R. M. T. et al. 2007. **A febre do Oropouche: uma revisão dos aspectos epidemiológicos e moleculares na Amazônia Brasileira.** Cad Saúde Coletiva 15: 303–18.

PASTULA, D. M. et al. **Four emerging arboviral diseases in North America: Jamestown Canyon, Powassan, chikungunya, and Zika virus diseases.** Journal of NeuroVirology, v. 22, p. 257-260, março/2016.

PEELING, R. W. et al. **Evaluation of diagnostic tests: dengue.** Nat Rev Microbiol [Internet]. Nature Publishing Group; 2010. 8 (12): 530–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2459>> Acessado em: 25/03/2016

PRIYAMVADA, L. et al. **Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology.** Emerging microbes & infections v. 6, maio/2017.

RICO-HESSE, R. **Dengue Virus Virulence and Transmission Determinants.** Published in final edited form as: Curr Top Microbiol Immunol. 2010 ; 338: 45–55. doi:10.1007/978-3-642-02215-9_4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19802577>> Acesso em: 20/11/2012.

RAMOS, E. F. **Hemoterapia e febre Dengue.** Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia: Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?>> Acesso em: 16/08/2014.

ROSA, J. F. T. da et al. **Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus.** Am J Trop Med Hyg. 2017 May 3; 96(5): 1019–1030. Disponível em: <http://ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.16-0672>> Acesso em:19/08/2017.

RÜCKERT, C. et al. **Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes.** Nature Communications, v. 8, maio/2017.

SANKAR, G.S, et al. **Evaluation and use of NS1 IgM antibody detection for acute dengue virus diagnosis: report from an outbreak investigation.** Clinical Microbiology and Infection, Volume 18 Number 1, January 2012. Disponível em:<

<https://pdfs.semanticscholar.org/dd34/d7484d653db559f98d2cef7b963eedcee34.pdf>
Acesso em: 25/08/2017.

SANCHEZ, C. S. M. et al. **Dealing with low pH: entry and exit of alphaviruses and flaviviruses.** Published in final edited form as: Trends Microbiol. 2009 November ; 17(11): 514–521. doi: 10.1016/j.tim. 2009.08.002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/Cor_rigidoDengue.pdf>. Acesso em: 06/11/2014.

SANTOS, G. E. O. **Cálculo amostral: calculadora on-line.** Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: 15/06/2017.

SANTOS, R. I. et al. **Spread of Oropouche Virus into the Central Nervous System in Mouse.** Viruses, 2014. Disponível em: < www.mdpi.com/journal/viruses> Acesso em: 23/10/2017.

SAUERBREI, E. E. **Placental abruption and subchorionic hemorrhage in the first half of pregnancy: US appearance and clinical outcome.** *Radiology*. 1986. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3520643>> Acesso em: 20/10/2017.

SILVA, F. G. et al. **Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue – São Paulo.** Boletim Epidemiológico Paulaulista. 2011. 8(91): 14–26.

SIMONIN, Y. et al. **Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious profiles in Human Neural Cells.** EBioMedicine 12 (2016) 161–169. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27688094>> Acesso em: 23/08/2017.

SLEGERS, C. A. D. et al. **Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: Is there a risk for attendants to the 2014 FIFA World Cup?** Journal of Clinical Virology, v. 60, p. 317-319, março/2014.

SMIT, J. M. et al. **Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus?** see front matter! Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.tim.2011.02.002 Trends in Microbiology xx (2011) 1–7.

SMITH, G. F. D. **Laboratory studies of a Brazilian strain of Aedes albopictus as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses.** J Am Mosq Control Assoc 7: 89 – 93 1991.

STEINHAGEN, K. et al. **Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: A multicohort study of assay performance, 2015 to 2016.** *Eurosurveillance*: v. 21:1-16, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291135/pdf/eurosurv-21-30426.pdf>> Acesso em: 30/10/2017.

TEMPORÃO, J. G. et al. **Dengue virus serotype 4. Roraima state, Brazil.** Emerg. Infect. Dis, 17: 938-940, 2011.

TERZIAN, A. C. B, et al. **Sporadic Oropouche Virus Infection, Acre, Brazil.** Autores Afiliados: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: SP. Emerging Infectious Diseases, vol. 15, n. 2, 2009. Disponível em: <<https://wwwnc.cdc.gov/eid/past-issues/volume-15>>. Acesso em: 25/08/2017.

TESH, R. B. et al. **Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America.** Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 28, p. 67-73, janeiro/1999.

