



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**CÁSSIA RODRIGUES ROQUE**

**AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS NS1 E ANTICORPOS IGM EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE VÍSCERA *IN NATURA* DE PACIENTES QUE  
EVOLUÍRAM PARA ÓBITO COM SUSPEITA DE DENGUE**

**FORTALEZA**

**2017**

**CÁSSIA RODRIGUES ROQUE**

**AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS NS1 E ANTICORPOS IGM EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE VÍSCERA *IN NATURA* DE PACIENTES QUE  
EVOLUÍRAM PARA ÓBITO COM SUSPEITA DE DENGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças Infectoparasitárias.

**Orientador:** Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

**Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo

**FORTALEZA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- R69a Roque, Cássia Rodrigues.  
Avaliação da detecção de antígenos NS1 e anticorpos IgM em amostras biológicas de víscera in natura de pacientes que evoluíram para óbito com suspeita de dengue / Cássia Rodrigues Roque. – 2017.  
69 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti.  
Coorientação: Profa. Dra. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo.
1. Dengue. 2. Anticorpos. 3. Antígenos. 4. Imuno-Histoquímica. I. Título.

CDD 571.9

---

**CÁSSIA RODRIGUES ROQUE**

**AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS NS1 E ANTICORPOS IGM EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE VÍSCERAS *IN NATURA* DE PACIENTES QUE  
EVOLUÍRAM PARA ÓBITO POR SUSPEITA DE DENGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças Infecções parasitárias.

Aprovada em: 24/02/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Victor Emanuel Pessoa Martins  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Anne Caroline Bezerra Perdigão  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

---

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo  
Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE)

*A Deus, minha fortaleza.*

*A minha mãe, que em sua  
simplicidade me ensina que amar e perdoar  
são as chaves da felicidade.*

## AGRADECIMENTO

À Deus, por ter sido o meu sustento e me fazer conseguir chegar até aqui.

À minha família, - mãe, avós, tios, primos e agregados – por sempre me apoiarem e apostarem em todos os meus planos e sonhos.

Aos amigos, presentes que fui ganhando ao longo dos anos e que trazem leveza à minha vida.

À equipe do LACEN, por ter permitido a realização desse trabalho e proporcionado toda a estrutura necessária. À Dr<sup>a</sup>. Fernanda Montenegro, por ter acreditado no meu potencial e, com todo o carinho, inteligência e humildade, ter idealizado esse Projeto.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal, por todo aprendizado e auxílio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, por ter me possibilitado a realização do sonho de fazer o Mestrado. E à secretária do Programa, Valéria Cordeiro, por ser sempre tão prestativa e prontamente me ajudar nas mais diversas pendências acadêmicas.

Aos colegas da turma de Mestrado, pela convivência e troca de experiências.

Ao Prof. Dr. Luciano Pamplona, por toda a paciência e por me ter me dado a oportunidade de desbravar por uma área nova no campo da pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anne Carolinne Perdigão e ao Prof. Dr. Victor Pessoa por aceitarem participar da Banca de Defesa e assim contribuírem para a melhoria desse trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

*“Considero-me apenas um mero passarinho coberto de leve penugem, não sou uma águia, só tenho dela os olhos e o coração, pois apesar da minha extrema pequenez ousou fixar o Sol Divino, o Sol do Amor, e meu coração sente em si todas as aspirações da águia.”*

*Santa Teresinha do Menino Jesus*

## RESUMO

A dengue é causada por um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. A partir da introdução do DENV-2 no Ceará, em 1994, casos de infecção com evolução fatal começaram a ser reportados. O estudo desses casos é necessário para que se conheçam as causas que contribuem para o óbito e o diagnóstico da dengue *pos-mortem* pode contribuir. O objetivo do trabalho foi avaliar a detecção de antígeno NS1 e de anticorpos IgM para diagnóstico de dengue em amostras biológicas de vísceras *in natura*, coletadas de pacientes que evoluíram para óbito. Foram incluídos 109 pacientes, dos anos de 2013 e 2014, cujas amostras foram encaminhadas ao LACEN/CE para realização de exames laboratoriais para confirmação de óbito por suspeita de dengue e que apresentaram pelo menos um resultado positivo ou reagente em amostras de vísceras em formol, sangue (soro) e/ou líquido nos exames: ELISA IgM, ELISA NS1, RT-PCR, e Imunohistoquímica. A média de idade dos pacientes foi de  $33,46 \pm 21,18$  (5 dias a 95 anos). O ELISA IgM no sangue apresentou uma positividade de 21,1%; no líquido apresentou uma positividade de 22,0%; nas vísceras apresentou uma positividade de 16,5%. Das amostras de IgM positivo em vísceras, 75,0% foram também IgM positivo no líquido e 78,3% das amostras de IgM positivo em vísceras foram também IgM positivo no sangue. Houve mais amostras de NS1 positivo no sangue do que no líquido e vísceras. As amostras onde houve maior positividade de anticorpos IgM foram líquido e sangue, entretanto a detecção de anticorpo IgM também foi possível em amostras de vísceras *in natura*. A técnica de imunohistoquímica, em material de vísceras conservadas em formol, apresentou uma maior positividade para a detecção de antígenos de dengue, mas também foi possível detectar antígeno NS1 em amostras de vísceras *in natura*. A detecção de anticorpo IgM e de antígeno NS1 nas amostras de vísceras *in natura* contribuiu para melhorar o diagnóstico de dengue *post-mortem*, devendo ser considerada como mais uma abordagem no diagnóstico de casos fatais de dengue.

**Palavras-chave:** Dengue. Anticorpos. Antígenos. Imuno-Histoquímica.



## ABSTRACT

Dengue is caused by an arbovirus of the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*. Cases of infection with fatal evolution began to be reported from the introduction of DENV-2 in the state of Ceará in 1994. The study of these cases is necessary to know the causes that contribute to the death and the post-mortem diagnosis of dengue can contribute. The objective of the work was to evaluate the detection of NS1 antigen and IgM antibodies for the diagnosis of dengue in biological samples of fresh viscera collected from patients who died. A total of 109 patients were included from 2013 and 2014 whose samples were sent to LACEN/CE to perform laboratory tests to confirm death due to suspected dengue and they had at least one positive result or reagent in samples of viscera in formaldehyde, blood (serum) and/or CSF in the exams IgM ELISA, NS1 ELISA, RT-PCR, and Immunohistochemistry. The mean age of the patients was  $33.46 \pm 21.18$  (5 days to 95 years old). The IgM ELISA in the blood showed a positivity of 21.1%; in the CSF showed a positivity of 22.0%; in the viscera showed a positivity of 16.5%. Of the positive IgM samples in viscera, 75.0% were also CSF positive IgM, and 78.3% of positive IgM samples in viscera were also positive IgM in the blood. There were more NS1 positive samples in the blood than in the CSF and in viscera. CSF and blood were the samples with the highest positivity of IgM antibodies. However, IgM antibody detection was also possible in samples of fresh viscera. The immunohistochemistry technique in preserved formalin material showed a higher positivity for the detection of dengue antigens, but it was also possible to detect NS1 antigen in fresh viscera samples. The detection of IgM antibody and NS1 antigen in the fresh viscera samples helped to improve the post-mortem diagnosis of dengue and it should be considered as another approach in the diagnosis of fatal dengue.

**Keywords:** Dengue. Antibodies. Antigens. Immunohistochemistry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do Vírus da Dengue .....	16
Figura 2 - Vetor do Vírus da Dengue .....	17
Figura 3 - Casos prováveis de dengue por semana epidemiológica de início de sintomas.....	19
Figura 4 - Série histórica dos casos confirmados de dengue e incidência.....	21
Figura 5 - Fluxograma com o processo de seleção das amostras do estudo.....	29
Gráfico 1 - Comparação de 109 casos fatais de dengue em amostras de líquido, sangue e vísceras na metodologia de detecção de anticorpo IgM e de antígeno NS1 por ELISA.....	35

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 -	Compilado da confirmação laboratorial de acordo com os espécimes e as metodologias em casos de óbitos por dengue em líquido e em sangue.....	36
Tabela 1 -	Manifestações clínicas relatadas pelos 109 pacientes incluídos no estudo.....	40
Tabela 2 -	Resultados de 109 casos fatais de dengue de acordo com espécime clínica analisada e metodologia.....	42
Tabela 3 -	Comparação dos resultados de IgM em 26 amostras de vísceras, líquido e sangue de pacientes com dengue e evolução fatal nos anos de 2013-2014, no Ceará.....	43
Tabela 4 -	Comparação da detecção do antígeno NS1 em 13 casos fatais de dengue em amostras de vísceras, líquido e sangue.....	44
Tabela 5 -	Sensibilidade e especificidade de detecção de IgM nas vísceras.....	45
Tabela 6 -	Sensibilidade e especificidade de detecção de NS1 nas vísceras.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
AgNS1	Antígeno da Proteína Não Estrutural 1
DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Vírus Dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus Dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus Dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus Dengue sorotipo 4
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FHD	Febre hemorrágica do dengue
IEC	Instituto Evandro Chagas
IHQ	Imunohistoquímica
LACEN-CE	Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará
NS1	Proteína Não Estrutural 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa
SESA-CE	Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
SVO-RF	Serviço de Verificação de Óbitos Dr. Rocha Furtado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Histórico da Dengue</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Vírus</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Vetor</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4</b>	<b>Dengue no Brasil</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Dengue no Ceará</b> .....	<b>19</b>
<b>1.6</b>	<b>Diagnóstico Laboratorial</b> .....	<b>21</b>
<b>1.7</b>	<b>Óbitos por Dengue</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>TIPO DE ESTUDO</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>POPULAÇÃO DE ESTUDO</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>AMOSTRA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.5</b>	<b>CRITÉRIOS DE INCLUSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>4.6</b>	<b>CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>4.7</b>	<b>ANÁLISE DE DADOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.8</b>	<b>TÉCNICAS LABORATORIAIS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Tratamento dos tecidos</b> .....	<b>30</b>
<b>4.8.2</b>	<b>ELISA Dengue IgM</b> .....	<b>30</b>
<b>4.8.3</b>	<b>ELISA Dengue NS1</b> .....	<b>31</b>
<b>4.8.4</b>	<b>Imunohistoquímica</b> .....	<b>32</b>
<b>4.8.5</b>	<b>RT-PCR</b> .....	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>
	<b>APÊNDICES E ANEXOS</b> .....	<b>62</b>

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Histórico da Dengue

O mais antigo registro encontrado que menciona uma doença possivelmente compatível com a dengue é oriundo de uma Enciclopédia chinesa publicada entre os anos de 255 - 420 d.C. A doença foi chamada de veneno da água pelos chineses que acreditavam que a sua transmissão estava conectada a mosquitos e associada com água. Já os primeiros relatos de epidemias sugestivas de dengue ocorreram em três continentes – Ásia, África e América do Norte – durante os anos de 1779 e 1780 (GUBLER, 1998). A expansão geográfica da epidemia de dengue na década de 1980 envolveu as Américas do Norte, Central e do Sul (MONATH, 1994).

Evidências mostram que o ciclo de transmissão da dengue surgiu de um ancestral do vírus que emergiu acerca de 1000 anos e que originalmente causava infecções em primatas não humanos que habitavam florestas tropicais da África e da Ásia e que culminou em transmissões cruzadas entre espécies até acometer seres humanos (GLUBER, 1998; HOLMES, 2003; MESSINA *et al.*, 2014). A propagação da doença foi lenta, geralmente por navios que transportavam populações reprodutoras de *Aedes aegypti* e hospedeiros humanos susceptíveis. Em muitas áreas, a dengue foi reconhecida apenas entre os colonos estrangeiros ou nas forças militares coloniais e a doença escapou à atenção das populações indígenas sobre pobre vigilância médica (MONATH, 1994).

Clinicamente, a dengue tem sido reconhecida por mais de 200 anos e uma doença parecida foi descrita pela primeira vez no norte da Austrália, no final do século XIX. Apesar de várias epidemias ou pandemias de dengue terem sido descritas em séculos anteriores e na primeira metade do século XX, um notável aumento da incidência da doença foi observado desde os anos 1950. A principal preocupação foi o aparecimento de uma epidemia de dengue hemorrágica nas Filipinas, em 1954, que rapidamente se espalhou para a Tailândia, Vietnã, Indonésia e outros países da Ásia e do Pacífico, tornando-se endêmica e epidêmica em vários deles. A primeira epidemia de dengue hemorrágica nas Américas ocorreu em Cuba em 1981. Posteriormente, outros 24 países da Região relataram casos de dengue (PINHEIRO; CORBER, 1997; GUZMAN; KOURI, 2003).

O primeiro sorotipo do vírus da dengue (DENV) foi isolado no ano de 1943 no Japão e foi chamado de dengue 1 (DENV-1), sendo sucedido pelo isolamento do DENV-2 em 1945 no Havaí. DENV-3 e DENV-4 foram relatados pela primeira vez em 1953 nas Filipinas e na Tailândia. Com o fenômeno global da urbanização e as viagens internacionais houve a facilitação da propagação dos sorotipos do vírus da dengue (MESSINA *et al.*, 2014).

