



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

**AVALIAÇÃO CLÍNICO E LABORATORIAL DOS PACIENTES COM SUSPEITA DE
DENGUE ATENDIDOS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO CEARÁ.**

DYANA ALVES DA SILVA

FORTALEZA – CE

2014

DYANA ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO CLÍNICO E LABORATORIAL DOS PACIENTES COM SUSPEITA DE
DENGUE ATENDIDOS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO CEARÁ.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Danielle Malta Lima

Co-orientador: Prof^a Dr. Jeová Keny Baima Colares

FORTALEZA – CE

2014

DYANA ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO CLÍNICO E LABORATORIAL DOS PACIENTES COM SUSPEITA DE
DENGUE ATENDIDOS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO CEARÁ.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia.

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dr^a. Maria Izabel Florindo
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof^o Dr^a. Márcia Maria Mendes Marques
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof^a. Dr^a. Danielle Malta Lima (Orientadora)
Universidade de Fortaleza - Unifor

*“À Deus que guiou meus passos
iluminando meu caminho e trazendo
sabedoria para que eu pudesse
chegar até aqui.”*

*“À minha mãe que foi
o verdadeiro anjo que Deus colocou
em meu caminho para trazer luz e
sabedoria durante essa caminhada.”*

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre esteve comigo me ofertando sabedoria e a oportunidade de realizar todos os sonhos que meu coração ousou arriscar sonhar e garantiu força para concretiza-los

À minha orientadora Dra. Danielle Malta que além de professora, orientadora, se tornou uma amiga que tanto me engrandeceu com sua sabedoria e paciência. Obrigada por todos os conselhos, orientações que vão além da vida profissional.

Aos meus pais: minha Mãe Linzomar Alves da Silva, um exemplo de mulher, com muita garra, me ensinou a seguir em frente e jamais desistir dos meus sonhos. Meu pai João Lucas da Silva Filho, que não está mais entre nós, mas que plantou a semente do conhecimento em meu coração que me fez seguir a carreira acadêmica. O exemplo e a força de vocês foram tudo para chegar até aqui.

À Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu que me acolheu como aluna em seu laboratório e tanto me ensinou, abrindo portas e trazendo novos conhecimentos para minha vida. Obrigada por ser essa professora ímpar e muito humana!

À Dra. Maria Izabel Florindo Guedes e Dra. Márcia Maria Marques Mendes que me receberam em seu laboratório e tanto contribuíram para meu aprendizado e conhecimento.

Ao Dr. Keny, meu co-orientador que sempre esteve presente, auxiliando durante todo o processo de pesquisa no Hospital São José e enriquecendo com todo seu conhecimento e paciência.

Às minhas grandes amigas e companheiras de profissão Nayara, Jucilene e Prof. Milena que tanto me apoiaram e me deram forças nos momentos difíceis

À Raissa e Claudenia minhas colegas de laboratório e companheiras de pesquisa que tanto me ensinaram e ajudaram durante todo mestrado.

À toda equipe do Hospital São José, que com seu apoio possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao Departamento de patologia e Laboratório de parasitologia, por ter me recebido e apoiado, trazendo tanto conhecimento para minha vida profissional.

Ao CNPQ que possibilitou esta pesquisa através de seu financiamento

RESUMO

A dengue é considerada a mais importante arbovirose e possui um amplo espectro clínico, podendo apresentar desde uma forma assintomática ou como febre indiferenciada, podendo evoluir para as formas graves como a febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue. A OMS sugeriu uma nova classificação clínica, pois os critérios de diagnósticos eram muito rígidos e demasiadamente baseados em resultados de laboratório o que dificultava o manejo clínico, sendo que as intervenções médicas são imprescindíveis para uma conduta mais adequada a cada caso. O presente estudo teve como objetivo, identificar as alterações laboratoriais através de exames específicos e inespecíficos em pacientes com suspeita clínica de dengue atendidos em um hospital de referência no ano de 2012. O diagnóstico foi baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Dentre os exames laboratoriais utilizaram-se os exames inespecíficos: hemograma, coagulograma, prova de função hepática e dosagem de albumina sérica e possuiu sua confirmação realizada por exames específicos, através de métodos moleculares, isolamento viral e métodos sorológicos que demonstram a presença de anticorpos da classe IgM, a detecção da glicoproteína não estrutural NS1 que pôde ser um marcador utilizada como um marcador durante a fase aguda da doença assim como os imunoenaios ELISA. No presente estudo foram recrutados 95 pacientes e avaliados quanto as características clínicas e individuais dos casos com suspeita de dengue, Dos 95 pacientes avaliados, 65 (68,48%) apresentaram dengue clássica segundo a classificação tradicional, porém ao aplicar a nova classificação sugerida pela OMS observamos uma modificação no perfil com 53 (55,78%) pacientes com dengue com sinais de alarme. Nos testes inespecíficos foi observado uma constante alteração nos índices hematimétricos como plaquetas e hematócritos, dentre os testes específicos foi observado uma maior positividade do ELISA – IgM anti-dengue. A dengue é uma doença endêmica infecciosa febril de difícil diagnóstico diferencial. Sendo assim, é necessário investir em uma análise mais profunda dos dados clínicos e epidemiológicos para chegarmos a um diagnóstico mais preciso e em um tratamento precoce e adequado a cada paciente.

Palavras chaves: Dengue, diagnóstico laboratorial, diagnóstico clínico

ABSTRACT

Dengue is considered the most important arboviral disease and has a wide clinical spectrum, can present asymptotically or as undifferentiated fever and may progress to severe forms such as dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. WHO suggested a new classification, because the diagnostic criteria were very strict and too based on laboratory results which hampered clinical management, and medical interventions are essential to conduct most appropriate to each case. The present study aimed to: identify laboratory abnormalities through specific and non specific in patients with suspected dengue fever treated at a referral hospital in the year 2012. The diagnosis was based on clinical, epidemiological and laboratory criteria. Among the laboratory tests used, the non specific tests: blood count, coagulation profile, liver function test, serum albumin and owned confirmation performed by specific tests, using molecular methods, virus isolation and serological methods to demonstrate the presence of antibodies IgM detecting the NS1 nonstructural glycoprotein, might be used as a marker during the acute phase of the disease as well as ELISA immunoassays, of the 95 patients, 65 (68.48 %) had dengue fever according to the traditional classification, but to apply the new classification proposed by the WHO noted a change in profile with 53 (55 , 78 %) patients with dengue with warning signs. Non specific tests in a constant change was observed in platelet and RBC indices as hematocrit, among the specific tests we observed a higher positivity of ELISA-IgM anti-dengue. Dengue fever is a difficult endemic infectious disease diagnosis. Therefore, it is necessary to invest in a deeper analysis of clinical and epidemiological data to arrive at a more accurate diagnosis in an early and proper treatment to each patient.