THEILER, M.; SMITH, H. H. **The Use of Yellow Fever Virus Modified By in Vitro Cultivation for Human Immunization.** The Journal of experimental medicine, v. 65, p. 787-800, junho/1937.

- TILSTON-LUNEL, N. L. et al. **Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs**. *Journal of Virology*, v. 90, p. 2616-2627, maio/2016.
- TIWARI, S. K. et al. **Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection**. *Emerging Microbes & Infections*, v. 6, abril/2017.
- UYAR, Y. **Arboviral Infections around the World**. *Journal of Tropical Diseases*, v. 1, n. 4, p. 4172, 2013. Disponível em: <<http://www.esciencecentral.org/journals/arboviral-infections-around-the-world-2329-891X.1000e105.php?aid=21191>>.
- VALLE, D. B. I. **Aedes aegypti: histórico do controle no Brasil**. *Epidemiol e Serviços Saúde*, 2007; 16(2): 113-118. doi:10.5123/S1679-49742007000200006.
- VASCONCELOS, H. B. et al. **Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates**. *Journal of Clinical Virology*, v. 44, p. 129-133, novembro/2009.
- VASCONCELOS, H. B. et al. **Molecular epidemiology of oropouche virus, Brazil**. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, p. 800-806, maio/2011.
- VASCONCELOS, P. F. C. et al. **Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 31, p. 271-278, abril, 1989.
- VASCONCELOS, P. F. C. et al. **Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000–2016**. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 16, p. 295-301, maio/2016.
- VILLAMIL-GÓMEZ, W.E. et al. **Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia**. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 51: 135-138, 2016. Disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-infectious-diseases> > Acesso em: 30/10/2017.
- WANG, X. et al. **Complete genome analysis of dengue virus type 3 isolated from the 2013 dengue outbreak in Yunnan, China**. *Virus Res.* v. 238:164-170, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170217302666?via%3Dihub>> Acesso em: 30/10/2017
- WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. **Evaluation of a commercial SD dengue virus NS1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for early diagnosis of dengue virus infection**. *J Clin Microbiol.* 2010. doi:10.1128/JCM.02142-09.
- WEAVER, S. C.; REISEN, K. W. **Present and Future Arboral Threats**. *Antiviral Research*. 2010. 1-36 p. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>>. Acesso em: 25/03/2016
- WHITEHORN, J. S.C P. **The pathogenesis of dengue**. *Vaccine*. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X11010437>> Acesso em: 25/03/2016.
- WONG, S. J. et al. **A Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis**. *EBioMedicine*, v. 16, p. 133-140, 2017.
- WU J. et al. **Available Evidence of Association between Zika Virus and Microcephaly**. *Chinese Medical Journal*, v 129 october, 2016.
- YOUN, S. et al. **A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition**. *J Virol* [Internet]. 2010. 84 (18): 9516–32. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/84/18/9516>> Acesso em: 25/03/2016.

ZANLUCA, C. et al. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 110(4): 569-572, June 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061233>> Acesso em: 23/08/2017.

ZHANG, H. et al. **NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue infection: A meta-analysis.** International Journal of Infectious Diseases, v. 26, p. 57–66, 2014. International Society for Infectious Diseases. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.002>>.

Sites consultados:

<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>

<https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=toga> Acesso em: 23/02/2017

<https://wwwn.cdc.gov/arbocat/History.aspx> Acesso em: 23/02/2017

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Acesso em: 24/04/2017

<https://guiadamonografia.com.br/wp-content/uploads/2017/05/Norma-ABNT-6023-Referencias.pdf> Acesso em : 04/08/2017.

http://site.ufvjm.edu.br/revistamultidisciplinar/files/2011/09/NBR_14724_atualizada_abr_2011.pdf. Acesso em : 05/08/2017

ANEXOS

Aprovação do projeto no CEP UEA

Plataforma Brasil

05/04/16 14:38

Saúde

Informe o E-mail

Informe a Senha

LOGIN

Esqueceu a senha?

Cadastre-se

v3.0

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: Epidemiologia Molecular da Dengue e outras arboviroses no Amazonas
 Pesquisador Responsável: Felipe Gomes Naveca
 Contato Público: Felipe Gomes Naveca
 Condições de saúde ou problemas estudados:
 Descritores CID - Gerais:
 Descritores CID - Específicos:
 Descritores CID - da Intervenção:
 Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 22/02/2016



- DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO OSWALDO CRUZ
 Cidade: MANAUS

- DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5016 - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
 Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777
 Telefone: (92)3878-4368
 E-mail: cep.uea@gmail.com

- CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

- CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

[Voltar](#)

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior),
 ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).