A maioria das evidências sobre a doença em seres humanos antes do século XX vem de descrições anedóticas e teve que esperar a virada do século para que houvesse sua identificação adequada por meio de exames sorológicos. No entanto, descrições de doenças com características da dengue datam por volta de 1779 e desde então o vírus se tornou um agente cosmopolita, causando epidemias quase simultâneas em locais tão distantes como na Filadélfia, em Jacarta, na Baviera e no Cairo e a dispersão da população de vírus provavelmente foi reforçada pela expansão dos focos de reprodução de mosquitos, o movimento em massa de populações humanas não imunes em áreas infestadas com mosquitos e o aumento da urbanização e da miséria que se seguiram. O transporte de massa eficiente e rápido favoreceu a introdução e co-circulação dos sorotipos ao redor do mundo, seguido por um aumento nos casos (ZANOTTO, *et al.*, 1996).

Mudanças ecológicas resultante dos conflitos durante e após a Segunda Guerra Mundial no Sudeste Asiático e no Pacífico criaram condições ideais para o aumento da transmissão de arboviroses e esse foi o cenário para que uma pandemia global de dengue começasse. Durante esse período foram notificados os primeiros surtos de dengue hemorrágica no Sudeste Asiático e ela tornou-se endêmica a esta região, sendo uma das principais causas de hospitalização e morte entre as crianças. A primeira epidemia que se tem conhecimento de dengue hemorrágica ocorreu em Manila, nas Filipinas, entre 1953 e 1954 e após 20 anos a doença em sua forma epidêmica se espalhou por todo o Sudeste Asiático. Nos anos 1950, 1960 e mais ainda em 1970 a epidemia de dengue foi rara no Continente Americano porque o principal mosquito vetor, o *Aedes aegypti*, havia sido erradicado da maior parte das Américas Central e Sul. O programa de erradicação foi descontinuado no início dos anos de 1970 e logo após essas espécies iniciaram a reinvasão nos países em que haviam sido erradicados (GUBLER, 1998). O colapso do programa de erradicação do *Aedes aegypti* nas Américas na década de 70 foi uma marca importante no início do transporte dos vírus da dengue da Ásia para as Américas, seguido pela rápida reintrodução do principal mosquito vetor entre ambos os continentes (MESSINA *et al.*, 2014; ZANOTTO, *et al.*, 1996).

## 1.2 O Vírus

O DENV é um arbovírus membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, do qual também fazem parte importantes patógenos humanos como os causadores da febre amarela, da encefalite japonesa, do Nilo Ocidental e o Zika Vírus, e tem um impacto considerável sobre a saúde global devido ao seu potencial para o surgimento rápido e morbidade (GUBLER, 1998; MESSINA *et al.*, 2014; MUKHERJEE, *et al.*, 2016; PINTO JUNIOR, *et al.*, 2015).

Os flavivírus são relativamente pequenos (possuem de 40 a 50  $\mu\text{m}$ ) e seu genoma composto de ácido ribonucléico (RNA) de cadeia simples e polaridade positiva possui aproximadamente 11.000 pares de bases. Eles são esféricos, envelopados e contêm três proteínas estruturais (capsídeo, envelope e membrana) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), conforme demonstrado na figura 1 (GUBLER, 1998; ANGEL; VALLE, 2013; PINTO JUNIOR, 2015).

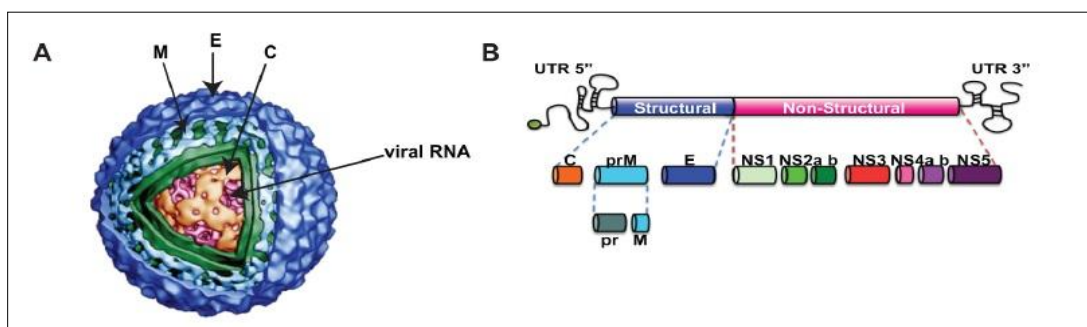
As proteínas estruturais do capsídeo (C), da membrana (M) e do envelope (E) são componentes extracelulares de partículas virais maduras e as proteínas não estruturais (NS) são expressas na célula hospedeira infectada, mas não são detectáveis nas formas infectivas dos vírus. Essas proteínas estão envolvidas na replicação do genoma DENV, que ocorre em estreita associação com membranas celulares (WELSCH *et al.*, 2009). A proteína NS1 é uma glicoproteína altamente conservada. O mecanismo pelo qual se associa com as membranas celulares é desconhecido. A imunização com NS1 ou a transferência passiva de anticorpos específicos de NS1 pode conferir imunidade protetora contra a infecção por flavivírus. Com base nessas propriedades, foi proposto que o NS1 pode desempenhar um papel na montagem e/ou na maturação viral. No entanto, estudos de imunolocalização com o NS1 do DENV-2, bem como a análise de mutações na glicosilação do NS1 do vírus da febre amarela sugerem o possível envolvimento de NS1 na replicação do RNA viral (MUYLAERT; GALLER; RICE, 1997). Não se sabe muito sobre as funções das proteínas não estruturais NS2a, NS4a e NS4b. Sugeriu-se que elas contribuem para a inibição da resposta dos interferons  $-\alpha / \beta$ . Além disso, NS2a pode ter como alvo o complexo de replicação viral para organelas da membrana e NS4b pode modular a replicação viral através de uma interação com NS3 (MILLER, 2007). NS3 e seu co-factor, NS2b, estão envolvidos no processamento da poliproteína viral. O NS3 também tem atividade de helicase de RNA e de trifosfatase de nucleotídeos. Já o NS5 tem



atividade de RNA polimerase dependente de RNA e está envolvido no nivelamento das progênies virais do genoma de RNA (WELSCH *et al.*, 2009).

Todos os flavivírus têm em comum grupo de epítomos na proteína do envelope que resulta em extensivas reações cruzadas nos testes sorológicos. Isso traz dificuldade para o diagnóstico sorológico das flaviviroses (GUBLER, 1998).

Há quatro tipos de vírus da dengue, chamados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que são geneticamente divergentes e são tradicionalmente classificados como sorotipos (GUBLER, 1998; KATZELNICK *et al.*, 2015). Apesar da infecção com um tipo do vírus conferir imunidade em longo prazo isso é somente para um tipo e não para os outros três. Além disso, uma infecção secundária pelo vírus da dengue pode aumentar a probabilidade de o paciente desenvolver um quadro grave da doença (MESSINA *et al.*, 2014).



**Figura 1. Estrutura do vírus da dengue.** A. O vírus da dengue é envolvido por três proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope (E) e membrana (M). B. Proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da dengue (Adaptado de ANGEL; VALLE, 2013).

### 1.3 O Vetor

Os vírus endêmicos/epidêmicos da dengue são transmitidos para os humanos através dos mosquitos *Aedes aegypti* (Figura 2) e *Aedes albopictus*. Uma das hipóteses aceitas para o início do seu envolvimento como vetores é a de que cepas silvestres do DENV foram transmitidas através de primatas não humanos do Oeste da África e da Malásia para outros mosquitos (WANG *et al.*, 2000).

Os vários sorotipos do vírus da dengue são transmitidos para os humanos através da picada de mosquitos *Aedes* infectados, principalmente *Aedes aegypti*. Esses mosquitos são de espécies tropicais e subtropicais amplamente distribuídas ao redor do mundo, principalmente entre latitudes 35°N e 35°S. Por causa das temperaturas mais baixas *Aedes aegypti* é relativamente incomum acima de 1000 metros. Os estágios imaturos são encontrados em habitat cheios de água, principalmente em recipientes artificiais intimamente associados com habitações humanas e muitas vezes dentro de casa. Surtos de dengue também têm sido atribuídos ao *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e várias espécies do complexo *Aedes scutellaris*. Cada uma destas espécies tem uma ecologia, comportamento e distribuição geográfica particular. Nas últimas décadas o *Aedes albopictus* se espalhou da Ásia para a África, as Américas e a Europa, nomeadamente ajudado pelo comércio internacional de pneus usados em que os ovos são depositados quando eles contêm água da chuva. Os ovos podem permanecer viáveis durante muitos meses, na ausência de água (WHO, 2009).

As epidemias de doenças transmitidas por mosquitos parecem tornar-se mais frequentes e diversificadas, e é provável que o cenário observado atualmente irá continuar por vários anos. São necessárias medidas melhoradas de vigilância e resposta para limitar a propagação a outras partes do mundo. As medidas de controle para a dengue são as mesmas recomendadas para zika e chikungunya, baseadas em educação em saúde e controle do vetor, já que as três doenças são transmitidas através de picadas de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes* (ROTH *et al.*, 2014; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015).



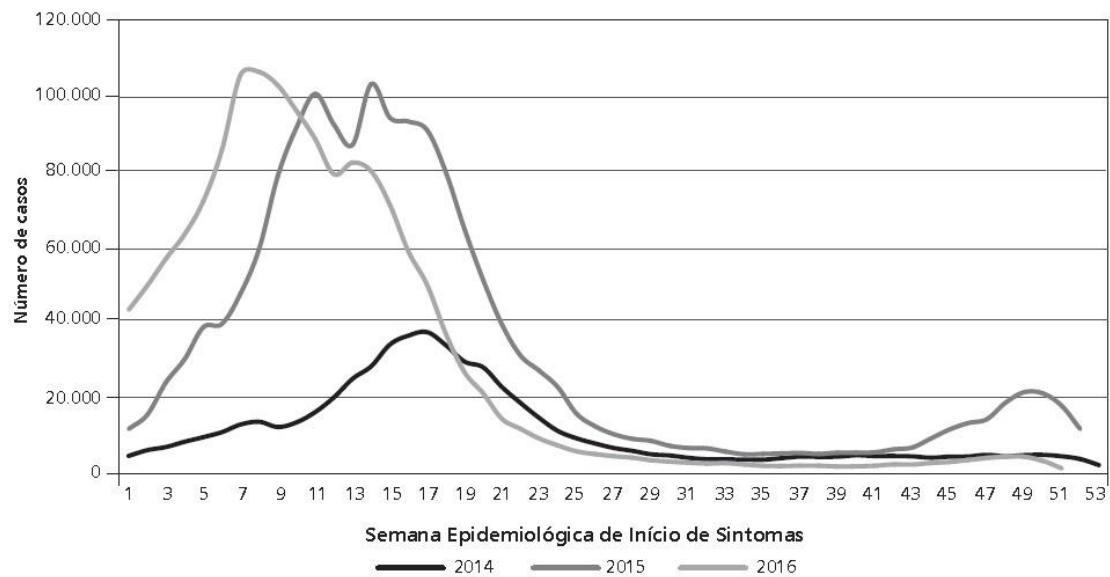
**Figura 2. Vetor do vírus da dengue.** Mosquito do gênero *Aedes aegypti* (Adaptado de ANGEL; VALLE, 2013).

## 1.4 Dengue no Brasil

O alto nível de atividade do vírus da dengue no continente americano e a reinfestação do Brasil pelo vetor *Aedes aegypti* em 1977 contribuiu para a reintrodução dos vírus da dengue no Brasil na década de 1980. Desde então, mais de 60% dos casos notificados de dengue no Continente Americano ocorreram no Brasil (NOGUEIRA; ARAUJO; SCHATZMAYR, 2007).

No Brasil, a circulação dos vírus dengue foi comprovada laboratorialmente em 1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (RR) ficando o país sem notificação de casos por quatro anos. Em 1986, foi isolado o DENV-1 no Estado do Rio de Janeiro causando epidemia e dispersão desse sorotipo para diversas regiões do Brasil. Em seguida, com a introdução do DENV-2, também no Estado do Rio de Janeiro, confirmou-se o primeiro caso de dengue hemorrágico por esse sorotipo, com o aparecimento de formas graves também em outras regiões. Em janeiro de 2001, foi isolado o DENV-3 no município de Nova Iguaçu (RJ). Em 2010, o DENV-4 foi isolado a partir de casos detectados no estado de Roraima e no Amazonas. Em janeiro de 2011, foi isolado no Pará e, em março do mesmo ano, os primeiros casos de DENV-4 no Rio de Janeiro foram confirmados pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ, 2014).

Em 2015, foram registrados 1.677.013 casos prováveis de dengue no país – casos notificados, incluindo todas as classificações, exceto descartados. Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (1.026.226 casos; 62,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro-Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%). Quando analisada a distribuição mensal no país, observa-se que o pico da incidência ocorreu no mês de abril (229,7 casos/100 mil hab.), seguido de uma redução no mês de maio (116,1 casos/100 mil hab.), tendência que é observada nos meses subsequentes até outubro; a partir de novembro, a incidência começa a apresentar leve tendência de aumento. Em 2014, foram registrados 583.221 casos e em 2016, até a semana epidemiológica 51 (de 3/1/2016 à 24/12/2016), foram registrados 1.496.282 casos prováveis de dengue no país (Figura 3) (BRASIL, 2016, 2017).