Keywords: Dengue , laboratory diagnosis , clinical diagnosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Área de risco de dengue em nível global em 2009 -----	15
Figura 02 – Média anual de casos de dengue clássica e dengue hemorrágica em países com epidemia de dengue no período de 1955 – 2007-----	16
Figura 03: Incidência de dengue no Ceará DE 1986 à 2012 -----	19
Figura 04: A) Representação morfológica dos vírus dengue. Através de proteínas do capsídio o segmento genômico de RNA é complexado, envelopado e constituindo o nucleocapsídeo, que contém glicoproteínas virais, E, prM e M B) Representação da partícula de um vírus dengue determinado pelo crioeletron-microscopia; C) Representação da partícula de um vírus dengue imaturo determinado pelo crioeletron-microscopia.-----	21
Figura 05: Transmissão do vírus dengue pelo <i>Aedes aegypti</i> .-----	23
Figura 06: Esquematização da proteína não estrutural NS1-----	30
Figura 07: Esquematização da técnica: OneStep RT-PCR-----	37
Figura08: Distribuição por faixa etária e sexo dos pacientes estudados (n=95) -----	39
Figura 09: Teste Imunocromatográfico NS1-----	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Prevalência dos sintomas relatados pelos pacientes do estudo -----
-----40
- Tabela02:** Distribuição dos pacientes segundo sexo, através da antiga
classificação clínica da dengue. ----- 40
- Tabela 03:** Distribuição dos pacientes segundo sexo, através da nova
classificação clínica da Dengue pela OMS. ----- 41
- Tabela 04:** Distribuição dos resultados dos exames inespecíficos realizados na
1º coleta dos pacientes estudados.----- 41
- Tabela 05:** Distribuição dos resultados dos exames inespecíficos, realizado na
2º coleta dos pacientes estudados. ----- 42
- Tabela 06:** Distribuição dos resultados dos testes específicos para dengue
realizado nos pacientes do estudo. ----- 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

c-DNA – DNA complementar

DC – Dengue Clássica

DCC – Dengue com complicação

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

GAMA – GT – Gama –Glutamil transferase

HSJ – Hospital São José

IgG – Imunoglobulina de classe G

IgM – Imunoglobulina de classe M

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 - Interleucina 2

IL-6 - Interleucina 6

IL- β – Interleucina β

INF- α – Interferon α

INF- γ – Interferon γ

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PAF – Fator de agregação plaquetária

PCR – Reação em cadeia polimerase

prM – Proteína M

RNA - Ácido Ribonucleico

RT_PCR – Reação em cadeia polimerase – transcriptase reversa

SCD – Síndrome do Choque da Dengue

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Histórico	14
1.2. Epidemiologia	15
1.2.1. Dengue nas Américas	15
1.2.2 Dengue no Brasil	16
1.2.3 Dengue no Ceará	17
1.3. Vírus	20
1.4. Patogenia	23
1.5 Aspectos clínicos	25
1.6. Diagnóstico laboratorial	28
1.6.1. Exames específicos	28
1.6.2 Exames inespecíficos	30
1.7. Prevenção	31
2. Objetivos	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. Metodologia	34
3.1. Estudo	34
3.2. Pacientes	34
3.2.1 Critérios de inclusão	34
3.2.2 Critérios de exclusão	34
3.3 Definição de caso	35
3.4 Coleta e processamento do material	35
3.5 Diagnóstico	36
3.5.1 Diagnóstico sorológico para dengue	36
3.5.2 Diagnóstico molecular	36
3.5.2.1 Extração do RNA e RT-PCR	36
3.5.3 Análise do hemograma e bioquímica	37
3.6 Análise estatística	38
3.7 Aspectos éticos	39
4. Resultados	39
5. Discussão	44

6. Conclusão	48
7. Referências bibliográficas	49
8. Apêndice.....	61
Apêndice I: Questionário epidemiológico	62
Apêndice II: Termo de consentimento livre e esclarecido	63

1. INTRODUÇÃO

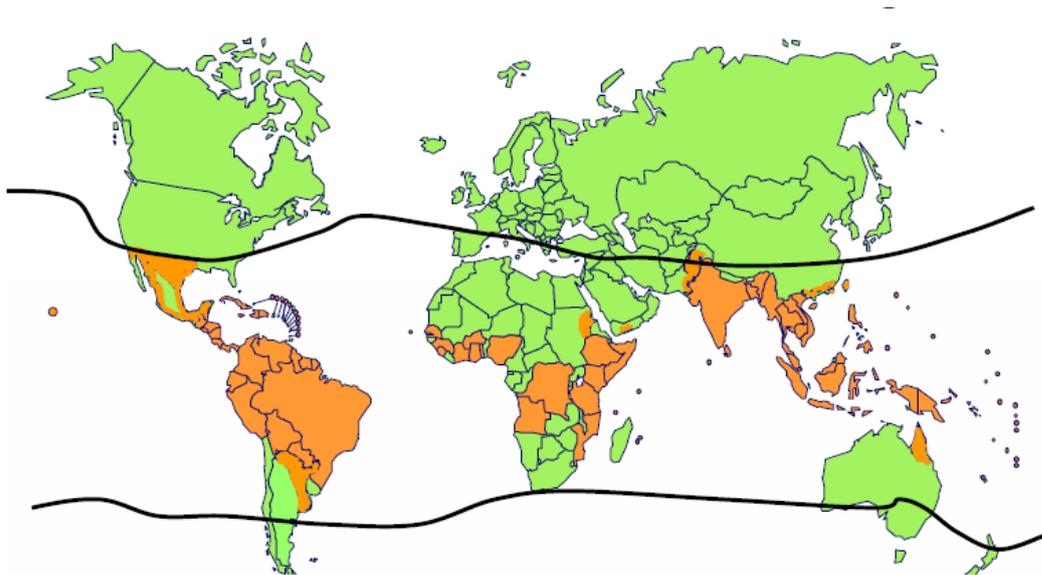
1.1 Histórico

Os primeiros relatos de possíveis epidemias de dengue foram descritos em 1779 nos continentes da Ásia, África e América do Norte. Sendo que, o primeiro registro científico ocorreu em Cuba em 1782 (HENCHAL, 1990, GUBLER,1997; GUBLER,1998). O termo dengue foi designado, durante o século XIX, através do termo utilizado pelos africanos: “ka dinga pepo”, em que os espanhóis adaptaram para expressões como: “el dengue” e “quebranta ossos”, “break-bone-fever” e “dandy fever” (REGO, 1872; RIGAU-PEREZ, 1998; THOMAS, 1880).

O perfil relacionado a este tipo de doença começou a ser caracterizado no período de 1780-1940, porém foi no cenário de um desequilíbrio ambiental ocasionado pela Segunda Guerra Mundial e pós-guerra, que o Sudeste da Ásia e do Pacífico demonstrou um aumento da transmissão de doenças transmitidas por mosquitos, proporcionando o início de uma pandemia global de dengue, que ao ser introduzido novos sorotipos ocasionou o aparecimento da Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), em que sua primeira epidemia ocorreu em Manila, Filipinas, em 1953-1954 (GUBLER, 1998; SCHNEIDER; DROLL, 2001 TORRES, 2005,).