Requisição de Exame no GAL



República Federativa do Brasil
Ministério da Saúde

Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial - GAL

Requisição de Exame

REQUISIÇÃO

1 Nº Requisição:

2 Unidade de Saúde (ou outra fonte)*

3 CNES**

4 Município de Atendimento:

5 Código IBGE*

6 UF:

7 Cartão Nacional de Saúde (CNS) do Profissional de Saúde**

8 Nome do Profissional de Saúde**

9 Número do Conselho/Mantida**

10 Rubrica:

11 Data de Solicitação*:

12 Finalidade*
1 - Campanha 2 - Inquérito 3 - Investigação
4 - Programa 5 - Protocolo 6 - Projeto 9 - Ignorado

13 Descrição da Finalidade:

14 Cartão Nacional de Saúde (CNS) do Paciente**

15 Nome do Paciente**

16 Data de Nascimento**

17 Idade**
Quantidade

18 Sexo**
1 - Masculino 2 - Feminino
3 - Menor 4 - Outro

19 Nacionalidade*:

20 Nome da Mãe*:

21 Raça/Cor*
1 - Branca 2 - Preta 3 - Parda
4 - Amarela 5 - Indígena 99 - Sem Informação

22 Etnia*:

23 Documento 1:
1 - RG 2 - CPF 3 - CNH 4 - Outros
5 - CNASC 6 - FRONT 7 - INFOPEN

24 Documento 2:
1 - RG 2 - CPF 3 - CNH 4 - Outros
5 - CNASC 6 - FRONT 7 - INFOPEN

25 Logradouro: (Rua, Avenida...)

26 Complemento do Logradouro:

27 Ponto de Referência:

28 Bairro:

29 Município de Residência**

30 Código IBGE**

31 UF**

32 CEP:

33 DDD / Telefone:

34 Zona:
1 - Urbana 2 - Periurbana 3 - Rural
4 - Silvestre 9 - Ignorado

35 País (Se reside fora do Brasil)**

36 Agravou Doença*:

37 Data dos Primeiros Sintomas:

38 Idade Gestacional:
1 - 1^o Trm 2 - 2^o Trm 3 - 3^o Trm 4 - Ignorado
5 - Não 6 - Não se Aplica 8 - Ignorado

39 Caso:
1 - Suspeito 2 - Comunicante 3 - Acompanhamento
4 - Controle 5 - Óbito 6 - Caso grave 7 - Surto
8 - Diagnóstico 9 - Ignorado

40 Tratamento:
1 - Dia 2 - Semana 3 - Mês 4 - Ano 9 - Ignorado

41 Etapa de Tratamento:
1 - Pré-tratamento 2 - Tratamento 3 - Retratamento
4 - Avaliação de Resistência 5 - Ignorado

42 Paciente Tomou Vacina?
1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado

43 Vacina?:

44 Data da Última Dose:

45 Notificado ao SINAN:
1 - Sim

Preencher com as informações para rastreo no Sistema Nacional de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde.

46 CID 10*

47 Nº Notificação do SINAN*

48 Data de Notificação*

49 Unidade de Saúde Notificante:

50 CNES*

51 Município de Notificação:

52 Código IBGE*

53 UF:

AMOSTRA / EXAME

54 Pesquisa (s) / Exame(s) Solicitado (s) *	55 Material Biológico*	56 Localização:	57 Análise (1*, 2*, 3*, 4*, 5*, 6*, 7*, 8*, 9*, 10*)	58 Res. Direta (1 - Sim 2 - Não 3 - Não 4 - Não 5 - Não 6 - Não 7 - Não 8 - Não 9 - Não 10 - Não)	59 Data da coleta*	60 Hora da coleta:	61 Usou medicamento antes da data da coleta?	
							61 Sim 2 - Não 9 - Ignorado	62 Data início do uso:

63 Observações Gerais:

*Campo de preenchimento obrigatório **Preenchimento automático com informações do Cartão Nacional de Saúde (CNS)