**Figura 3. Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas. Brasil, 2014, 2015 e 2016 (BRASIL, 2017).**

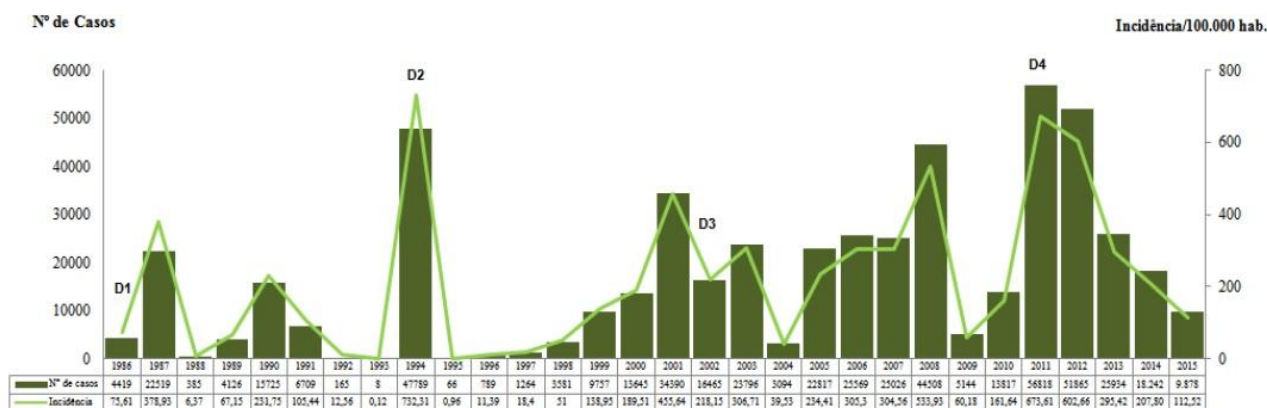
### 1.5 Dengue no Ceará

O Ceará é um dos estados mais importantes em termos de número de casos notificados de dengue no Brasil. Reintroduzido no Ceará durante meados dos anos 80, nas cidades de Aquiraz, Beberibe e Fortaleza, o *Aedes aegypti* encontrou condições adequadas para começar a sua dispersão. Desde 1986 há relatos de surtos extensos e pequenos ou casos esporádicos de dengue no estado. A primeira epidemia no Ceará começou em agosto de 1986, com um pico reportado em abril do ano seguinte, e continuou até novembro de 1987, com 26.938 casos com confirmação laboratorial. No ano seguinte, a doença continuou a se espalhar, com novos casos sendo relatados durante os últimos meses de 1988 até setembro de 1989, quando um novo surto começou. De 1983 a 1993, apenas o sorotipo 1 do vírus da dengue havia sido isolado no Ceará e nenhuma fatalidade notificada. Durante os anos de 1990 e 1991, o estado relatou um total de 22.434 casos, e entre outubro de 1992 e fevereiro de 1994 apenas 16 casos da doença foram relatados (CAVALCANTI *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 1998; VASCONCELOS *et al.*, 1995).

Os primeiros casos de dengue na epidemia de 1994 foram relatados em Fortaleza, que tinha condições de ambiente apropriadas para a alta atividade da doença. A interrupção das medidas de controle de vetores em 1993 resultou em índice de *Aedes aegypti* nos domicílios superior a 20% na capital. O início da estação das chuvas juntamente com temperaturas em torno de 28°C contribuiu para a epidemia explosiva que rapidamente se alastrou para o nordeste do estado. Nesse ano, o Ceará foi responsável por 84% dos casos de dengue no Brasil, notificando um total de 47.889 casos. Em março de 1994 a transmissão da dengue aumentou significativamente e em abril o Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará (LACEN-CE) confirmou infecção por dengue em 38% dos casos testados por MAC-ELISA. No mês seguinte, o vírus DENV-2 foi isolado pelo Laboratório de Flavivírus, do Instituto Oswaldo Cruz. DENV-1 também foi isolado no Ceará durante 1994 mostrando a co-circulação de ambos os sorotipos no estado. Na epidemia de 1994 os primeiros casos de dengue hemorrágica foram notificados e relacionados com a circulação do sorotipo DENV-2, que havia sido detectado pela primeira vez no estado, com a maioria dos casos ocorrendo em Fortaleza. De 1986 a 1996, o estado registrou um total de 102.010 casos como resultado dos três epidemias que ocorreram em intervalos de dois anos cada (CAVALCANTI *et al.*, 2010; CEARÁ, 2015; CUNHA *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 1995).

O sorotipo DENV-3 foi isolado no ano de 2002. Em 2003, uma grave epidemia de DENV-3 ocorreu e a incidência de casos hemorrágicos foi alta entre os adultos. No entanto, da partir de 2007, a incidência de infecção por DENV passou a ser maior entre as crianças (CAVALCANTI *et al.*, 2011; CEARÁ, 2015).

Em 2011, foi isolado o sorotipo DENV-4. Nesses últimos 29 anos o dengue se manifestou de forma endêmica no Ceará, com o registro de, pelo menos, seis epidemias nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011 e 2012. Destacam-se as epidemias de 1994, pela confirmação dos primeiros casos hemorrágicos, a de 2008, pelo maior número de casos graves, e a do ano de 2011 pelo maior número de casos clássicos confirmados. Nos últimos doze anos, foram registrados casos da doença em todos os meses do ano, sempre com um predomínio no primeiro semestre, devido a fatores como o aumento da pluviosidade, temperatura e umidade (Figura 4) (CEARÁ, 2015).



**Figura 4. Série histórica dos casos confirmados de dengue e incidência, Ceará, 1986 à 2015 (Informe Semanal Dengue, 15/05/2015 - CEARÁ, 2015).**

## 1.6 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico definitivo da infecção pelo DENV só pode ser feita em laboratório, e depende do isolamento destes vírus, da detecção de antígenos virais ou RNA no soro ou tecidos, ou a detecção de anticorpos específicos em amostras biológicas de pacientes (WHO, 1998).

Os testes sorológicos que tem sido utilizado para o diagnóstico de infecção por dengue são: inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (TN) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos IgM, IgG e detecção de antígeno NS1. As limitações dessas técnicas são a elevada reatividade cruzada observada com estes testes, requerendo um abrangente *pool* de antígenos, incluindo todos os quatro sorotipos, outros flavivírus (vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite de St. Louis), e em algumas áreas, outro vírus que provoca manifestações clínicas semelhantes, mas que não são flavivírus, como Oropouche, Mayaro ou vírus Chikungunya. Além disso, os anticorpos de dengue são mais bem detectados por volta do quinto dia do início da doença, tornando esta técnica inviável para diagnóstico rápido (GUZMAN; KOURI, 1996).

Quatro métodos de isolamento viral que tem sido rotineiramente utilizado para os vírus da dengue: a inoculação intracerebral de camundongos recém-nascidos, a inoculação em culturas de células de mamíferos, a inoculação intratorácica de mosquitos adultos e, mais

comumente, a inoculação em culturas de células de mosquito (método de confirmação por imunofluorescência indireta) (GUZMAN; KOURI, 1996).

Nos últimos anos, várias novas técnicas de diagnóstico têm sido desenvolvidas e tem-se mostrado úteis no diagnóstico da dengue. Estes métodos podem assumir um papel importante no diagnóstico de dengue, uma vez que eles são capazes de detectar facilmente os vírus de dengue, durante a fase aguda da doença, e, por vezes, durante a fase de convalescença. Esses vários métodos incluem: a hibridação de ácidos nucleicos e a reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) (IGARASHI, 1978; DEUBEL *et al.*, 1990).

Um grande problema para o diagnóstico da dengue tem sido a confirmação etiológica dos casos fatais. Muitas vezes, apenas uma única amostra de soro é obtida, e o teste sorológico é de valor limitado nestas situações. Nestes casos, surgiu a possibilidade de detectar antígenos em uma grande variedade de amostras fixas com os novos métodos de imunohistoquímica (HALL *et al.*, 1991).

Como as infecções por dengue podem se apresentar como uma doença grave, caracterizada por hemorragia e choque, é importante fazer um diagnóstico rápido e, se possível, identificar o sorotipo envolvido nas infecções. O diagnóstico correto e identificação do sorotipo assumem uma importância maior para a forma grave da doença, já que não há marcador que prevê a progressão da dengue clássica às formas graves da doença. A OMS reconhece este fato e incentiva a pesquisa sobre o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico da dengue (DE PAULA; FONSECA, 2004).

Os testes laboratoriais para o diagnóstico de infecções por dengue abrangem o isolamento do vírus, a detecção do RNA ou do antígeno viral e os testes sorológicos de anticorpos anti-dengue específicos (ZHANG *et al.*, 2015). O isolamento do vírus da dengue por cultura de células fornece uma abordagem direta, específica e conclusiva para o diagnóstico, no entanto, habilidades técnicas, mão-de-obra e tempo significativo são necessários para isolar e sorotipar o vírus (TELES; PRAZERES; LIMA-FILHO, 2005). As técnicas moleculares baseadas na reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), proporcionam um diagnóstico rápido, discriminam o sorotipo, mais sensível e reprodutível para a dengue, mas podem sofrer com contaminação fácil da amostra e exigem tecnologias elevadas (PATEL *et al.*, 2013). Os ensaios baseados em antígenos, em particular a detecção da proteína NS1 da dengue, provaram ser um meio útil para o

diagnóstico de infecções agudas de dengue, mas os kits comerciais de detecção de antígenos NS1 não diferenciam entre os sorotipos do vírus da dengue (SHU; HUANG, 2004; GUZMAN *et al.*, 2010). Os ensaios sorológicos são mais comumente utilizados para inferir a infecção pelo vírus da dengue, uma vez que são relativamente baratos, simples e fáceis de executar. O formato de ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgM é mais amplamente utilizado para detectar IgM específica de dengue em laboratórios de diagnóstico e kits comerciais (HUNSPERGER *et al.*, 2009).

Testes diagnósticos para dengue precisam ser específicos, de baixo custo e podem ser usados para o manejo clínico, vigilância e investigação de surtos, e, devem permitir uma intervenção na fase inicial da infecção para tratar pacientes ou controlar epidemias. Novas técnicas para a detecção inicial de casos graves da doença como com o uso de biomarcadores tem o potencial para diminuir a morbidade e a mortalidade. O desenvolvimento de recentes tecnologias de detecção rápida oferece a promessa de diagnóstico e melhoram o manejo e de detecção inicial de surtos de dengue (PEELING, 2010).

## 2.7 Óbitos por Dengue

Embora a patogênese e fisiopatologia das infecções por dengue grave ainda sejam incompreendidas, possíveis fatores que contribuem para o aumento da gravidade da doença tem sido descritas (ONG, 2006). Idade, sexo, raça, co-morbidades pré-existentes, e as características virais específicas foram adotados para desempenhar um papel na evolução das doenças por vários autores (KOURI *et al.*, 1989; WHITE, 1999; GUZMAN *et al.*, 2002). Vaughn *et al.* (2000) mostraram anteriormente que se correlaciona com a gravidade da doença títulos elevados de viremia de dengue e infecções secundárias.

Várias limitações para a aplicabilidade prática dos critérios de classificação dos casos de dengue são observadas, particularmente na avaliação de casos graves. Muitos pacientes que desenvolviam um quadro clínico grave e não satisfaziam os critérios de febre hemorrágica do dengue eram, em última análise, classificados como dengue clássica. Em 2008, a OMS propôs um novo sistema de classificação, baseado em um estudo multicêntrico em países asiáticos e latino-americanos, que forneceu uma lista de sinais clínicos sugestivos de um resultado de doença grave (sinais de alerta). Este sistema classifica os casos de dengue



em: dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave (NARVAEZ *et al.*, 2011; BARNIOL *et al.*, 2011; WHO, 2009).

A classificação revista da OMS é mais eficaz do que a tradicional para a identificação de casos graves de dengue e, conseqüentemente, os óbitos por dengue. A classificação atual apresenta maior aplicabilidade prática em países em desenvolvimento como o Brasil, porque é menos dependente de exames complementares. A capacidade de apreciar e reconhecer os sinais de aviso da classificação revista é essencial para que os clínicos possam identificar pacientes em risco de desenvolver doença grave e para determinar um curso de ação apropriado em uma base por caso (LIMA *et al.*, 2013).

No Ceará, o SVO-RF realiza autópsias em casos de morte natural sem assistência médica e causas mal definidas que são encaminhados por serviços de saúde. Em muitas das mortes relatadas sem suspeita clínica de dengue, sinais, sintomas e achados morfológicos estavam presentes o que levou os patologistas a suspeitar de óbito por dengue. As autópsias são realizadas após autorização da família em 35% dos casos relatados ao serviço (CAVALCANTI *et al.*, 2016).

A detecção do antígeno NS1 em amostras de líquido cefalorraquidiano obtidas durante autópsia comprova o envolvimento do Sistema Nervoso Central em pacientes que evoluíram à óbito por dengue. O DENV é raramente reportado como um agente causal de meningite, mas alguns casos tem sido descritos na literatura. Manifestações neurológicas em pacientes com DENV tem sido reportados no Ceará e estudos baseados no diagnóstico laboratorial indicaram a relação entre dengue e manifestações no Sistema Nervoso Central e que há um alto risco de morte entre pacientes com meningite/meningoencefalite por dengue (ARAÚJO *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

Há casos de dengue notificados no Ceará desde 1986, quando foi isolado o primeiro sorotipo. Desde então, o vírus da dengue tem se manifestado de forma endêmica no nosso estado, com o registro de, pelo menos, seis epidemias nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011 e 2012. A circulação simultânea de vários sorotipos aumentou o risco da ocorrência de casos graves de dengue nos municípios infestados pelo *Aedes aegypti*.