Em vinte anos o vírus dengue se disseminou no Sudoeste da Ásia e na década de 70, ocasionando um dos mais importantes motivos de internação e óbito entre crianças do local, além do vírus ser reintroduzido nas ilhas do Pacífico e Américas. Durante 1980 e 1990 a transmissão se intensificou acarretando uma ampliação tanto de mosquitos vetores como de vírus, portanto, ocasionando uma distribuição global da FHD (Figura 01) (GUBLER, 1998; SCHNEIDER; DROLL, 2001)

Figura 1. Mapa de risco de dengue em 2009



Fonte: OPS/OMS

1.2 Epidemiologia

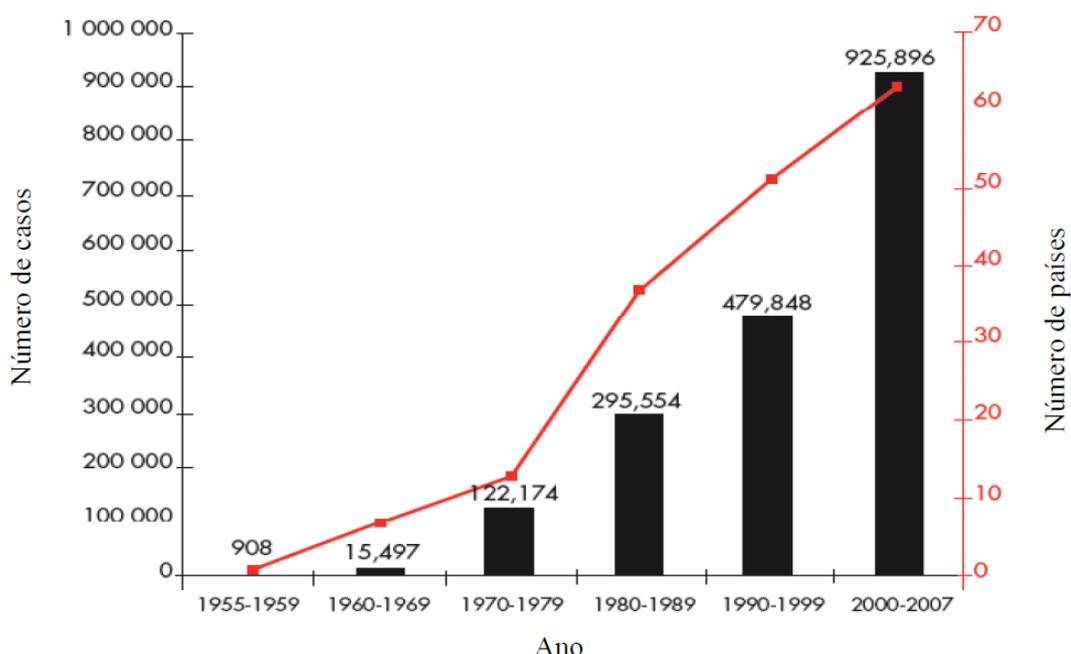
1.2.1 Dengue nas Américas

Desde o século passado foram relatadas epidemias nas Américas com características de doença causada pelo vírus dengue. O isolamento do sorotipo DEN-01 aconteceu durante os anos 40, Kimura e Hotta a denominaram de Mochizuki, em 1945 Sabin e Shclesinger a denominaram de Havaí somente com a descoberta do sorotipo DEN-02 a cepa foi denominada sorotipo DEN-01. Em 1953 o sorotipo DEN-2 foi detectado em Trinidad e somente em 1963 foi isolado o sorotipo DEN-3 em Porto Rico, tornando-os agentes das epidemias das décadas de 60 e 70 nas Américas (MARTINEZ-TORRES, 1990; OPAS, 1989; TEIXEIRA, 2008; OMS, 2012).

Até 1980, mais de 700.000 casos foram notificados na América, porém, foi na Jamaica, no ano de 1977, que a dengue se disseminou para outros países através do sorotipo DEN-1 (OPAS, 1989, 1997; OMS, 2009). Ainda na década de 80 o sorotipo DEN-4 foi isolado, acarretando epidemias na América Central, América do Sul e Caribe. A primeira epidemia de DHF na América ocorreu em Cuba através do vírus DEN-2, e ainda foram registradas epidemias de dengue no Brasil, Paraguai, Peru e Equador (KOURI et al., 1986; OPAS, 1989; OPAS, 1997).

Houve um agravamento no quadro epidemiológico de dengue nos anos 90, sendo em 1994 o sorotipo DEN-3 reintroduzido na América, especificadamente na Nicarágua e no Panamá. (Ministério da Saúde, 1995). Mais de 30 países tiveram notificações de casos entre 2001 à 2007, relatando um total de 4.332.731 casos e desses 106.037 de FHD, com 1.299 números óbitos. Porém, foi em 2002 que ocorreu o maior surto nas Américas com mais de um milhão de casos relatados. Foi neste período que os quatro sorotipos voltaram a circular, sendo identificados concomitantemente nas regiões de: Venezuela, Barbados, Colômbia, Peru, República Dominicana, México, El Salvador, Porto Rico, Guatemala, Guiana Francesa.(OMS, 2009). (Figura02)

Figura 02 – Média anual de casos de dengue clássica e dengue hemorrágica em países com epidemia de dengue no período de 1955 - 2007



Fonte: Organização Mundial de saúde 2009

1.2.2 Dengue no Brasil

A Febre da dengue está disseminada em 3.794 municípios brasileiros, o aumento e a disseminação da doença está relacionado ao fato de termos diferentes sorotipos do vírus. O primeiro relato de epidemia ocorreu entre 1846 e início de 1848 na cidade do Rio de Janeiro e também foram descritos casos

da doença durante esse período nos Estados da região sudeste: Minas Gerais e São Paulo e nos Estados do Nordeste: Pernambuco e Bahia. (SCHATZMAYR, 1986; DONÁLÍSIO, 1999; Nogueira 2001).

Em 1981, no Estado de Roraima, mas precisamente na cidade de Boa Vista foi confirmado laboratorialmente e isolado pela primeira vez os sorotipos específicos DEN-4 e DEN-1 no Brasil durante uma epidemia de dengue (CÂMARA et al., 2007; SCHNEIDER; DROLL, 2001). Porém, foi apenas entre 1986 e 1987 que o sorotipo DEN-1 chegou ao Sudeste do país, na cidade do Rio de Janeiro e Minas Gerais e na região Nordeste nos seguintes Estados: Ceará, Bahia, Alagoas, Pernambuco. Entre 1990 e 1991 tivemos a introdução do sorotipo DEN-2, espalhando-se pelo país em 2001, Sendo que o sorotipo DEN-3 teve sua entrada no país em 2001 e 2002 (NOGUEIRA, 2001; MARTINEZ, 2005; OMS, 2005; NOGUEIRA; ARAUJO; SCHATZMAYR, 2007; BARRETO; TEIXEIRA, 2008; PESSANHA, 2010).