Ordem	Descrição dos Campos
01	Número da requisição: gerado pelo sistema após o cadastro da requisição de exame. (OBRIGATÓRIO).
02	Unidade de Saúde: nome da unidade de saúde que solicita exame (s) da rede de laboratórios.
03	CNES (Cadastro Nacional dos Estabelecimentos de Saúde) com o número correspondente. (OBRIGATÓRIO).
04	Município de Atendimento: Município da Unidade de Saúde onde foi realizada a solicitação do (s) exame(s) do paciente.
05	Código do IBGE: correspondente ao Município de atendimento (OBRIGATÓRIO) do paciente.
06	UF: sigla da Unidade da Federação da Unidade de Saúde responsável pela solicitação de exame(s).
07	CNS (Cartão Nacional de Saúde) do profissional de saúde. (AUTO-PREENCHIMENTO).
08	Nome completo do profissional de saúde responsável pela solicitação de exame (s) sem abreviaturas. (OBRIGATÓRIO e AUTO-PREENCHIMENTO).
09	Número do Conselho ou matrícula (abreviatura) do profissional de saúde (OBRIGATÓRIO e AUTO-PREENCHIMENTO) . Ex: CRM/RJ 1234.
10	Assinatura e carimbo do profissional de saúde responsável pela solicitação de exame (s).
11	Data da solicitação do exame (s) no formato dd/mm/aaaa. (OBRIGATÓRIO).
12 e 13	Finalidade da requisição de exame: 1 – Campanha (evento investigatório com período definido para doença/agravo específico); 2 – Inquérito (investigação contínua ao longo do tempo para doença/agravo específico); 3 – Investigação (aplicável a doenças/agravs em período e área definidos, em eventos inesperados ou programados, como surtos ou sentinelas); 4 – Programa (eventos investigativos ligados a ações de programas específicas das esferas governamentais) ; 5 – Protocolo (investigação diagnóstica definida por instituição ou esfera governamental, para definição de perfil diferencial ligado a doença/agravo principal) ; 6 – Projeto (investigação de doença/agravo ligado a pesquisa) e 9 – Ignorado. Especificar a finalidade da requisição do exame a nível: Nacional ou Estadual. Descrição: descrição da finalidade. Ex: Inquérito de Sarampo, Programa MIE Paranaense...
14	CNS (Cartão Nacional de Saúde) do Paciente – CNS (AUTO-PREENCHIMENTO).
15	Paciente: nome completo e sem abreviatura. (OBRIGATÓRIO e AUTO-PREENCHIMENTO).
16	Data de nascimento do paciente. No formato dd/mm/aaaa. (AUTO-PREENCHIMENTO).
17	Idade do paciente: campo deve ser preenchido somente se a data de nascimento for desconhecida. (Ex: 10 dias => deve ser informado na lacuna quantidade o número "10" e na segunda lacuna o item correspondente à opção "2", que significa dia). 1 – Horas(s); 2 – Dia(s); 3 – Mês(es) e 4 – Anos. (OBRIGATÓRIO e AUTO-PREENCHIMENTO).
18	Sexo do paciente. F – Feminino; M – Masculino e I – Ignorado. (OBRIGATÓRIO e AUTO-PREENCHIMENTO).
19	Nacionalidade: país de origem do paciente.
20	Raça/Cor: 1 – Branca; 2 – Preta; 3 – Parda; 4 – Amarela; 5 – Indígena e 99 – Sem informação. (AUTO-PREENCHIMENTO).
21	Etnia: Caso o campo 20 seja preenchido pela opção indígena automaticamente aparece a tabela de etnia. (AUTO-PREENCHIMENTO).
22	Nome da mãe: Informar o nome completo e sem abreviações. (OBRIGATÓRIO e AUTO-PREENCHIMENTO).
23 e 24	Documento do paciente 01 e 02 : Este campo deve ser preenchido informando na primeira lacuna o tipo de documento e em seguida seu número. Ex: CPF: 777.888.999.00 => deve ser informado o item correspondente à opção "2", que significa CPF e segunda lacuna o número 555.555.555.55). 1 – RG – Carteira de Identidade; 2 – CPF – Cadastro de Pessoa Física; 3 – CNH – Carteira Nacional de Habilitação; 4 – CNS – Cartão Nacional de Saúde; 5 – CNASC – Certidão de Nascimento; 6 – FRONT – Prontuário e 7 – INFOPEN - Sistema de Informações Penitenciárias. Número do documento.
25	Logradouro: endereço do paciente. Ex: Rua, avenida...
26	Número do logradouro do paciente. Ex: apartamento, casa...
27	Complemento do logradouro: dados complementares do logradouro do paciente.
28	Ponto de referência: auxílio na localização do logradouro do paciente.
29	Bairro onde reside o paciente.
30	Município do logradouro do paciente. (AUTO-PREENCHIMENTO).
31	Código do IBGE correspondente ao município de residência do paciente. (OBRIGATÓRIO e AUTO-PREENCHIMENTO).
32	UF: Sigla da Unidade de Federação do logradouro do paciente. (AUTO-PREENCHIMENTO).
33	CEP (Código de endereçamento postal) do logradouro do paciente. Ex: 71860-800.
34	Código da localidade e o telefone para contato do paciente. (DDD e número do telefone). Ex: 65-33213-8000.
35	Zona: classificação do logradouro do paciente. 1 – Urbana; 2 – Periurbana; 3 – Rural; 4 – Silvestre e 9 – Ignorado.