A avaliação e comparação do desempenho dos vários testes para diagnóstico da dengue com diversos tipos de amostras biológicas é fundamental para sua implementação nos diversos cenários: clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Existem muitos testes disponíveis no mercado e que podem ser realizados em diferentes materiais de pacientes. Faz-se necessário a realização desse estudo para avaliar o desempenho de determinados testes em amostras biológicas de vísceras *in natura* de pacientes que foram a óbito por suspeita de dengue.

O papel de alguns testes para diagnóstico de dengue em determinados espécimes, como tecidos de casos fatais, ainda não têm sido completamente demonstrado. Esses instrumentos são essenciais na confirmação da causa da morte do paciente e há poucos estudos no Brasil que avaliem esse desempenho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a capacidade de detecção de antígeno NS1 e de anticorpos IgM em amostras biológicas de vísceras *in natura* coletadas de pacientes com dengue que evoluíram para óbito.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se um teste utilizado para a pesquisa de anticorpo IgM para o vírus da dengue em amostra de soro é capaz de detectar este anticorpo em amostras de vísceras *in natura* .
- Avaliar se um teste utilizado para a pesquisa de antígeno NS1 para o vírus da dengue em amostra de soro é capaz de detectar este antígeno em amostras de vísceras *in natura*.
- Comparar a detecção de anticorpos IgM em amostras de sangue e líquido de casos fatais com a detecção de anticorpos IgM em amostras de vísceras *in natura*.
- Comparar a detecção de antígeno NS1 em amostras de sangue e líquido de casos fatais com a detecção de antígenos NS1 em amostras de vísceras *in natura*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo foi realizado perante aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer de nº 1.086.121 e CAAE com nº 44635915.1.0000.5054, e seguiu as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos estabelecidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS (BRASIL, 2012).

### **4.2. TIPO DE ESTUDO**

Trata-se de um estudo descritivo e transversal.

### **4.3. POPULAÇÃO DO ESTUDO**

Pacientes que evoluíram a óbito por suspeita de dengue, encaminhados ao Serviço de Verificação de Óbito Dr. Rocha Furtado, do Ceará (SVO-RF), que tiveram amostras biológicas (sangue, líquido, e peças de autópsia, como fragmentos de baço, cérebro, coração, fígado e pulmão) coletadas durante a necropsia e encaminhadas ao LACEN-CE para esclarecimento diagnóstico, nos anos de 2013 e 2014.

Foram excluídos os pacientes cujas amostras biológicas não foram suficientes para a realização de todos os testes.

### **4.4. AMOSTRA**

Inicialmente foram analisadas as fichas dos pacientes que evoluíram para óbito e que tiveram suas amostras biológicas enviadas ao LACEN/CE, pelo SVO-RF.

Posteriormente, foram selecionados aqueles pacientes que apresentaram pelo menos um resultado positivo ou reagente para dengue em algum dos testes laboratoriais realizados no LACEN/CE (ELISA IgM e ELISA NS1) e no Instituto Evandro Chagas, no

Pará, para onde são enviados amostras de vísceras para realização de exame de imunohistoquímica.

Após a seleção dos pacientes que fariam parte do estudo suas amostras (sangue, líquido, e peças de autópsia, como fragmentos de baço, cérebro, coração, fígado e pulmão) foram utilizadas para que fossem realizados exames laboratoriais para a detecção de anticorpo IgM e antígeno NS1, pelo método de ELISA, para se avaliar a sensibilidade diagnóstica desses testes nas amostras biológicas de vísceras *in natura*, ou seja, buscar os verdadeiro-positivos.

#### **4.5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

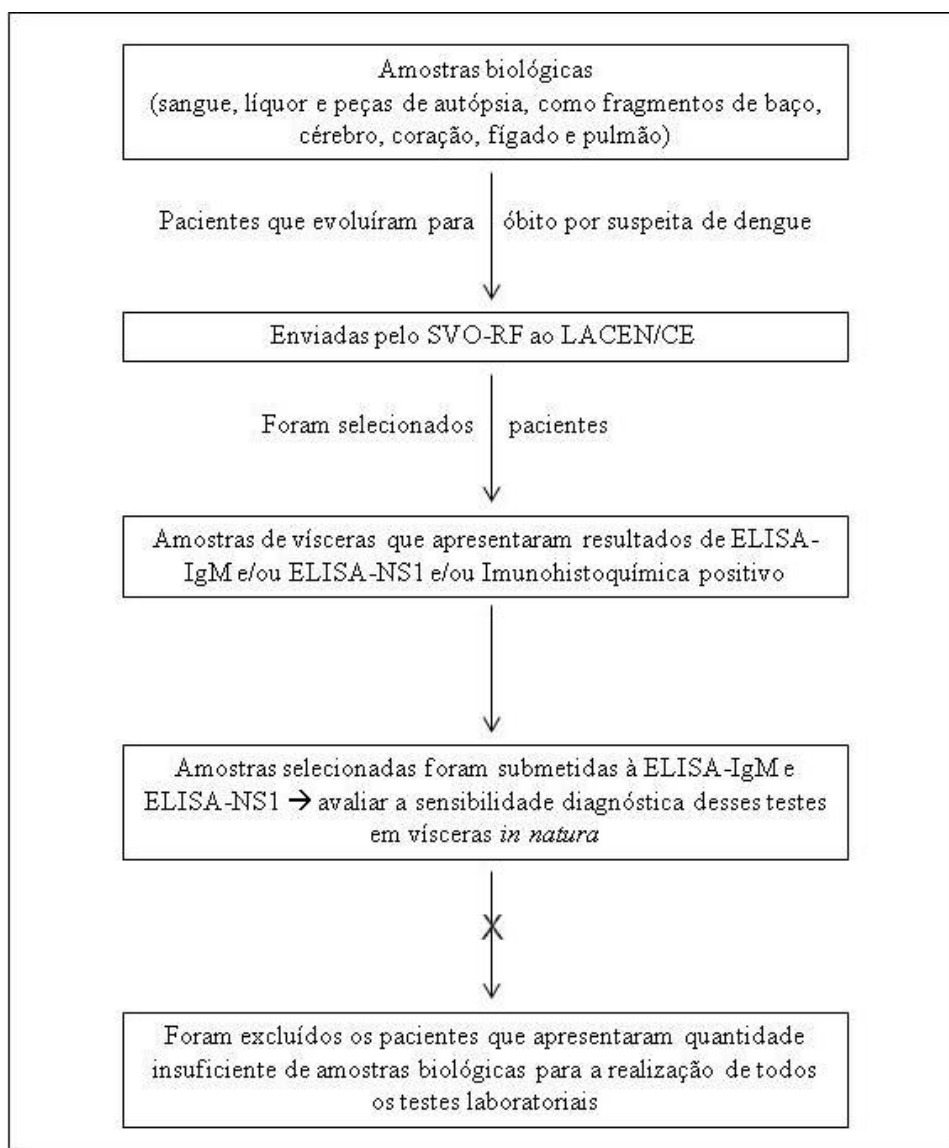
Foram incluídas no estudo pacientes cujas amostras biológicas foram encaminhadas ao LACEN/CE para realização de exames laboratoriais para confirmação de óbito por suspeita de dengue e que apresentaram pelo menos um resultado positivo ou reagente nos seguintes exames: ELISA IgM, ELISA NS1, RT-PCR, e Imunohistoquímica.

#### **4.6. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Pacientes que apresentaram quantidade insuficiente de amostras biológicas para a realização de todos os testes laboratoriais.

#### **4.7. ANÁLISE DE DADOS**

Os resultados dos testes diagnósticos foram inicialmente incluídos em tabelas utilizando-se o programa Microsoft Excel e os dados posteriormente foram analisados para se avaliar a sensibilidade diagnóstica nos exames laboratoriais nas diversas amostras biológicas e calcular frequências, médias, sensibilidade e especificidade.



**Figura 5.** Fluxograma com o processo de seleção das amostras do estudo.

## 4.8. TÉCNICAS LABORATORIAIS

### 4.8.1 Tratamento dos tecidos

As amostras de vísceras foram tratadas segundo descrito anteriormente por Lima *et al.* (2011). Amostras de tecidos humanos (1-2 g), mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram macerados e centrifugados. Com o uso de pinças e tesouras estéreis um fragmento de tecido (de cada amostra de víscera) de cerca de  $1\text{ cm}^3$  foi cortado, transferido e macerado por graal com pistilo de porcelana e colocado em um tubo cônico de 15 ml contendo 1,5 ml de meio L-15 (Leibovitz), com pH 7.0-7.4 e 3% de penicilina sódica/ sulfato de estreptomicina e foi incubado a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos e centrifugado (10.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos). O sobrenadante límpido obtido foi transferido para um criotubo esterilizado de 2,0 mL e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser utilizado. O sobrenadante foi utilizado para o a detecção de anticorpos IgM e detecção de antígeno NS1, ligados à proteínas virais expressas na membrana plasmática de células infectadas pelo vírus dengue.

### 4.8.2 ELISA Dengue IgM

A confirmação laboratorial do diagnóstico de dengue por ELISA IgM foi realizado através do kit comercial de imunoensaio enzimático, comercializada pela PanBio Diagnostics<sup>®</sup> (Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Este teste destina-se à detecção qualitativa, presença ou não, de anticorpos IgM anti-dengue em amostras biológicas dos pacientes, os quais, se presentes, ligam-se a anticorpos anti-IgM humano aderidos à superfície de poliestireno de cada um dos 96 poços da placa disponível nos kits de captura de IgM.

Antes do procedimento, todos os reagentes tiveram sua temperatura equilibrada à temperatura ambiente ( $20$  à  $25^{\circ}\text{C}$ ). Em seguida, os controles positivo e negativo, o calibrador (fornecidos pelo kit) e as amostras de soro dos pacientes foram diluídos de 1:100, utilizando o diluente das amostras e o antígeno de 1:250, usando o diluente do antígeno. Em seguida, o antígeno diluído foi adicionado de igual volume do anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase HRP (MAb) e incubados por 1 h, à temperatura ambiente, permitindo a formação de complexos Ag-MAb. Durante os 10 minutos iniciais da incubação do Ag-MAb,  $100\ \mu\text{L}$

das amostras diluídas e dos controles (positivo, negativo e calibrador) foram adicionados à placa, sendo que um poço foi destinado ao controle negativo, outro para o controle positivo, e para o calibrador, uma triplicata. A placa foi coberta e incubada por 1 h à 37°C. Após essa incubação, o soro residual que não reagiu com os anticorpos aderidos à placa, foi removido por meio de lavagens sucessivas com o tampão de lavagem, previamente diluído. Em seguida, 100 µL do Ag-MAb foram adicionados aos poços e incubados à 37°C por 1 h. Após esse período, os poços foram lavados novamente e foi adicionado 100µL do tetra-metil-benzeno (cromógeno TMB) aos poços. O substrato, quando presente, foi então hidrolisado pela enzima e o cromógeno se tornou azul. Finalmente, a reação foi parada pela adição de 100µL de ácido fosfórico (1M) que mudou da cor azul para amarelo. A placa finalmente foi lida em aparelho leitor de ELISA, em um comprimento de onda de 450 nm com filtro de referência de 650 nm.

Para análise dos resultados, seguiram-se as instruções fornecidas pelo fabricante, contidas na bula do kit. Resumidamente, os cálculos foram realizados da seguinte maneira: foram obtidas as médias das absorbâncias das triplicatas do calibrador e multiplicadas pelo fator de calibração fornecido pelo kit, obtendo assim, o valor do ponto de corte (cut-off). O índice de absorbância das amostras foi calculado dividindo absorbâncias das mesmas pelo valor do ponto de corte. A multiplicação dos índices de absorbância por 10 gerava o valor em unidades PanBio. Resultados maiores que 11 unidades PanBio foram interpretados como positivos; menores que 9, como negativos; e entre 9 e 11 unidades PanBio, o resultado foi considerado duvidoso, necessitando repetição do teste.

Para as amostras de líquido e sobrenadante de vísceras foi utilizada a diluição de 1:2.

#### **4.8.3 ELISA Dengue NS1**

A confirmação laboratorial do diagnóstico de dengue por ELISA NS1 foi realizado através do kit comercial de imunoenensaio enzimático, Platelia™ Dengue NS1 Ag ELISA, comercializado pela BioRad Laboratories® (França), seguindo as recomendações do fabricante e os procedimentos anteriormente descritos por Lima *et al.*, 2011. Este sistema de teste baseia-se em um formato de enzima imunoenensaio sanduíche com microplacas para detectar antígenos DENV NS1 em amostras biológicas humanas. O teste utiliza anticorpo monoclonal murino (AcM) para a captura e a revelação.



Amostras dos pacientes e os controles foram deixados à temperatura ambiente (21-22°C) para descongelar. Uma amostra de 50 µL do diluente das amostras e as respectivas amostras e controles (50 µL cada) e 100 µL de conjugado diluído foram incubados durante 90 minutos a 37°C dentro dos respectivos poços da microplaca revestidos com anticorpos murinos NS1 monoespecíficos purificados. Findado esse tempo, a microplaca foi lavada seis vezes e 160 µL de substrato foi adicionado a cada poço e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Se o antígeno NS1 estiver presente na amostra forma-se um imuno-complexo AcM-NS1-AcM/peroxidase. Após seis lavagens praticadas no final da incubação a presença do complexo imune é revelada pela adição, em cada poço, de 160 µl de uma solução de revelação enzimática (substrato) que induz o desenvolvimento de uma reação de coloração. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro a reação enzimática é parada por adição de uma solução de ácido (100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N). A leitura da densidade óptica foi feita com um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450 nm-620 nm e é proporcional à quantidade de antígeno NS1 presente na amostra testada. A presença do antígeno NS1 em uma amostra individual foi determinada por comparação da densidade óptica lida nesta amostra e a obtida no soro do valor do calibrador.