No ano de 2012 tivemos a reintrodução do sorotipo DEN-4 fazendo com que os 4 sorotipos circulem no país (MINISTERIO DA SAÚDE, 2012), contribuindo para o aumento na evolução dos casos mais complexos e graves da dengue, assim como a FHD e a síndrome do choque da dengue. Em regiões que se apresentaram surtos sequenciais que foram confirmados por, pelo menos, dois sorotipos diferentes um fator determinante a ser levado em consideração é a virulência da cepa epidêmica que muitas vezes indica uma evolução para forma mais grave da doença (STREATFIELD,1993; HALSTEAD,1990; MORENS, 1991;ROSEN,1989).

1.2.3 Dengue no Ceará

Em agosto de 1986, ocorreu a introdução do sorotipo DEN-1, onde foram relatados os casos iniciais de dengue no Ceará, porém, os primeiros casos de FHD aconteceram em 1994, tendo a entrada do sorotipo DEN-2 responsável como grande causa da FHD (VASCONCELOS, 1998). Ocasionalmente 12 óbitos e uma taxa de letalidade de 48%, sendo uma taxa bastante elevada para a ocasião. Porém isso se deu devido a uma subnotificação dos casos e pela insuficiência de dados para uma classificação das doenças de acordo com os critérios exigidos pela OMS. Sobre os casos

hemorrágicos merecem destaques os anos de 2003, 2007 e 2008 que tiveram 291, 300 e 443 casos, respectivamente (CEARÁ, 2009, 2010). O ano de 2008 chamou a atenção pelo maior número de casos de FHD notificados e o ano de 1994 pelo maior número de casos confirmados de dengue clássica. (CEARÁ, 2007, 2009, 2010).

Um aumento significativo dos casos de dengue confirmados a cada ano acontecem principalmente entre os meses de maio a Julho. Em 2000, houve o registro de um caso de FHD para 3.411 casos de dengue clássica, em 2001 a relação era de 1 caso de FHD para 440 casos. Contudo, em março de 2002, ocorreu a identificação do sorotipo DEN-3 no Ceará, dispondo assim da presença concomitante dos três sorotipos e um aumento das cidades atingidas pelo *Aedes aegypti*. Devido a grande parte da população estar está sensibilizada aos sorotipos DEN-1 e DEN-2, ocasionou um aumento na incidência da doença, então neste ano a relação DC/FHD passou de 1:232 para 1:82 no ano de 2003 (CEARÁ, 2009, 2010).

No estado está ocorrendo um aumento anual do número de casos entre crianças e adolescentes, a média de idade entre os pacientes era de 38 anos em 2001, e em 2008 essa média foi de 18 anos de idade. Foram registrados em 34 municípios do Estado, mais de 80% dos casos de dengue clássica. Em 33 municípios a dengue teve uma incidência acima de 300/100.000 habitantes, outros 34 municípios tiveram uma incidência entre 101 e 300/100.000 habitantes, Sendo que, 79 municípios com incidência entre 1 e 100/100.000 habitantes e 38 municípios com incidência inferior a 1 para cada 100.000 habitantes (CEARÁ,2009).

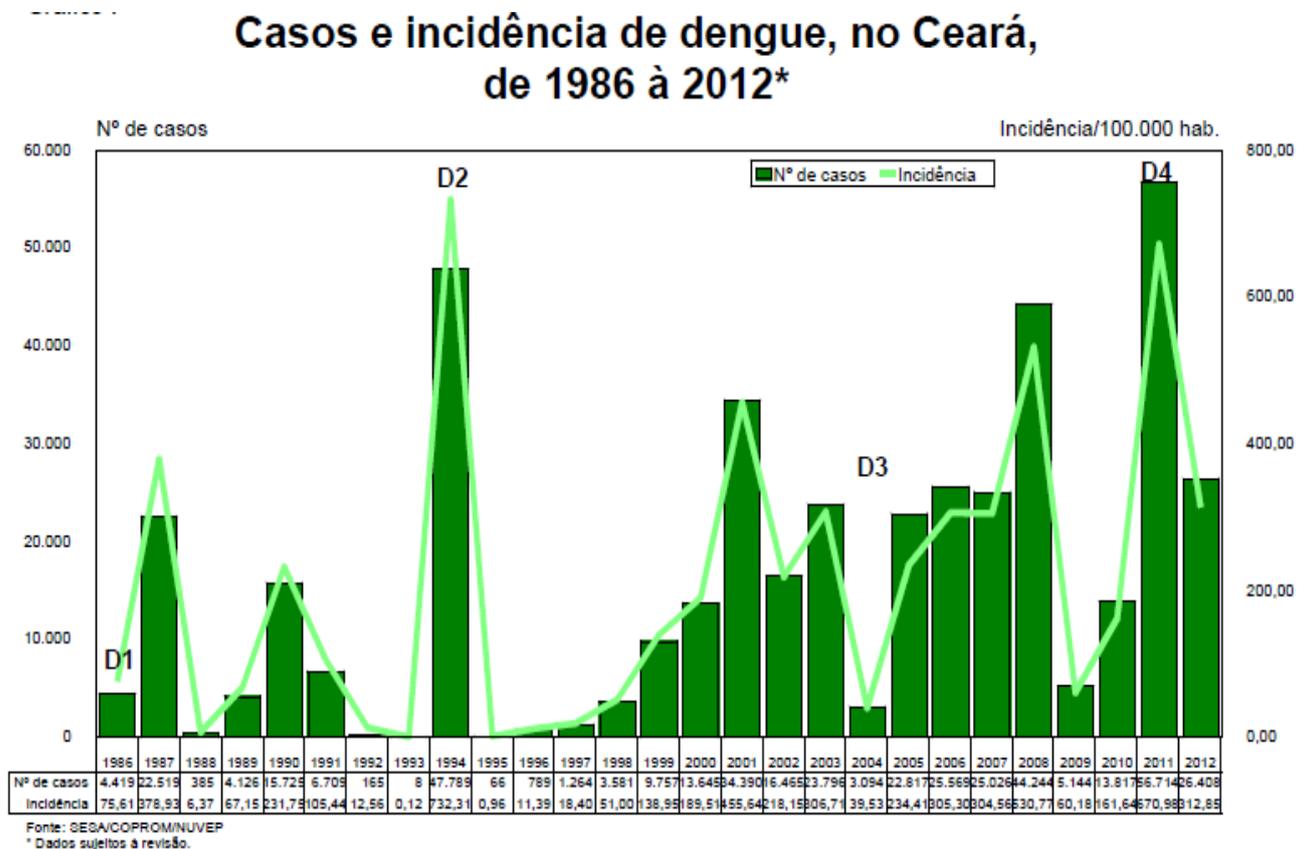
Com uma diminuição nos casos de dengue no Ceará em 2009 em relação ao ano anterior, apesar de 180 (97,8%) municípios estarem infestados pelo *Aedes aegypti* e de 112 (60,9%) municípios com a confirmação da transmissão de dengue, a letalidade pela FHD foi de 34,7% (8/23) e por dengue com complicação foi de 43,8% (28/64). Isso ocorreu devido à maior circulação do sorotipo DEN-2 e um grande número de indivíduos sensibilizados pelos outros sorotipos virais (DEN-1 e DEN-3) (CEARÁ, 2010).