36	País do logradouro do paciente. Se residente fora do Brasil preenchimento do País. (OBRIGATÓRIO e AUTO-PREENCHIMENTO).
37	Informações Clínicas do Agravo/Doença: Informar o(s) exame(s) laboratorial (s) solicitado(s) para o paciente (OBRIGATÓRIO) pelo profissional de saúde.
38	Data dos primeiros sintomas: data que surgiram os primeiros sintomas do paciente. No formato dd/mm/aaaa.
39	Idade Gestacional: paciente do sexo feminino, informar o período gestacional no momento da ocorrência do agravo/doença. O paciente do sexo masculino, informar a opção 6 – não se aplica.
40	Caso classificação: 1 – Suspeito (diagnóstico para definição de doença/agravo); 2 – Comunicante (paciente teve contato familiar, sexual com um caso); 3 – Acompanhamento (paciente em tratamento de doença/agravo); 4 – Controle (controle de tratamento de doença/agravo finalizado); 5 – Óbito (diagnóstico para esclarecimento de causa mortis); 6 – Caso grave (paciente em estado grave, internado ou não); 7 – Surto (esclarecimento de ocorrência de ocorrência de doença/agravo em área restrita); 8 – Diagnóstico (paciente para confirmação da doença/agravo) e 9 – Ignorado.
41	Tratamento: informar o tempo de tratamento do paciente de acordo com a data da solicitação do exame (s). Ex: 10 dias => deve ser informado na lacuna quantidade o número "10", e na segunda lacuna o item correspondente à opção "1", que significa dia.
42	Etapa de tratamento: etapa de tratamento do paciente de acordo com a data da solicitação do exame (s), podendo ser: 1 – Pré-tratamento (sem tratamento); 2 – Tratamento (sob medicação); 3 – Retratamento (iniciado novamente a tratamento ou troca de tratamento); 4 – Avaliação de resistência (paciente com resultados laboratoriais com resistência ao medicamento) e 9 – Ignorado.
43	O paciente tomou vacina? – O campo deve ser preenchido, após verificar no cartão de vacina, se o paciente vacinado contra o agravo/doença suspeito ou confirmado conforme solicitação de exame (s). 1 – Sim; 2 – Não e 9 – Ignorado.
44	Vacina: Especificar a vacina relacionada ao agravo/doença.
45	Data da última dose da vacina relacionada ao agravo/doença no formato dd/mm/aaaa.
46	Agravo/doença com o número de Notificação no Sistema Nacional de Agravos de Notificação.
47	CID 10 (Classificação Internacional de Doenças) informar o código correspondente agravo/doença do SINAN, de acordo com o campo 45 (OBRIGATÓRIO PARA CASOS NOTIFICADOS).
48	Número de Notificação do SINAN (07 dígitos): especificar o número de notificação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (OBRIGATÓRIO PARA CASOS NOTIFICADOS).
49	Data da Notificação: de acordo com ficha de notificação SINAN no formato dd/mm/aaaa. (OBRIGATÓRIO PARA CASOS NOTIFICADOS).
50	Unidade de Saúde Notificante: unidade que realizou a notificação do SINAN.
51	CNES (Cadastro Nacional dos Estabelecimentos de Saúde) informar o número. (OBRIGATÓRIO PARA CASOS NOTIFICADOS E DIFERENTES DA UNIDADE SOLICITANTE).
52	Município de Notificação: município que realizou a notificação do SINAN.
53	Código do IBGE (OBRIGATÓRIO PARA CASOS NOTIFICADOS E DIFERENTES DO MUNICÍPIO DE ATENDIMENTO).
54	Sigla da Unidade de Federação da Unidade de Saúde, que realizou a notificação no SINAN.
55	Material Biológico (amostra enviada). Informar o(s) tipo(s) de material (s) biológico(s) enviado(s) para o(s) exame(s) solicitado(s). (OBRIGATÓRIO).
56	Localização do material biológico, caso tenha sido especificado, da amostra foi coletada. Ex.: raspado da cabeça, nódulo na face...
57	Amostra: Informar o(s) número(s) da(s) amostra(s) coletada(s) para o paciente. 1ª – 1ª amostra; 2ª – 2ª amostra; ... ; Única (OBRIGATÓRIO).
58	Material Clínico: modo como a amostra foi enviada: 1 - IN – Amostra in Natura; 2 - IB – Isolado Bacteriano; 3 - LM – Límina; 4 - MTB – Meio de Transporte Bacteriano; 5 - MTV – Meio Transporte Viral; 6 - FF – Fixado em Formol; 7 - FA – Fixado em Álcool; 8 - FO – Fixado em Outros; 9 - BP – Bloco de Parafina e 10 - PF – Em Papel de Filtro.
59	Data da Coleta: data em que a(s) amostra(s) foi coletada(s). No formato dd/mm/aaaa. (OBRIGATÓRIO).
60	Hora da Coleta: informar a hora em que a(s) amostra(s) foi coletada(s). No formato hh:mm Ex: 12h 54min.
61, 62, 63	Uso medicamento na data da coleta: 1 – Sim; 2 – Não e 9 – Ignorado Caso a informação seja 1 - Sim. Especifique e insira a data de início do uso do medicamento.
64	Pesquisa (s) / Exame (s) Solicitado (s): conjunto de exame (s) e metodologia (s) relacionada (s) e associado (s) ao Número (s) da (s) Amostra (s) que foi (am) coletada (s).
65	Observações Gerais: informações que auxiliam no diagnóstico laboratorial.