#### 4.8.4 Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica é utilizada para se determinar a presença de antígenos virais em amostras de muitos tecidos de pacientes que evoluíram a óbito fixadas em formalina, incluindo o baço, cérebro, coração, fígado, nódulo linfático, timo, rim, pulmão e pele, mas principalmente em células fagocíticas mononucleares (JESSIE *et al.*, 2004).

O procedimento da imunohistoquímica, segundo metodologia preconizada por Hall *et al.* (1991) de modo geral, consiste em demonstrar os antígenos da dengue em secções de tecido por um procedimento de avidina-biotina peroxidase. Exame com tecidos corados com hematoxilina e eosina revelou pigmentos endógenos consistentes. Todos estes podem interferir com a interpretação do produto de reação formado com diaminobenzidina (DAB) como substrato para o procedimento de imunoperoxidase. Resumidamente, seções de 5 µm das amostras de vísceras (baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim) foram montadas em lâminas revestidas com cola e hidratadas. Os pigmentos foram removidos das seções por imersão em uma solução de hidróxido de amônio/etanol diluído, durante 15 minutos. As

lâminas foram então neutralizadas por lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com pH 7.2 antes da coloração. As lâminas foram imersas numa solução a 0,05% de protease VIII com pH 7.8 a 37°C durante 3 minutos e lavadas em PBS. Os tecidos foram corados com o procedimento de complexo avidina-biotina (ABC), utilizando um bloco a 0,2% peróxido de hidrogénio/metanol para a atividade da peroxidase endógena. Os anticorpos policlonais de dengue foram adicionados para replicar as seções e incubados em uma câmara úmida durante uma hora à temperatura ambiente. Os anticorpos foram eliminados a partir das seções selecionadas como um controle adicional. Isto foi seguido da incubação com um anticorpo secundário biotínido e o reagente ABC, com lavagens apropriadas em PBS. As lâminas foram colocadas em 0,05% de DAB, contendo peróxido de hidrogénio, e a reação foi deixada até a coloração se desenvolver. Após a reação com DAB as lâminas foram lavadas cuidadosamente em água corrente e colocadas em 0,1% de tetróxido de ósmio durante 30 minutos e depois foram novamente lavadas em água e contra coradas com uma solução de ferrocianeto de potássio por 15 minutos. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas com lamínulas com o auxílio de resina Permount<sup>®</sup>. Para comparação, as seções adicionais foram cortadas e coradas com estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina como um marcador de enzima, ácido 6-bromo-2-hidroxi-3-naftóico como substrato, e levamisol para inibir a fosfatase alcalina endógena. A hematoxilina foi novamente utilizada como contrastante e as lâminas foram desidratadas e montadas em Permount<sup>®</sup>. Com este procedimento os antígenos ficaram corados intensamente em vermelho e não foi necessário remover os pigmentos endógenos, que apareceram em cores amarela ou marrom.

#### **4.8.5 RT-PCR**

A metodologia descrita por Lanciotti *et al.*, (1992) foi utilizada para detecção e tipagem dos DENV nas amostras de líquido e sangue. Esse protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento semi-nested, gerando produtos amplificados com tamanhos específicos em pares de base para cada sorotipo dos DENV. A RT-PCR constituiu-se em uma reação de duas etapas, onde na primeira foi realizada uma transcrição reversa (RT) seguida de uma reação pela polimerase em cadeia (PCR) que utilizou os oligonucleotídeos iniciadores (primers) D1 e D2 juntamente com as enzimas transcriptase

reversa (Cloned Reverse Transcriptase - Invitrogen) e Taq polimerase (Taq DNA Polymerase Recombinant - Invitrogen) para a síntese e amplificação do cDNA viral.

O material foi amplificado a partir de uma etapa a 42°C durante 60 minutos seguidos de 30 ciclos a 94°C por 35 segundos para a desnaturação das fitas, 55°C por um minuto para a hibridização, 72°C por dois minutos para a extensão e uma etapa final de 72°C por 10 minutos para completar a extensão final das fitas formadas. O produto da amplificação foi utilizado para a realização da semi-nested PCR.

## **5. RESULTADOS**

Durante os anos de 2013 e 2014, 202 amostras de pacientes com evolução fatal foram encaminhados ao LACEN com suspeita de óbito por dengue, sendo 122 em 2013 e 80 em 2014. Dessas, foram analisadas 109, incluídas por apresentarem pelo menos um resultado positivo ou reagente nos exames; 70 de 2013 e 39 do ano seguinte. Foram excluídas do estudo aquelas amostras que se encontravam em quantidade insuficiente para a realização dos exames e aqueles pacientes que não apresentaram resultados positivos/reagentes em nenhum dos testes laboratoriais realizados. Para cada paciente havia uma amostra de líquido, sangue/soro e vísceras.

**Quadro 1.** Compilado da confirmação laboratorial de acordo com os espécimes e as metodologias em casos de óbitos por dengue em líquido e em sangue.

Paciente	Idade/Sexo	2013 e 2014						
		RT-PCR		IgM		NS1		IHQ
		Líquor	Sangue	Líquor	Sangue	Líquor	Sangue	Vísceras
1	51 anos/M	N.R.	N.R.	-	-	-	-	+
2	17 anos/M	-	-	-	-	+	-	+
3	48 anos/M	N.R.	N.R.	+	+	-	-	-
4	35 anos/M	N.R.	-	-	-	-	-	+
5	45 anos/M	-	N.R.	-	-	-	+	+
6	< 1 ano/M	-	N.R.	-	-	-	+	-
7	37 anos/F	N.R.	N.R.	+	+	-	-	+
8	40 anos/F	-	N.R.	-	-	-	+	+
9	12 anos/F	N.R.	-	-	-	-	-	+
10	20 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
11	68 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
12	47 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
13	73 anos/F	-	N.R.	-	-	-	+	+
14	57 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
15	77 anos/F	-	N.R.	-	-	-	-	+
16	40 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
17	26 anos/M	-	-	-	-	-	+	+
18	75 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
19	57 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
20	39 anos/M	-	-	-	-	-	+	-
21	38 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
22	54 anos/M	-	N.R.	+	+	-	+	+
23	1 ano/F	-	-	-	-	-	-	+
24	33 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
25	42 anos/M	-	-	-	-	-	-	+

<b>26</b>	49 anos/F	-	N.R.	-	-	-	+	-
<b>27</b>	12 anos/M	-	-	+	-	-	-	+
<b>28</b>	4 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>29</b>	38 anos/F	-	-	-	+	-	-	+
<b>30</b>	1 ano/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>31</b>	43 anos/F	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>32</b>	15 anos/F	-	-	+	+	+	+	-
<b>33</b>	39 anos/M	-	-	+	+	-	-	-
<b>34</b>	< 1 ano/F	-	DENV-4	+	+	+	+	+
<b>35</b>	25 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>36</b>	17 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>37</b>	44 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>38</b>	1 ano/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>39</b>	14 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>40</b>	35 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>41</b>	31 anos/F	-	-	+	+	-	-	+
<b>42</b>	23 anos/F	-	-	+	+	-	-	+
<b>43</b>	46 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>44</b>	34 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>45</b>	19 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>46</b>	47 anos/M	-	-	+	+	-	-	+
<b>47</b>	37 anos/F	-	-	+	+	+	+	-
<b>48</b>	82 anos/M	-	-	+	+	-	-	+
<b>49</b>	30 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>50</b>	60 anos/F	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>51</b>	60 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>52</b>	95 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>53</b>	47 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>54</b>	2 anos/M	-	-	-	-	-	+	+
<b>55</b>	< 1 ano/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>56</b>	29 anos/F	-	N.R.	+	+	-	+	+

<b>57</b>	< 1 ano/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>58</b>	< 1 ano/M	-	N.R.	+	+	-	-	+
<b>59</b>	25 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>60</b>	52 anos/F	-	-	+	+	+	+	+
<b>61</b>	15 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>62</b>	< 1 ano/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>63</b>	55 anos/F	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>64</b>	33 anos/M	-	-	+	+	+	+	+
<b>65</b>	54 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>66</b>	35 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>67</b>	4 anos/F	N.R.	-	-	-	-	-	+
<b>68</b>	60 anos/F	-	-	-	-	+	-	-
<b>69</b>	35 anos/M	-	DENV-1	-	-	-	-	-
<b>70</b>	26 anos/F	N.R.	-	N.R.	-	-	-	-
<b>71</b>	2 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>72</b>	28 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>73</b>	26 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>74</b>	41 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>75</b>	29 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>76</b>	13 anos/F	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>77</b>	8 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>78</b>	3 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>79</b>	14 anos/M	-	-	+	+	+	+	+
<b>80</b>	13 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>81</b>	15 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>82</b>	< 1 ano/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>83</b>	5 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>84</b>	26 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>85</b>	47 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>86</b>	1 ano/M	-	-	-	-	-	+	-
<b>87</b>	48 anos/M	-	N.R.	+	-	-	-	+

<b>88</b>	< 1 ano/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>89</b>	52 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>90</b>	13 anos/F	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>91</b>	3 anos/M	-	DENV-1	+	+	-	+	-
<b>92</b>	8 anos/F	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>93</b>	< 1 ano/M	-	N.R.	+	-	-	-	-
<b>94</b>	34 anos/M	-	-	+	-	-	-	+
<b>95</b>	13 anos/M	DENV-4	N.R.	+	+	-	-	+
<b>96</b>	21 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>97</b>	13 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>98</b>	73 anos/M	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>99</b>	44 anos/M	-	-	+	+	-	-	-
<b>100</b>	32 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>101</b>	27 anos/M	DENV-4	-	-	-	-	-	+
<b>102</b>	57 anos/F	-	N.R.	-	-	-	-	+
<b>103</b>	38 anos/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>104</b>	< 1 ano/F	-	-	-	-	-	-	+
<b>105</b>	< 1 ano/M	-	-	+	+	-	-	-
<b>106</b>	59 anos/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>107</b>	1 ano/F	N.R.	N.R.	-	-	-	-	+
<b>108</b>	< 1 ano/M	-	-	-	-	-	-	+
<b>109</b>	< 1 ano/M	-	-	-	-	-	-	+

Legenda: N.R. = Não Realizado; - = Negativo; + = Positivo; F = Feminino; M = Masculino.

As manifestações clínicas mais comuns foram febre, dor, dispneia, vômito e cefaleia (Tabela 1).



**Tabela 1.** Manifestações clínicas relatadas pelos 109 pacientes incluídos no estudo.

<b>Sintomas</b>	<b>Total (%)</b>
Febre	73 (66,97)
Mialgia	60 (55,04)
Dispneia	49 (44,95)
Vômitos	44 (40,36)
Cefaleia	34 (31,19)
Hipotensão	20 (18,34)
Petéquias e Equimoses	19 (17,43)
Adinamia	18 (16,51)
Cianose	16 (14,67)
Tosse	13 (11,92)
Rebaixamento sensório	13 (11,92)
Sudorese	08 (7,33)
Diarreia	07 (6,42)
Náuseas	06 (5,50)
Tontura	05 (4,58)
Calafrios	05 (4,58)
Comorbidades: cardiopatia, diabetes e hipertensão	05 (4,58)
Convulsão	04 (3,66)
Dor precordial	02 (1,83)
Dor retro-orbital	02 (1,83)
Extremidades frias	02 (1,83)
Insuficiência renal e hepática	01 (0,91)
Sangramento de mucosas	01 (0,91)

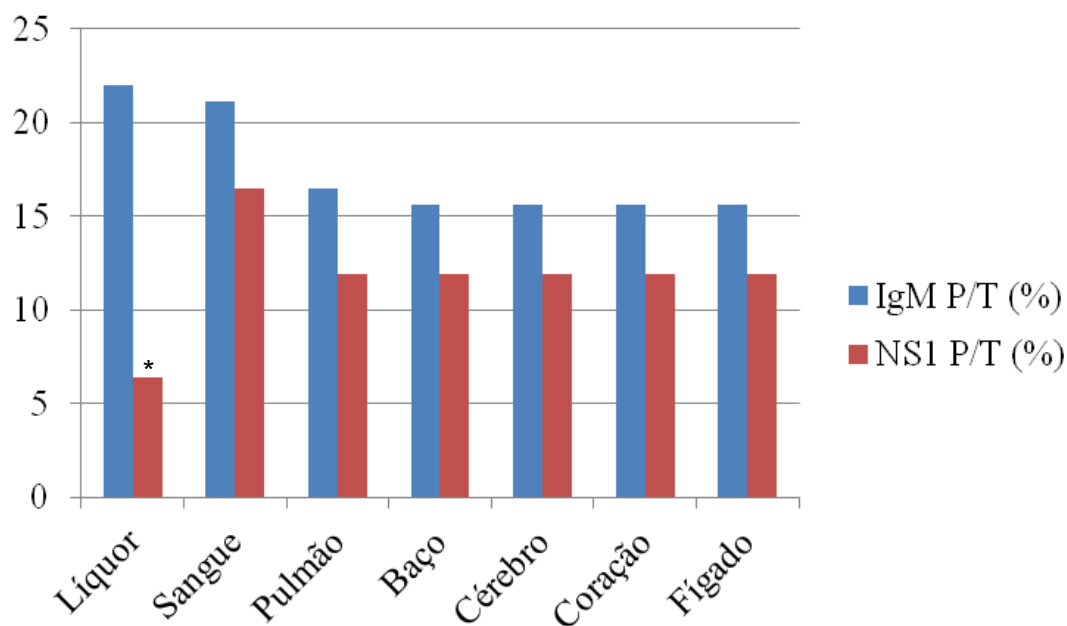
A média de idade dos pacientes foi de  $33,46 \pm 21,18$ , com valor de mediana de 34, moda de 01 e os valores mínimo e máximo variando de menos de 01 ano (05 dias) à 95 anos.