Em 2002 foi isolado o sorotipo DEN-3 que prevaleceu até o ano de 2006, No ano de 2007, e principalmente 2008 voltou a circular com mais intensidade o sorotipo DEN-2, (CEARÁ, 2010). Contudo, em 2010, foram informados ao

serviço de notificação 57 municípios com 839 casos suspeitos de dengue, distribuídos em 18 Células Regionais de Saúde. Em 13 municípios foram confirmados 432 casos e 407 amostras foram negativas. Destacando-se o município de Tauá, com 319 casos, que em 2009 começou a apresentar um aumento de notificações.

Diversos fatores estão associados à ocorrência das recorrentes epidemias de dengue, dentre elas a introdução de novos sorotipos, prováveis genótipos, alterações climáticas e pluviométricas, além da precariedade nos sistemas de saneamento básico e oferta de água, também o baixo nível socioeconômico e cultural da população. O crescimento desordenado destaca-se dos municípios para região metropolitana de Fortaleza, revelando-se um espelho dos fenômenos da urbanização e industrialização no processo de desenvolvimento, que está ligado a políticas urbanas pontuais e ambientalmente excludentes (SILVA E ANGERAMI, 2008; MOURA, 2008; MAGALHÃES, 2013)

Figura 03: Incidência de dengue no Ceará de 1986 à 2012



Fonte: Ceará, 2012

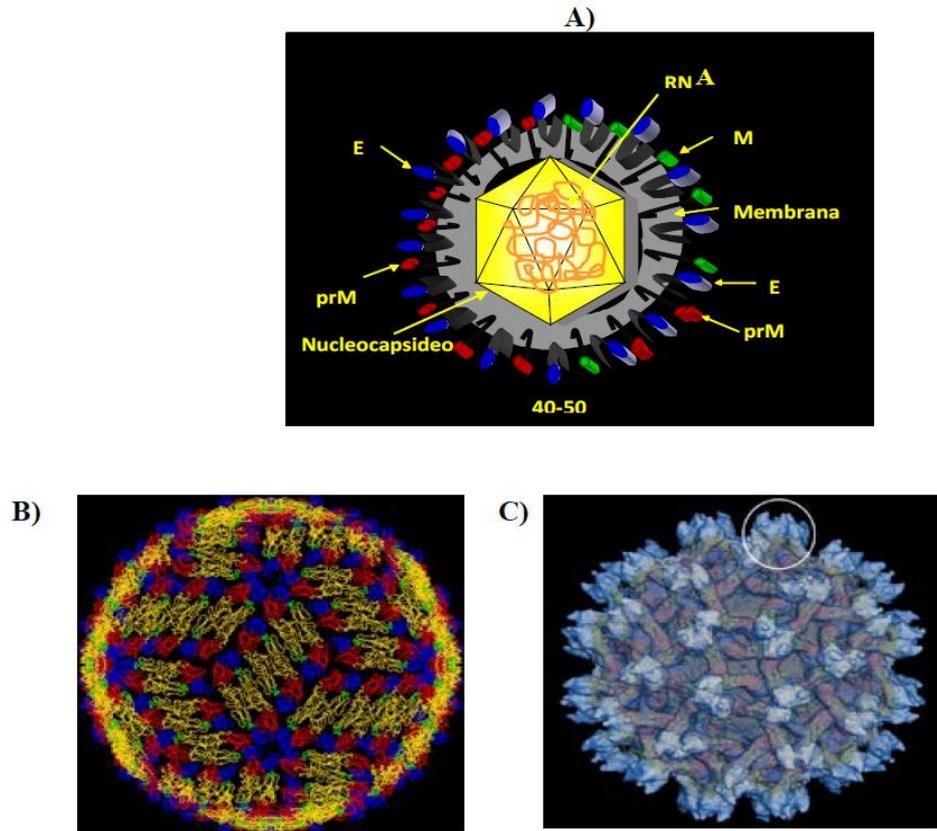
1.3- Vírus

O vírus dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e possui quatro sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). São vírus esféricos e de tamanho pequeno com aproximadamente 40 – 50 nanômetros possui um genoma de RNA de fita simples, de polaridade positiva. A sua estrutura é constituída por três proteínas estruturais, e sendo a proteína “M” ligada à membrana, e do envelope viral, a proteína “E”, proteína “C” do núcleo capsídico e o RNA genômico (ANDERSON; DOWNS; HILL, 1956; CHAMBERS et al., 1990; GUBLER, 1998; FIGUEIREDO, 1999).

Os epítomos da proteína E determinam a produção de anticorpos para o cada tipo de vírus, dentro de cada sorotipo existe uma variação genotípica, o que pode explicar o grau de virulência de cada cepa. Portanto, a proteína E é responsável por atividades biológicas do ciclo viral, desempenha também um papel fundamental para a ligação viral e interação com receptores específicos existentes na superfície da célula-alvo e montagem da partícula viral (CHAMBERS et al., 1990; GAGNON et al., 1996; GUBLER, 1998; FIGUEIREDO, 1999; UEHARA et al., 2006; LUPI; CARNEIRO; COELHO, 2007; GHOSH et al., 2008).

A proteína M tem sido caracterizada de duas maneiras: a prM, nos vírus intracelulares imaturos; e a M, encontrada nos vírus extracelulares maduros. A proteína estrutural M, com 75 aminoácidos tem como precursora a prM que é uma glicoproteína. E ao sofrer uma específica clivagem proteolítica durante a maturação viral origina a proteína M, que está envolvida na organização da estrutura viral e no aumento da efetividade do vírus (Figura 04) (CHAMBERS et al., 1990; GUBLER, 1998; DHALIA et al., 2009).

Figura 04: A) Representação morfológica dos vírus dengue. Através de proteínas do capsídico o segmento genômico de RNA é complexado, envelopado e constituindo o nucleocapsídeo, que contém glicoproteínas virais, E, prM e M **B)** Representação da partícula de um vírus dengue determinado pelo crioeletron-microscopia; **C)** Representação da partícula de um vírus dengue imaturo determinado pelo crioeletron-microscopia.