Ficha de investigação Dengue - SINAN

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE INVESTIGAÇÃO DENGUE		Nº		
CASO SUSPEITO: Paciente com febre com duração máxima de 7 dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaléia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, prostração, exantema e com exposição à área com transmissão de dengue ou com presença de <i>Aedes aegypti</i> nos últimos quinze dias.						
Dados Gerais	1	Tipo de Notificação		2 - Individual		
	2	Agravado/doença		DENGUE		
	3	Código (CID10)	Data da Notificação			
	4	UF	5	Município de Notificação	Código (IBGE)	
Notificação Individual	6	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código		
	7	Data dos Primeiros Sintomas				
	8	Nome do Paciente		9	Data de Nascimento	
	10	(ou) Idade	1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano	11	Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	
Dados de Residência	12	Gestante		1 - 1º Trimestre 2 - 2º Trimestre 3 - 3º Trimestre 4 - Estado gestacional ignorado 5 - Não 6 - Não se aplica 9 - Ignorado		
	13	Raça/Cor		1 - Branca 2 - Preta 3 - Amarela 4 - Parda 5 - Indígena 9 - Ignorado		
	14	Escolaridade		0 - Analfabeto 1 - 1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2 - 4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3 - 5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4 - Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5 - Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6 - Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7 - Educação superior incompleta 8 - Educação superior completa 9 - Ignorado 10 - Não se aplica		
	15	Número do Cartão SUS		16	Nome da mãe	
Dados de Residência	17	UF	18	Município de Residência	Código (IBGE)	
	19	Distrito				
	20	Bairro		21	Logradouro (rua, avenida,...)	
	22	Número	23	Complemento (apto., casa, ...)	24	Geo campo 1
	25	Geo campo 2		26	Ponto de Referência	
	27	CEP				
	28	(DDD) Telefone	29	Zona	1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado	
	30	País (se residente fora do Brasil)				
Dados laboratoriais e conclusão (dengue clássico)						
Dados laboratoriais	31	Data da Investigação		32	Ocupação	
	33	Exame Sorológico (IgM)		34	Resultado	
	35	Isolamento Viral		36	Resultado	
	37	RT-PCR		38	Resultado	
Conclusão	39	Sorotipo		40	Resultado	
	41	Imunohistoquímica		42	Resultado	
	43	Critério de Confirmação/Descarte		44	Classificação Final	
	45	Local Provável de Infecção (no período de 15 dias)		46	País	
Conclusão	47	Município		48	Distrito	
	49	Bairro				
	50	Doença Relacionada ao Trabalho		51	Evolução do Caso	
	52	Data do Óbito		53	Data do Encerramento	