Amostras de 109 pacientes que evoluíram à óbito (63 do sexo masculino e 46 do sexo feminino) foram submetidas a testes de ELISA (IgM e NS1) para se avaliar a capacidade de detecção desses exames nas vísceras *in natura* de casos fatais de dengue; essas amostras foram conservadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes. Também foram realizados

exames de Imunohistoquímica no Instituto Evandro Chagas nas amostras de vísceras que chegaram preservadas em formol. A Tabela 2 demonstra o resultado das metodologias realizadas nas amostras clínicas incluídas no estudo.

As amostras biológicas que apresentaram maior positividade no ELISA IgM foram líquido e sangue (Gráfico 1). O ELISA IgM detectou mais os verdadeiro-positivos em todas as amostras testadas e o ELISA NS1 detectou menos os verdadeiro-positivos em amostras de líquido, quando comparado às demais amostras em relação ao ELISA IgM.

**Gráfico 1.** Comparação de 109 casos fatais de dengue em amostras de líquido, sangue e vísceras na metodologia de detecção de anticorpo IgM e de antígeno NS1 por ELISA.



Legenda: P/T = Positivo/Total. \*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Resultados de 109 casos fatais de dengue de acordo com espécime clínica analisada e metodologia.

<b>Metodologia</b>	<b>Líquor</b>	<b>Sangue</b>	<b>Vísceras</b>
<b>IgM</b>	24/109 (22 %)	23/109 (21,1 %)	18/109 (16,5 %)
<b>NS1</b>	7/109 (6,4 %)	18/109 (16,5 %)	13/109 (11,9 %)
<b>IHQ</b>	Não se aplica	Não se aplica	96/109 (88,1 %)
<b>PCR</b>	2/101 (2 %)	3/75 (4%)	Não se aplica
	2 DENV-4	2 DENV-1 e 1 DENV-4	

A partir da Tabela 4 acima inferiu-se que o ELISA IgM no sangue apresentou uma positividade de 21,1 % (23 amostras reagentes de um total de 109 pacientes); no líquido apresentou uma positividade de 22,0 % (24 amostras positivas de um total de 109 pacientes); nas vísceras apresentou uma positividade de 16,5 % (18 amostras de um total de 109 pacientes).

A detecção de AgNS1 nas vísceras foi maior do que a detecção de AgNS1 no líquido e é menor do que a detecção do AgNS1 no sangue.

A positividade no ELISA IgM ao se comparar o resultado no sangue com o das vísceras foi de 78,3 % e a positividade no ELISA NS1 ao se comparar o resultado no sangue com o das vísceras foi de 72,2 %, ou seja, o IgM no sangue apresentou 1,27 vezes mais positividade do que o IgM nas vísceras e o NS1 no sangue apresentou 1,38 vezes mais positividade do que o NS1 nas vísceras.

A Tabela 3 mostra os resultados dos pacientes (26) que apresentaram algum resultado de IgM positivo em qualquer das amostras avaliadas.

**Tabela 3.** Comparação dos resultados de IgM em 26 amostras de vísceras, líquido e sangue de pacientes com dengue e evolução fatal nos anos de 2013-2014, no Ceará.

<b>Paciente</b> <b>Idade/Sexo</b>	<b>IgM positivo</b> <b>em vísceras</b>	<b>IgM positivo</b> <b>em líquido</b>	<b>IgM positivo</b> <b>em sangue</b>
48 anos/M	-	+	+
35 anos/M	+	-	-
<1 ano/M	+	-	-
37 anos/F	+	+	+
54 anos/M	+	+	+
12 anos/M	-	+	-
15 anos/F	+	+	+
39 anos/M	+	+	+
<1 ano/F	+	+	+
31 anos/F	+	+	+
23 anos/F	+	+	+
47 anos/M	+	+	+
37 anos/F	+	+	+
82 anos/M	+	+	+
29 anos/F	-	+	+
<1 ano/M	-	+	+
25 anos/M	+	+	+
52 anos/F	-	+	+
55 anos/F	+	+	+
33 anos/M	-	+	+
4 anos/F	-	+	+
14 anos/M	+	+	+
3 anos/M	+	+	+
13 anos/M	+	+	+
44 anos/M	-	+	+
<1 ano/M	+	+	+
<b>Total (+) (%)</b>	<b>18 (69,2 %)</b>	<b>24 (92,3 %)</b>	<b>23 (88,5 %)</b>

Das amostras de IgM positivo em líquido (24), 75 % também foram IgM positivo nas vísceras (18) e 78,3 % das amostras de IgM positivo em líquido foram também IgM positivo no sangue (23). Dos pacientes do estudo, 16 (61,5 %) apresentaram positividade no ELISA IgM em todas as amostras analisadas (Tabela 3). Dois pacientes apresentaram resultados positivos apenas no IgM nas vísceras, casos de dengue que teriam sido perdidos se essa metodologia não tivesse sido realizada nesses casos, ou seja, ELISA IgM deve ser o teste de partida para a confirmação de casos suspeitos de dengue.

**Tabela 4.** Comparação da detecção do antígeno NS1 em 13 casos fatais de dengue em amostras de vísceras, líquido e sangue.

<b>Paciente</b> <b>Idade/Sexo</b>	<b>NS1 positivo</b> <b>em vísceras</b>	<b>NS1 positivo</b> <b>em líquido</b>	<b>NS1 positivo</b> <b>em sangue</b>
37 anos/F	+	-	-
12 anos/F	+	-	-
15 anos/F	+	+	+
<1 ano/F	+	+	+
55 anos/F	+	+	+
14 anos/M	+	+	+
13 anos/F	+	-	-
<1 ano/M	+	-	-
5 anos/M	+	-	-
47 anos/M	+	-	-
1 ano/M	+	-	+
3 anos/M	+	-	+
<1 ano/M	+	-	-
<b>Total (+)</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>6</b>

Dos 13 pacientes que apresentaram pelo menos um resultado positivo nas amostras avaliadas, 4 apresentaram positividade simultânea para o ELISA NS1 nas amostras analisadas (Tabela 4).

**Tabela 5.** Sensibilidade e especificidade de detecção de IgM para DENV nas vísceras.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Dengue</b>	18	91	109
<b>Não Dengue</b>	0	48	48
<b>Total</b>	18	139	
<b>Sensibilidade</b>	16,5 % (95 % IC 1,1 – 34,1)		
<b>Especificidade</b>	100 % (95 % IC 98 – 100 %)		

A partir dos dados inferidos a partir da Tabela 5 tem-se que a sensibilidade (verdadeiro-positivos) do IgM nas vísceras foi de 16,5% (95% IC 1,1 – 34,1 % ) e a especificidade (verdadeiro-negativos) foi de 100 % (95% IC 98 – 100 %).

**Tabela 6.** Sensibilidade e especificidade de detecção de NS1 para DENV nas vísceras.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Dengue</b>	13	96	109
<b>Não Dengue</b>	0	48	48
<b>Total</b>	13	144	
<b>Sensibilidade</b>	12 % (95% IC 5,6 – 29,6 % )		
<b>Especificidade</b>	100 % (95% IC 98 – 100 %)		

A partir dos dados inferidos a partir da Tabela 6 tem-se que a sensibilidade do NS1 nas vísceras foi de 12 % (95% IC 5,6 – 29,6 %) e a especificidade foi de 100 % (95% IC 98 – 100 %)

## 6. DISCUSSÃO

Das 109 amostras de pacientes incluídas no nosso estudo, oriundas de pacientes que foram à óbito por suspeita de dengue nos anos de 2013 e 2014, 63 (57,80%) eram do sexo masculino e 46 (42,20%) do sexo feminino; a maioria (61,47%) ocorreu em adultos com idades entre 20 e 95 anos e 13 (11,93%) ocorreram em crianças com menos de um ano. No Brasil, foram confirmados 629 óbitos por dengue até a semana epidemiológica 51 de 2016. No mesmo período de 2015 foram confirmados 833 óbitos (BRASIL, 2017). Até a semana epidemiológica 51 de 2016, foram confirmados 30 óbitos por dengue no Ceará, 13 (43,3%) do sexo feminino e 17 (56,7%) do sexo masculino. A maioria (82,4%) ocorreu em adultos com idades entre 36 e 98 anos e três (17,6%) ocorreram em crianças de um mês e 11 anos (mediana de 59 anos). Quando comparados ao mesmo período do ano anterior, quando foram confirmados 66 óbitos, houve uma redução de 59,0% (CEARÁ, 2016). O perfil apresentado no nosso estudo é semelhante aos dados notificados pela SESA-CE que apontou um maior número de óbitos entre pessoas do sexo masculino e entre a faixa etária de adultos.

Alguns fatores estão associados com uma maior taxa de mortalidade por dengue, como um rendimento médio per capita baixo. O acesso a melhores condições socioeconômicas e de saúde têm sido reconhecidas como fatores de proteção contra a morte não só por dengue, como das doenças infecciosas de maneira geral (NGUYEN *et al.*, 2003). Acesso aos profissionais de saúde da atenção primária também pode reduzir a taxa de letalidade por dengue. Além disso, a qualidade aos cuidados prestados deve ser um fator de risco. No entanto, é difícil determinar a influência da qualidade da assistência médica a partir de estudos baseados em dados de atestados de óbito (PAIXÃO *et al.*, 2015). Com essa limitação, não foi possível extrair maiores informações a respeito das condições de atendimento que esses pacientes receberam nas unidades de saúde antes de evoluírem à óbito e saber se de alguma forma isso influenciou no desfecho fatal.

A classificação revisada da OMS, adotada no Brasil a partir de 2014, é mais sensível do que a classificação anteriormente utilizada para encerrar e classificar os casos mais graves de dengue. A habilidade de apreciar e reconhecer os sinais de alerta da classificação revisada é essencial para que os clínicos identifiquem pacientes em risco de desenvolver a doença severa e para determinar uma linha de ação apropriada em cada caso

(LIMA *et al.*, 2013). Sendo assim, ao se identificar pacientes com dengue com sinais de alarme e dando-lhes o suporte adequado pode-se evitar que eles evoluam à óbito.

A confirmação de casos fatais de dengue sempre foi problemática porque na maioria dos casos apenas uma amostra de sangue é obtida e a morte ocorreu em um período de tempo quando resultados positivos de técnicas caras e laboriosas, como isolamento viral e detecção de RNA viral, podem ser difíceis (GUBLER, 1998; JESSIE *et al.*, 2004). O diagnóstico virológico da dengue em espécimes de tecidos também é realizado por imunohistoquímica (HALL *et al.*, 1991). Estas metodologias permitem a detecção do DENV em amostras de vísceras, com fígado, baço, cérebro, pulmão, rim, coração, e em espécimes de linfonodo, timo, medula óssea e pele (LIMONTA *et al.*, 2007).

Como uma proposta de uma nova abordagem para auxiliar no diagnóstico de casos fatais de dengue alguns pesquisadores procuraram demonstrar que a utilização de kits comerciais para detecção de antígeno NS1 pode ser um instrumento a mais para auxiliar no diagnóstico de casos fatais de dengue. Lima *et al.* (2011) avaliaram três testes para a captura do antígeno NS1. Um dos kits avaliados foi o ELISA Platelia NS1 (BioRad) que detectou NS1 em 45,9% das amostras (34/74). No nosso estudo, o mesmo kit foi capaz de detectar NS1 em 11,9% (13/109) das amostras de vísceras analisadas. Apesar destes resultados, não podemos inferir se esta detecção foi ou não devida à replicação viral *in situ* ou devida ao vírus presente no sangue que suporta estes tecidos.

No trabalho de LIMA *et al.* (2011) apenas a técnica de RT-PCR em Tempo Real realizada nos tecidos avaliados foi mais sensível do que o ensaio de detecção do antígeno NS1. As sensibilidades de qualquer um dos três ensaios de captura NS1 foram superiores ao isolamento viral e à RT-PCR convencional. No nosso estudo, as técnicas de detecção de anticorpo IgM por ELISA e a imunohistoquímica foram mais sensíveis do que o ensaio para detecção do antígeno NS1 em amostras de vísceras. Na literatura há poucas pesquisas realizadas para demonstrar presença de NS1 em tecidos de dengue de casos fatais. Os tecidos incluídos no nosso estudo, cérebro, coração, baço, fígado, pulmão e rim, foram relatados com presença de DENV usando métodos imunoenzimáticos e imunohistoquímicos. Os testes imunohistoquímicos e a detecção de antígeno NS1 por ELISA foram os que mais contribuíram para o diagnóstico de casos fatais de dengue, conforme relatado por Araújo *et al.* (2011). Com relação à metodologia de ELISA para detecção de anticorpos IgM não há relatos



da sua utilização em amostras de casos fatais o que torna o nosso estudo pioneiro nessa análise.