Fonte: A) HEINZ; ALLISON, 2001; B) KUHN *et al.*, 2002; C) ZHANG, 2003

O *Aedes aegypti* fêmea transmite a dengue para o homem através de uma picada contaminada por um dos quatro sorotipos do vírus. Sendo um tipo de espécie doméstica e adaptada às condições urbanas esse mosquito é o principal vetor em nosso meio. Porém, o seu contágio também pode acontecer por meio do mosquito *Aedes albopictus*, que era considerada uma espécie selvagem, que se reproduzia às margens das florestas, contudo a espécie passou a adaptar-se ao ambiente urbano que têm proporcionado meios para sua sobrevivência e assim aumentando o risco de transmissão (Martins, 2010; GOMES, 2005; PESSOA, 2013). O *A. albopictus* está introduzido no país desde 1986, tendo seu primeiro registro no estado do Rio de Janeiro, e o registro de sua expansão pelo país, apenas quatro estados brasileiros ainda não foram detectados com a sua presença: Piauí, Acre, Amapá e Sergipe (FORATTINI, 1986; BALESTRA, 2008, AGUIAR, 2008; PESSOA, 2013).

O vírus é transmitido pelo *Aedes aegypti* geralmente entre 10 a 14 dias depois de contaminar a pessoa através da sua picada. O mosquito possui manchas brancas pelo corpo e pernas, mesclando com sua cor escura, tendo

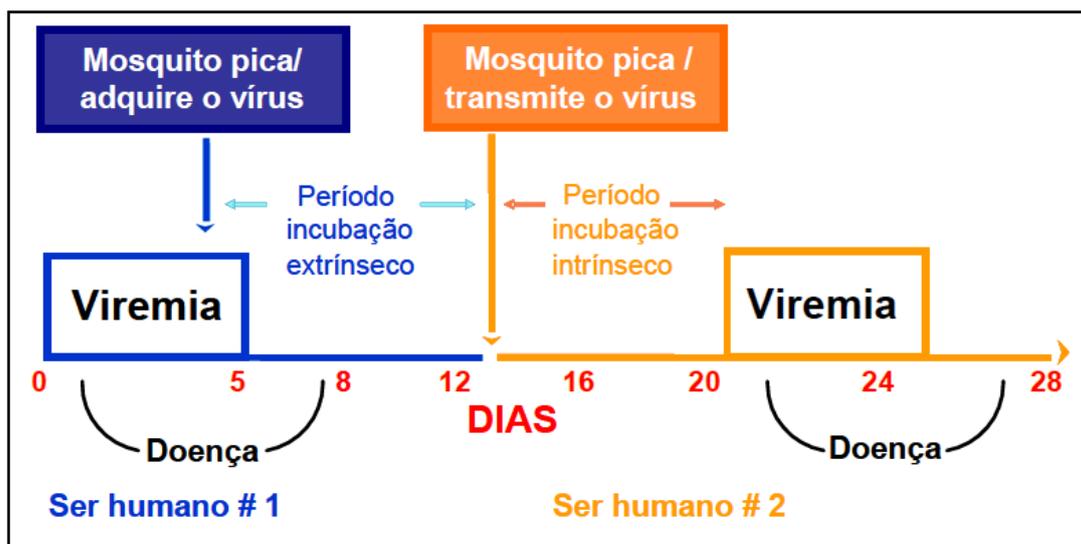
de 5 a 7 mm de comprimento (LIN et al., 2006). A fêmea costuma picar durante o dia, principalmente nas duas a três horas iniciais do amanhecer e algumas horas antes do anoitecer. Os ovos são depositados próximo à superfície da água, possui uma coloração inicialmente branca, mudando rapidamente para cor negra brilhante (OISHI *et al.*, 2007).

Geralmente o ciclo do vetor ocorre em uma semana, sendo que existem relatos de que os ovos podem estar viáveis por até 01 ano quando grudados nos recipientes, isto numa fase de resistência do seu ciclo. O mosquito, geralmente deposita seus ovos nas paredes internas dos criadouros artificiais, tais como reservatórios de água abertos, caixas d'água, vasos de plantas, garrafas, pneus, etc., que podem conter água parada. Os ovos eclodem as larvas ao serem cobertos de água, que irão nutrir-se de substâncias presentes na água e bactérias, transformando-se em pupas e logo em seguida em formas adultas dos vetores (LIN et al., 2006).

Existe também a transmissão vertical, em que o mosquito fêmea, possui o vírus que se multiplica no ovário e outros tecidos do seu aparelho reprodutor, fazendo com que parte de sua prole já passe a existir com o vírus, podendo assim ser transmitido para várias gerações de mosquito (MAROUN, 2008; MARTINS, 2012).

A replicação do vírus no vetor começa depois da fêmea picar um indivíduo em fase de viremia e durante um período de oito a doze dias, quando esta se torna infectante por toda sua vida, em torno de oito semanas, e poderá picar neste período até 300 pessoas. Esse período é chamado de incubação extrínseca. A doença ocorre principalmente no verão porque a temperatura ideal para o mosquito é acima de 30°C, já em temperaturas abaixo de 16°C a transmissão é rara (MAROUN, 2008).

Figura 05: Infecção do vírus dengue pelo *Aedes aegypti*.



Fonte: CDC 1995 (adaptado).

1.4– Patogenia

Através da picada do mosquito infectado que os vírus dengue são inoculados no indivíduo, sendo necessário passar por um período de incubação que pode variar de 3 a 15 dias, (incubação intrínseca), entre 5 a 6 dias. Neste período, o vírus faz a sua primeira replicação no homem em suas células musculares lisas, estriadas, fibroblastos e linfonodos, com esta multiplicação inicia-se a fase de viremia, causando uma disseminação por todo o corpo, que podem circular livres no plasma, dentro de macrófagos, monócitos, ou células dendríticas, a replicação viral dentro destas células têm sido consideradas como seus maiores sítios (FIGUEIREDO, 1999; KUBELKA, 2001).

Os vírus ativam os macrófagos que por sua vez liberam citocinas pró-inflamatórias tais como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Porém, as citocinas macrofágicas, interleucina-2 (IL-2) e de seu receptor solúvel, CD4 solúvel, interferon gama (INF- γ) interferon alfa (INF- α), interleucina 1beta (IL- β) e o fator de ativação de plaquetas (PAF), desempenham um importante papel na defesa contra infecções virais, essas citocinas (produzida e liberada pelos macrófagos) agem inibindo a replicação viral direta ou indiretamente e estão diretamente ligadas tanto na ativação do sistema imunológico como com os principais sintomas que são comuns a

dengue (febre e mal-estar) que surgem após o período de incubação, relacionando-se também com a fase de viremia que são responsáveis pela leucopenia, plaquetopenia e uma discreta depressão da medula óssea. E também as dores retroorbitárias e mialgias são ocasionadas devido a multiplicação do vírus no tecido muscular (FIGUEIREDO, 1999; KUBELKA, 2001; LIN et al., 2006; OISHI et al., 2007).