No estudo de Araújo *et al.* (2011) os sorotipos virais circulantes eram os DENV-2 e DENV-3 que eram detectados pela reação de ELISA AgNS1 melhor do que os sorotipos DENV-1 e DENV-4, que circulavam durante o período do presente estudo.

A melhora do protocolo realizado pelo SVO de Fortaleza aumentou a detecção de casos fatais de dengue em aproximadamente cinco vezes no Ceará em 2011 e 2012, em comparação com óbitos relatados como suspeitos pelos serviços de saúde. Esse aumento na detecção das mortes pode ser atribuído a fatores como a melhora no protocolo adotado para casos de suspeita de dengue no SVO-RF e ao papel do LACEN, que utiliza cinco técnicas de diagnóstico para sangue, líquido cefalorraquidiano e vísceras. E nesse estudo a detecção de antígeno NS1 foi crítica (CAVALCANTI *et al.*, 2016). O nosso estudo vem complementar e ratificar achados de trabalhos anteriores que também mostraram a importância de se utilizar todas as técnicas disponíveis para o diagnóstico da dengue em casos *pós-mortem*.

Os sinais e sintomas mais comuns em um quadro de dengue são febre, cefaleia, mialgia, náusea, prostração, dor retro-orbital, artralgia, exantema, dor abdominal e diarreia (CAVALCANTI *et al.*, 2010). Em nosso estudo, a febre foi relatada em 66,97 % dos óbitos de dengue. A dispneia e a tosse foram relatadas em 44,95 % e 11,92 % dos pacientes, respectivamente. A tosse foi observada em 76,1% dos casos fatais no estudo de CAVALCANTI *et al.*, 2016. A convulsão foi observada em 3,66% das mortes por dengue e diz respeito a manifestações neurológicas em alguns quadros graves dessa doença, como atestado por ARAÚJO *et al.* (2012). A comorbidade foi relatada em 4,58% dos casos fatais de dengue, com relatos de cardiopatia, diabetes e hipertensão, conforme relatado por PANG *et al.* (2012) e THEIN *et al.* (2013) que associaram presença dessas comorbidades como fatores associados à morte. As manifestações clínicas encontradas no nosso estudo podem não estar em acordo com o que está descrito na literatura devido à sua coleta ter sido realizada por meio das fichas oriundas do SVO e estas, em alguns casos, são preenchidas de maneira incompleta. Mesmo assim, a parceria entre SVO e LACEN permite que um maior número de óbitos suspeitos por dengue seja investigado e contribui para o trabalho da vigilância epidemiológica que pode organizar estratégias para tentar diminuir a ocorrência de grande número de casos fatais da doença.

Nos últimos 50 anos, a dengue tem progressivamente alcançado o status de uma pandemia, e aproximadamente 4 bilhões de pessoas estão em risco de infecção com cerca de 390 milhões de casos e 20.000 mortes ocorrendo anualmente (MESSINA *et al.*, 2015). Dentre os casos fatais chama a atenção o número de óbitos registrados entre as menores faixas etárias. Durante a gravidez, o feto pode ser suscetível à infecção por DENV, especialmente durante o período crítico de organogênese ou no final da gravidez. Já foi observado o aumento do número de macrófagos na placenta ou no cordão umbilical (MAROUN *et al.*, 2008). O ensaio imunohistoquímico já revelou a presença de antígenos NS1 e NS3 da dengue em macrófagos presentes na vilosidade placentária e dentro da túnica adventícia do cordão umbilical, bem como no endotélio das duas artérias do cordão umbilical. O NS1 é uma proteína não estrutural do DENV e, portanto, indica a replicação do vírus. A presença das proteínas NS1 e NS3 do DENV no macrófago e no endotélio na placenta e no cordão umbilical sugere uma possível transmissão vertical do DENV (NUNES *et al.*, 2016). No nosso estudo, treze pacientes (11,93%) possuíam idade inferior a um ano, sendo que o paciente com menos idade possuía apenas cinco dias de nascimento e do nascimento ao desfecho fatal não se ausentou do hospital, o que corrobora a via de transmissão vertical na infecção por dengue.

No estudo de DE ARAÚJO *et al.* (2009), que avaliou casos fatais de dengue decorrentes da epidemia de DENV no Rio de Janeiro no início dos anos 2000, observou-se um aumento de características clínicas anormais do quadro da doença, caracterizada pela incidência de envolvimento do Sistema Nervoso Central e hepatite. Neste estudo, o fígado foi o órgão mais importante para a detecção de vírus, de acordo com os quatro métodos de diagnóstico. Outros achados importantes no mesmo trabalho foram que o exame das amostras de tecido disponíveis do baço, do rim e do pulmão deu resultados positivos em 10, 4 e 10 casos fatais, respectivamente, utilizando imunohistoquímica, e houve 58,4% de positividade nas 77 amostras histológicas. Na população do nosso estudo a imunohistoquímica, realizada em amostras de fígados, foi o exame que apresentou maior positividade. O fígado já foi reconhecido como um órgão alvo principal na patogênese da infecção por DENV, sendo a sua replicação ativa nos hepatócitos talvez a responsável por estas descobertas (LIN *et al.*, 2000). Com relação a amostras de líquido houve uma maior positividade no exame para detecção de anticorpos IgM por ELISA. Já foi provado que o DENV possui neurotropismo e demonstrado que pode ocorrer a desagregação da barreira hematoencefálica em casos fatais de dengue

(LUM *et al.*, 1996; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997). No Brasil, como as infecções pelo vírus da dengue continuam a ser um grande problema de saúde pública levando a um considerável número de desfechos fatais a comparação de métodos para o seu diagnóstico configura como uma potencial ferramenta para a vigilância da doença.

É importante se destacar as dificuldades na realização de um diagnóstico laboratorial da dengue, especialmente no final da doença. Muitas vezes isso ocorre porque o(s) espécime(s) disponível(s) foram incorretamente coletados com relação ao curso da dengue. No estudo de TOMASHEK *et al.* (2012) sete dos quinze pacientes com diagnóstico de dengue indeterminado tiveram espécimes obtidos no dia 4 ou 5 após o início dos sintomas, período em que a viremia ou a IgM anti-DENV podem ser indetectáveis. Os médicos que atuam em áreas endêmicas de dengue precisam estar cientes de incluí-la em seu diagnóstico diferencial de suspeita de doença febril aguda e que devem obter amostras de soro para testes diagnósticos precoces (dias 1 a 3) após o início dos sintomas. Para melhorar a precisão diagnóstica dos pacientes que apresentam atraso, as amostras devem ser coletadas imediatamente e uma segunda amostra coletada entre 5 a 7 dias mais tarde. Se os ensaios de diagnóstico mais sensíveis podem ser desenvolvidos para aumentar a precisão diagnóstica de espécimes coletados apenas durante o período crítico de dengue isso ainda está por se determinar (TOMASHEK *et al.*, 2012). Nesse mesmo cenário, os médicos devem estar atentos para, em casos fatais cujos sinais e sintomas se assemelhem aos da dengue, solicitar a coleta de amostras para a realização dos testes para confirmação laboratorial da suspeita.

## 6. CONCLUSÕES

Foi possível detectar anticorpo IgM nas amostras de vísceras *in natura*.

Foi possível detectar antígeno NS1 nas amostras de vísceras *in natura*.

A detecção de anticorpos IgM apresentou uma maior positividade nas amostras de líquor e sangue quando comparado às vísceras.

A detecção de antígenos NS1 apresentou uma maior positividade nas amostras de sangue quando comparado às de líquor e vísceras.

**REFERÊNCIAS**

ANGEL, R. M. D.; VALLE, J. R. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. **PLoS Pathog.** 9(10). 2013.

ARAÚJO, F. M. C.; ARAÚJO, M. S.; NOGUEIRA, R. M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; OLIVEIRA, D. N.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A.; ARAÚJO, R. M.; SIDRIM, J. J. Central nervous system involvement in dengue: a study in fatal cases from a dengue endemic area. **Neurology.** 78: 736–742. 2012.

ARAÚJO, F. M. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CAVALCANTI, L. P. G.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A.; PERDIGÃO, A. C. B.; MIRRALES, I. S.; ARAÚJO, R. M. C.; LIMA, E. G.; SIDRIN, J. J. C. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. **J Virol Methods.** 177: 128–131. 2011.

BARNIOL, J.; GACZKOWSKI, R.; BARBATO, E. V.; CUNHA, R. V.; SALGADO, D.; MARTINEZ, E.; SEGARRA, C. S.; SANDOVAL, E. B. P.; MISHRA, A.; LAKSONO, I. S.; LUM, L. C. S.; MARTÍNEZ, J. G.; NÚÑEZ, A.; BALSAMEDA, A.; ALLENDE, I.; RAMÍREZ, G.; DIMAANO, E.; THOMACHECK, K.; AKBAR, N. A.; OOI, E. E.; VILLEGAS, E.; HIEN, T. T.; FARRAR, J.; HORSTICK, O.; KROEGER, A.; JAENISCH, T. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multicentre study in 18 countries. **BMC Infectious Dis.** 11:106. 2011.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde.** Volume 48 N° 2. ISSN 2358-9450. 2017.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde.** Volume 47 N° 34. ISSN 2358-9450. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n° 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres

humanos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2013.

CAVALCANTI, L. P.; BRAGA, D. N.; DA SILVA, L. M.; AGUIAR, M. G.; CASTIGLIONI, M.; SILVA-JUNIOR, J. U.; ARAÚJO, F. M.; PEREIRA, R. A.; MALTA, D. L.; POMPEU, M. M. Postmortem Diagnosis of Dengue as an Epidemiological Surveillance Tool. **Am J Trop Med Hyg.** 94(1):187-92. 2016.

CAVALCANTI, L. P.; VILAR, D.; SOUZA-SANTOS, R.; TEIXEIRA, M. G. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis.** 17(1):132-4. 2011.

CAVALCANTI, L. P. G.; COELHO, I. C. B.; VILAR, D. C. L. F.; HOLANDA, S. G. S.; ESCÓSSIA, K. N. F.; SOUZA-SANTOS, R. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 43(4):355-358. 2010.

CEARÁ. Boletim Epidemiológico da Dengue. **Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.** 01/04/2015.

CEARÁ. Boletim Epidemiológico da Dengue. **Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.** 02/12/2016.

CUNHA, R. V.; MIAGOSTOVICH, M. P.; PETROLA, Z.; ARAÚJO, E. S. M.; CORTEZ, D.; POMBO, V.; SOUZA, R. V.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. Retrospective study on dengue in Fortaleza, state of Ceará. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 93(2):155-9. 1998.

DE ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYRA, H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; SANTOS, F. B.; CARDOSO, M. A.; BRITTO, C.; COELHO, J. M. C. O.; NOGUEIRA, R.M. R. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **Journal of Virological Methods.** 155, 34-38. 2009.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 8(6):390-398. 2004.

DEUBEL, V.; LAILLE, M.; HUGNOT, J. P.; CHUNGUE, E.; GUESDON, J. L.; DROUET, M. T.; BASSOT, S.; CHEVRIER, D. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. **J Virol Methods**. 30:41-54. 1990.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Clin. Micro. Rev.** 11, 480–496. 1998.

GUZMAN, M. G.; JAENISCH, T.; GACZKOWSKI R.; TY HANG, V. T.; SEKARAN, S. D.; KROEGER, A. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS Negl Trop Dis**. 4:e811. 2010.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J Clin Virol**. 27(1):1-13. 2003.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G.; BRAVO, J.; VALDES, L.; VAZQUEZ, S.; HALSTEAD, S. B. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **Int J Infect Dis**. 6:118—24. 2002.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**. 3:621-7. 1996.

HALL, W. C.; CROWELL, T. P.; WATTS, D. M., BARROS, V. L. R.; KRUGER, H.; PINHEIRO, F.; CLARENCE J.PETERS, C. J. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin embedded human liver by immunohistochemical analysis. **Am J Trop Med Hyg**. 45:408-17. 1991.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**. 19–28. 2003.

HUNSPERGER, E. A.; YOKSAN, S.; BUCHY, P.; NGUYEN, V. C.; SEKARAN, S. D.; ENRIA, D. A. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. **Emerg Infect Dis**. 15:436-40. 2009.

IGARASHI, A. Isolation of Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **J Gen Virol**. 40:530-44. 1978.

IOC/FIOCRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ.

Disponível em:

<<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>> Acesso em: 02/04/2015.

IOC/FIOCRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ.

Disponível em:

<<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>> Acesso em: 02/04/2015.

JESSIE, K.; FONG, M. Y.; DEVI, S.; LAM, S. K.; WONG, K. T. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**. 189:1411–8. 2004.

KATZELNICK, L. C.; FONVILLE, J. M.; GROMOWSKI, G. D.; BUSTOS ARRIAGA, J.; GREEN, A.; JAMES, S. L.; LAU, L.; MONTOYA, M.; WANG, C.; VANBLARGAN, L. A.; RUSSELL, C. A.; THU, H. M.; PIERSON, T. C.; BUCHY, P.; AASKOV, J. G.; MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; VASILAKIS, N.; GIBBONS, R. V.; TESH, R. B.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A.; DURBIN, A.; SIMMONS, C. P.; HOLMES, E. C.; HARRIS, E.; WHITEHEAD, S. S.; SMITH, D. J. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. **Science**. 18;349(6254):1338-43. 2015.



KOURI, G. P.; GUZMAN, M. G.; BRAVO, J. R.; TRIANA, C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bull World Health Organ.** 67:375—80. 1989.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORNDAM, V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v. 30, p. 545-551. 1992.

LIMA, M. R. Q.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; LIMONTA, D.; SANTOS, F. B. A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. **PLoS Negl Trop Dis.** 5(5): e1147. 2011.

LIMA, F. R.; CRODA, M. G.; MUNIZ, D. A.; GOMES, I. T.; SOARES, K. R.; CARDOSO, M. R., *et al.* Evaluation of the traditional and revised world health organization classifications of dengue cases in Brazil. **Clinics.** 68(10):1299-1304. 2013.

LIMONTA, D.; CAPÓ, V.; TORRES, G.; PÉREZ, A. B.; GUZMÁN, M. G. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. **J Clin Virol.** 40(1): 50–4. 2007.

LIN, Y. L.; LIU, C. C.; LEI, H. Y.; YEH, T. M.; LIN, Y. S.; CHEN, R. M.; LIU, H. S. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. **J. Med. Virol.** 60, 425–431. 2000.

LUM, L. C.; LAM, S. K.; CHOY, Y. S.; GEORGE, R.; HARUN, F. Dengue encephalitis - a true entity? **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 54, 256–259. 1996.

MAROUN, S. L.; MARLIERE, R. C.; BARCELLUS, R. C.; BARBOSA, C. N.; RAMOS, J. R.; MOREIRA, M. E. Case report: vertical dengue infection. **J Pediatr.** 84:556-559. 2008.

MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; SCOTT, T. W.; ZOU, C.; PIGOTT, D. M.; DUDA, K. A.; BHATT, S.; KATZELNICK, L.; HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; SIMMONS, C. P.; HAY, S. I. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology.** Vol. 22, No. 3. 2014.

MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; PIGOTT, D. M.; GOLDING, N.; KRAEMER, M. U.; SCOTT, T. W.; WINT, G. R.; SMITH, D. L.; HAY, S. I. The many projected futures of dengue. **Nat Rev Microbiol.** 13: 230-239. 2015.

MIAGOSTOVICH, M. P.; RAMOS, R. G.; NICOL, A. F.; NOGUEIRA, R. M.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V.; MARCHEVSKY, R. S.; MESQUITA, R. P.; SCHATZMAYR, H. G. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin. Neuropathol.** 16, 204–208. 1997.

MILLER, S.; KASTNER, S.; KRIJNSE-LOCKER, J.; BÜHLER, S.; BARTENSCHLAGER, R. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. **The Journal of Biological Chemistry.** Vol. 282, no. 12, pp. 8873–8882. 2007.

MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91, 2395–2400. 1994.

MUKHERJEE, S.; SIROHI, D.; DOWD, K. A.; CHEN, Z.; DIAMOND, M. S.; KUHN, R. J.; PIERSON, T. C. Enhancing dengue virus maturation using a stable furin over-expressing cell line. **Virology.** 497. 33–40. 2016.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R.; M. RICE, C. M. Genetic Analysis of the Yellow Fever Virus NS1 Protein: Identification of a Temperature-Sensitive Mutation Which Blocks RNA Accumulation. **Journal of Virology.** p. 291–298. Jan, 1997.

NARVAEZ, F.; GUTIERREZ, G.; PEREZ, M. A.; ELIZONDO, D.; NUÑEZ, A.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. **PLoS Negl Trop Dis.** 5(11). 2011.

NUNES, P. C. G.; PAES, M. V.; OLIVEIRA, C. A. B.; SOARES, A. C. G.; FILIPPIS, A. M. B.; LIMA, M. R. Q.; ALVES, A. M. B.; SILVA, J. F. A.; COELHO, J. M. C. O.; RODRIGUES, F. C. C.; NOGUEIRA, R. M. R.; SANTOS, F. B. Detection of dengue NS1

and NS3 proteins in placenta and umbilical cord in fetal and maternal death. **J Med Virol.** Aug;88(8):1448-52. 2016.

NOGUEIRA, R. M. R.; ARAUJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. **Rev Panam Salud Publica.** 22(5):358–63. 2007.

NGUYEN, K. H.; JIMENEZ-SOTO, E.; DAYAL, P.; HODGE, A. Disparities in child mortality trends: what is the evidence from disadvantaged states in India? the case of Orissa and Madhya Pradesh. **Int J Equity Health.** 12:45. 2003.

ONG, A.; SANDAR, M.; CHEN, M. I.; SIN, L. Y. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. **Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases.** 2006.

PAIXÃO, E. S.; COSTA, M. C. N.; RODRIGUES, L. C.; RASELLA, D.; CARDIM, L. L.; BRASILEIRO, A. C.; TEIXEIRA, M. G. L. C. Trends and factors associated with dengue mortality and fatality in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 48(4):399-405. 2015.

PANG, J.; SALIM, A.; LEE, V. J.; HIBBERD, M. L.; CHIA, K. S.; LEO, Y. S.; LYE, D. C. Diabetes with Hypertension as Risk Factors for Adult Dengue Hemorrhagic Fever in a Predominantly Dengue Serotype 2 Epidemic: A Case Control Study. **PLoS Negl Trop Dis.** 6 (5):e1641. 2012.

PATEL, P.; LANDT, O.; KAISER, M.; FAYE, O.; KOPPE, T.; LASS, U. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology.** 10:1-11. 2013.

PEELING, R. W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J. L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M. J.; DEVI, S.; ENRIA, D. A.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; HUNSPERGER, E.; KLIKS, S.; MARGOLIS, H. S.; NATHANSON, C. M.; NGUYEN, V.

C.; RIZZO, N.; VÁZQUEZ, S.; YOKSAN, S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Review Microbiology**. December 2010.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. **World Health Stat Q**. 50(3-4):161-9. 1997.

PINTO JUNIOR, V. L.; LUZ, K.; PARREIRA, R.; FERRINHO, P. Vírus Zika: Revisão para Clínicos. **Acta Med Port**. 28:760-765. 2015.

ROTH, A.; MERCIER, A.; LEPERS, C.; HOY, D.; DUITUTURAGA, S.; BENYON, E.; GUILLAUMOT, L.; SOUARÈS, Y. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Euro Surveill**. 19(41). 2014.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**. 11:642-50. 2004.

SOUZA, R. V.; CUNHA, R. V.; MIAGOSTOVICH, M. P.; TIMBÓ, M. J.; MONTENEGRO, F.; PESSOA, E. T. F. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G. An outbreak of dengue in the State of Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. V.90, n.3 Rio de Janeiro. 1995.

TELES, F. R.; PRAZERES, D. M.; LIMA-FILHO, J. L. Trends in dengue diagnosis. **Rev Med Virol**. 15:287-302. 2005.

THEIN, T-L.; LEO, Y-S.; FISHER, D. A.; LOW, J. G.; OH, H. M. L.; GAN, V. C.; WONG, J. G. X.; LYE, D. C. Risk Factors for Fatality among Confirmed Adult Dengue Inpatients in Singapore: A Matched Case-Control Study. **PLoS ONE**. 8(11). 2013.

TOMASHEK, K. M.; GREGORY, C. J.; RIVERA SANCHEZ, A.; BARTEK, M. A.; GARCIA RIVERA, E. J.; HUNSPERGER, E.; MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; SUN, W. Dengue

Deaths in Puerto Rico: Lessons Learned from the 2007 Epidemic. **PLoS Negl Trop Dis.** 6(4). 2012.

VASCONCELOS, P. F. C.; MENEZES, D. B.; MELO, L. P.; PESSOA, E. T. F. P.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, E. S. T.; TIMBÓ, M. J.; COELHO, I. C. B.; MONTENEGRO, F.; ROSA, J. F. S. T.; ANDRADE, F. M. O.; ROSA, A. P. A. T. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. **Rev. Inst. Med. Trop.** Vol. 37 no. 3 São Paulo. 1995.

VAUGHN, D. W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T. P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A.; NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J Infect Dis.** 181:2—9. 2000.

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A. D. T.; WATOWICH, S. J.; GUBLER, D. J.; WEAVER, S. C. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. **Journal of Virology.** p. 3227–3234 Vol. 74, No. 7. 2000.

WELSCH, S.; MILLER, S.; ROMERO-BREY, I.; MERZ, A.; BLECK, C. K. E.; WALTHER, P.; FULLER, S. D.; ANTONY, C.; KRIJNSE-LOCKER, J.; BARTENSCHLAGER, R. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. **Cell Host Microbe.** 5,365–375. 2009.

WHITE, N. J. Variation in virulence of dengue virus. **Lancet.** 354:1401—2. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue hemorrhagic fever, diagnosis, treatment and control. Geneva, Switzerland. **World Health Organization.** 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva. **World Health Organization.** 2009.

WU, S. H.; WOO, J.; ZHANG, X-H. Worldwide socioeconomic status and stroke mortality: an ecological study. **Int J Equity Health**. 12:42. 2013.

ZANOTTO, P. M. A.; GOULD, E. A.; GAO, G. F.; HARVEY, P. H.; EDWARD C. HOLMES, E. C. Evolution Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Vol. 93, pp. 548-553. 1996.

ZHANG, B.; SALIEB-BEUGELAAR, G. B.; NIGO, M. M.; WEIDMANN, M.; HUNZIKER, P. Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. **Nanomedicine**. Oct;11(7):1745-61. 2015.







<b>56</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>57</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>58</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>59</b>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>60</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>61</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>62</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>63</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>64</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>65</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>66</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>67</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>68</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>69</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>70</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>71</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>72</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>73</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>74</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>75</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>76</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>77</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>78</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>79</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>80</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>81</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>82</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>83</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>84</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>85</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>86</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

<b>87</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>88</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>89</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>90</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>91</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>92</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>93</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>94</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>95</b>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>96</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>97</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>98</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>99</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>100</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>101</b>	-	-	-	-	-	N.R.	-	-	-	-
<b>102</b>	-	-	-	-	-	N.R.	-	-	-	-
<b>103</b>	-	-	-	-	-	N.R.	-	-	-	-
<b>104</b>	-	-	-	-	-	N.R.	-	-	-	-
<b>105</b>	+	+	+	+	+	N.R.	-	-	+	+
<b>106</b>	-	-	-	-	-	N.R.	-	-	-	-
<b>107</b>	-	-	-	-	-	N.R.	-	-	-	-
<b>108</b>	-	-	-	-	-	N.R.	-	-	-	-
<b>109</b>	-	-	-	-	-	N.R.	-	-	-	-

Legenda: N.R. = Não Realizado; - = Negativo; + = Positivo; B = Baço; Cér. = Cérebro; Cor. = Coração; F = Fígado; P = Pulmão.

## ANEXO – APROVAÇÃO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/PROPESQ



**PARE CER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO DE DENGUE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES QUE EVOLUÍRAM PARA ÓBITO

Pesquisador: CÁSSIA RODRIGUES ROQUE

Área Temática:

Versão: 1

CAA E: 44635915.1.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Secretaria de Saúde do Estado do Ceará - SES/CE

**DADOS DO PARE CER**

Número do Pare cer: 1.086.121

Data da Relatoria: 28/05/2015

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo com vistas à análise da validação e comparação do desempenho dos vários testes para diagnóstico da dengue com os diversos tipos de amostras é fundamental para sua implementação nos diversos cenários clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Como existem muitos testes disponíveis no mercado e que podem ser realizados em diferentes materiais de pacientes faz-se necessário a realização desse estudo para avaliar o desempenho de testes em amostras biológicas de pacientes que foram a óbitos por dengue, já que esses instrumentos são essenciais na confirmação da causa da morte do paciente e há poucos estudos no Brasil que avaliem esse

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a sensibilidade de testes laboratoriais para diagnóstico de dengue em variadas amostras biológicas de pacientes que evoluíram para óbito.

**Objetivo Secundário:**

Identificar em quais amostras biológicas de pacientes que evoluíram para óbito a sensibilidade diagnóstica é maior. Identificar quais testes

Endereço : Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275  
UF: CE Município: FORTALEZA  
Telefone: (85) 3366-8344 Fax: (85) 3223-2503 E-mail: comep@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/PROPESQ



Continuação do Parecer nº 008.121

laboratoriais são mais sensíveis para diagnóstico de dengue em pacientes que evoluíram para óbito. Avaliar a sensibilidade entre kits diagnósticos de diferentes empresas e que são utilizados para a detecção do mesmo componente viral.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

No presente estudo serão utilizadas somente as amostras de pacientes que evoluíram para óbito por suspeita de infecção por dengue recebidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN/CE), para esclarecimento diagnóstico. Não entraremos em contato com os pacientes, portanto os mesmos não estarão sujeitos a riscos.

**Benefícios:**

Acrescentar à literatura informações sobre o desempenho de exames laboratoriais para diagnóstico de dengue em várias amostras de pacientes que foram a óbito, tendo em vista que poucos trabalhos são realizados nessa finalidade.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa importante para aprimoramento dos métodos de diagnóstico da dengue, em função da extrema relevância epidemiológica dessa doença.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Dentro das normas

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275  
 UF: CE Município: FORTALEZA  
 Telefone: (85) 3366-8344 Fax: (85) 3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/PROPESQ



Continuação de Pesquisa: 1.026.121

FORTALEZA, 29 de Maio de 2015

---

Assinado por:  
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA  
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2503 E-mail: [comepe@ufc.br](mailto:comepe@ufc.br)