Indivíduos que tiveram infecção por um dos 4 sorotipos desenvolvem uma imunidade específica e duradoura devido a formação de anticorpos que podem conseguir neutralizar o vírus dengue do mesmo sorotipo (homóloga). Contudo, a imunidade cruzada para outro sorotipo é de curta duração, de 3 a 6 meses, (heteróloga) (HOWE, 1977; GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2007). Porém, o mecanismo de desenvolvimento da forma de dengue hemorrágica não está totalmente esclarecida. Hipóteses existentes procuram elucidar a patogênese da Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)/Síndrome de Choque do Dengue (SCD) (FIGUEIREDO, 1999; BRASIL, 2005a, 2005b; OISHI et al., 2007). Essas Três teorias tentam esclarecer a suscetibilidade a FHD: 1 – Teoria de Rosen – relaciona a gravidade da doença à maior virulência da cepa infectante. 2 – Teoria Halstead – Conhecida como teoria de “*enhancement*”, afirma que os anticorpos existentes de infecção prévia, adquiridos ativos ou passivamente (através da placenta) por um tipo do vírus, isto é anticorpos heterólogos anti-dengue da classe IgG não neutralizam o segundo vírus infectante de outro sorotipo, ocasionando a formação de complexos imunes que ligados aos macrófagos, através de receptores Fc, causam uma rápida internalização, resultando em uma maior replicação viral. A consequência é uma maior ativação de células e liberação de mediadores inflamatórios, que resulta na piora do quadro e agravamento da infecção. Concentrações subneutralizantes de anticorpos impossibilitam a reinfecção pelo mesmo sorotipo que estimulou a sua produção e portanto acabam facilitando a infecção por um segundo sorotipo, produzindo uma resposta cruzada de maior intensidade, tanto imunológica como inflamatória. 3 - Teoria integral da multicasualidade – Proposta por autores cubanos esta hipótese alia fatores de risco da teoria de Halstead , uma maior virulência da cepa, as particularidades de cada paciente em relação a raças, idade, fatores epidemiológicos, a resposta imunológica e inflamatória dos genes responsáveis e dos genes de

histocompatibilidade (FIGUEIREDO, 1999; BRASIL, 2005a; OISHI et al., 2007; NOISAKRAN; PERNG, 2008).

1.5 - Aspectos Clínicos

A dengue é uma patologia de amplo espectro clínico, que tem uma variedade de apresentações, podendo passar de uma forma assintomática ou como uma febre indiferenciada (síndrome viral), chegando até as formas mais graves como FHD/ SCD (BRASIL, 2005a).

Dengue Clássica: É caracterizada através de febre elevada (39°C a 40°C), de início abrupto, aliado às outras queixas, tais como sintomas de: cefaleia, dor retro-orbitária, prostração, mialgias, artralguas, ocorrendo em alguns casos exantema maculopapular acompanhado ou não de prurido. Manifestações gastrointestinais como náuseas, vômitos e diarreias também podem acontecer durante o período da doença (AYYUB et al., 2006; LEE; LIU; YANG, 2006; OISHI et al., 2007). No final da febre também conhecida como fase de defervescência, manifestações de choque e hemorrágicas, tais como petéquias, equimoses, gengivorragia e metrorragia podem ocorrer. Relatos mais raros apontam manifestações de hematêmese, hematúria, hepatomegalia e plaquetopenia (inferior a 100.000/mm³) (AYYUB et al., 2006; LEE et al., 2006; OISHI et al., 2007; OMS, 2009). Com uma duração de 5 a 7 dias a dengue clássica, em seu período de convalescência, pode apresentar uma debilidade física mesmo com o fim do período febril e com a diminuição dos sinais e sintomas. O diagnóstico diferencial com as outras formas clínicas da dengue se torna difícil quando outras manifestações hemorrágicas e/ou plaquetopenia (BRASIL, 2005; GURUGAMA et al., 2010). Febre Hemorrágica da dengue: Os sintomas iniciais são muito semelhantes à DC, sendo que, no terceiro ou quarto dias da doença, ocorre um agravamento no quadro da doença com o aparecimento de choque e/ou manifestações hemorrágicas. A prova do laço comprova uma fragilidade capilar, entretanto, é importante advertir que outras doenças infecciosas também podem ter este resultado positivo, como febre amarela e leptospirose (GUBLER, 1997; GUBLER, 1998; HUBERT; HALSTEAD, 2001; LEE et al., 2006; OMS, 2009). Outras manifestações hemorrágicas são relatadas como gengivorragia, metrorragia, hematúria, equimoses, epistaxe, hemorragias gastrointestinais, intracranianas, derrames

cavitários e hemorragias espontâneas nos locais da punção venosa (GUBLER, 1997; GUBLER, 1998; LEE et al., 2006).

Na FHD, a gravidade da doença está associada a característica fisiopatológica do extravasamento do plasma para o interstício e cavidades, manifestando-se pela elevação do hematócrito. Entre o 3º e o 7º dia dos casos graves de FHD, normalmente, precedido por dores abdominais, ocorre o choque, causado pelo aumento da permeabilidade vascular, mesmo de curta duração, pode acometer ao óbito entre 12 a 24 horas ou a uma rápida recuperação, após terapia adequada (BRASIL, 2005a, 2005b; OMS, 1997, 2009). Os sinais de alerta presentes tais como, uma intensa dor abdominal quem também pode ser contínua; dolorosa hepatomegalia; vômitos persistentes; hemorragias (hematêmese e/ou melena; agitação e/ou letargia; diminuição da diurese; hipotermia); hipotensão arterial e postural; pressão diferencial < 20 mmHg (PA convergente); extremidades frias, cianose; pulso rápido e fino, aumento do hematócrito; insuficiência respiratória estão relacionados com uma evolução e prognóstico da forma mais grave da doença (BRASIL, 2005; OMS, 1997, 2009). Para confirmação de FHD, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), deve estar presentes os seguintes critérios: febre ou história de febre recente de até sete dias; plaquetopenia ($\leq 100.000/\text{mm}^3$); presença de manifestações hemorrágicas como: prova do laço positiva, petéquias, sangramentos de mucosas do trato gastrointestinal, equimoses, púrpuras e outros; extravasamento do plasma, ocasionado pelo aumento da permeabilidade vascular, manifestado pelo aumento de 20% do hematócrito em relação ao primeiro parâmetro obtido na admissão ou a abrupta diminuição do hematócrito, após o tratamento e a presença de derrame pleural, ascite e hipoproteinemia (OMS, 1997, 2009; BRASIL, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (1997) a gravidade da dengue hemorrágica, pode ser classificada em 4 categorias: a) Grau I – febre aliada aos sintomas inespecíficos, a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva; b) Grau II – Inclui as manifestações do grau I somadas à: hemorragias espontâneas leves (epistaxe, sangramento de pele, gengivorragia e outros); c) Grau III – O paciente pode apresentar uma pele pegajosa e fria, inquietação, colapso circulatório com pulso fraco e rápido, estreitamento da pressão arterial ou hipotensão, d) Grau IV – Síndrome do Choque da Dengue

(SCD), ou seja, choque profundo com ausência de pressão arterial e pressão de pulso imperceptível (BRASIL, 2005; DEEN et al., 2006; OMS, 1997, 2009).

A nova Classificação da Dengue (OMS) foi apresentada e desenvolvida pelo Grupo Clínico do Estudo Multicêntrico DENCO; através da formulação do guia de atenção para pacientes na região das Américas (OPS/OMS 2010). Dengue: Diretrizes para diagnóstico, tratamento, prevenção e controle (WHO 2009). Essa necessidade deu-se pelos problemas dentre as limitações da antiga classificação em que os critérios de diagnósticos eram muito rígidos e criteriosamente baseados em resultados de laboratório, pois comumente, a classificação somente poderia ser feita ao final da doença, o que não auxiliava no manejo clínico do paciente, sendo que as intervenções médicas são imprescindíveis para modificar a classificação dos casos. O termo “hemorrágico” causava alguns conflitos, e alguns casos não poderiam ser notificados, pois não atendiam todos os critérios de avaliação, as adaptações feitas por alguns países tornaram essas comparações cada vez mais difíceis.

Considerar a gravidade segundo os critérios clínicos foi de grande importância, pois resultava em medidas médicas adequadas, mesmo quando acontecia alguma diferença nos critérios para as intervenções médicas, foi possível produzir uma ferramenta capaz de produzir uma avaliação independente dos sinais e sintomas clínicos (BARNIAL et al, 2011). Então, de acordo com a nova classificação a dengue passou a ser caracterizada como:

Dengue Sem Sinais de Alarme: Com a defervescência os pacientes poderiam apresentar uma melhora ou piorar, aqueles que melhoram depois da defervescência possuem dengue sem sinais de alarme.

Dengue Com Sinais de Alarme: Aqueles que pioram depois da fase de defervescência e manifestam os sinais de alarme.

Dengue Grave: Ocorre quando a manifestação desses sinais de alarme evoluem para: grave extravasamento de plasma que leva ao choque, sangramento grave, importante comprometimento de órgãos e quando o período de escape de plasma se estende, tornando-se clinicamente grave, geralmente dura de 24 a 48 horas.

1.6 - Diagnóstico Laboratorial

1.6.1 - Exames Específicos:

As infecções causadas pelo vírus dengue tem sua confirmação laboratorial realizada por exames específicos, através de métodos moleculares, isolamento viral ou diagnóstico sorológico que demonstram a presença de anticorpos da classe IgM, em uma única amostra de soro, ou a elevação no título de anticorpos IgG (conversão sorológica) (HOWE, 1977; BRASIL, 2005a).

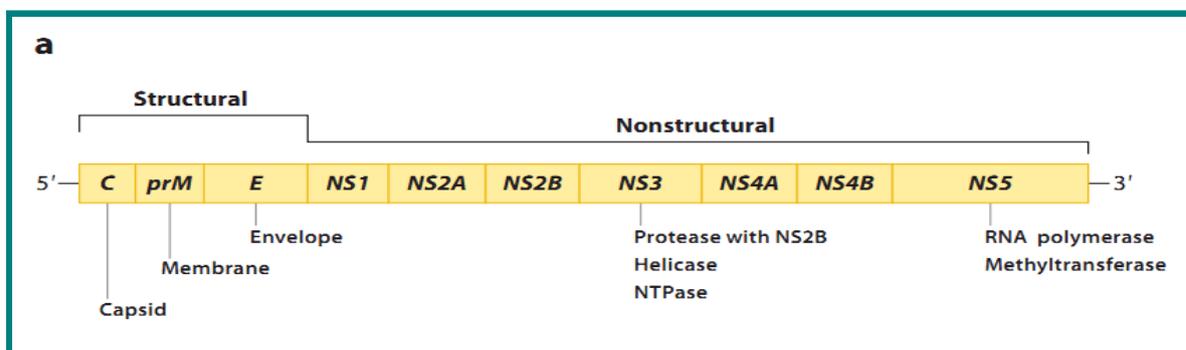
Isolamento viral: É considerado um método de diagnóstico padrão para identificar o sorotipo do vírus responsável pela infecção, sendo assim, é extremamente importante no que implica o contexto da vigilância epidemiológica. É essencial que a coleta da amostra biológica seja realizada até o 5º dia do início dos sintomas (período de viremia). A técnica de inoculação do vírus em cultura de células de *Aedes albopictus* (C6/36) é a técnica utilizada para a realização do diagnóstico de isolamento viral. A confirmação deste método é feito por imunofluorescência direta com conjugado anti-flavivírus. Dos casos que são detectados positivos, são realizadas a identificação do sorotipo por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais de tipos específicos (HOWE, 1977; IGARASHI, 1978; BRASIL, 2005b; OISHI et al., 2007). Sorologia: Existem diferentes técnicas que podem ser utilizadas no teste sorológico dos vírus dengue, sendo o padrão ouro o ELISA de captura de IgM. Os testes de captura de IgM são mais simples e úteis no diagnóstico, pois necessitam somente de uma amostra do soro do paciente na maioria dos casos. São baseados na detecção e identificação de anticorpos IgM específicos aos quatro sorotipos do vírus da dengue. Após o quinto dia do início da doença o anticorpo IgM anti-dengue apresenta um desenvolvimento rapidamente, tanto nas primeiras infecções quanto nas reinfecções. (GUBLER et al., 1984; HUNSPERGER et al., 2009; IZURIETA et al., 2009).

Sendo que, outros testes também podem ser utilizadas no diagnóstico sorológico do vírus dengue: e teste de neutralização (N), fixação de complemento (FC), inibição de hemaglutinação (HI), sendo que, estas técnicas necessitam de amostras pareadas de soro de casos suspeitos e a confirmação é demorada (HOWE, 1977; OISHI et al., 2007; BRASIL, 2005a).

Técnicas Moleculares: Para detecção e identificação de antígenos virais e ácidos nucléicos virais são utilizadas técnicas moleculares: Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), que revela quantidades reduzidas de ácido nucléico viral presente nos tecidos ou espécimes pesquisados, pela amplificação do c-DNA obtido a partir do RNA viral. A Imunofluorescência possui seu princípio na junção de um anticorpo marcado, fixado com um fluorocromo ao seu antígeno homólogo. A imunohistoquímica permite sua identificação de antígenos virais em cortes de tecidos fixados em formalina e em blocos de parafina, corados com a enzima fosfatase alcalina ou peroxidase e marcados com anticorpo específico. A hibridização *in situ* detecta genomas virais específicos utilizando sondas radiativas (radioisótopos) ou não (enzimas), também em amostras de materiais conservados por muitos anos. O diagnóstico histopatológico é feito a partir de lesões anatomopatológicas que podem ser encontradas no fígado, rins, baço, coração e linfonodos e é realizado a partir de coleta post-mortem (KAO et al., 2005; BRASIL, 2005b).

Detecção da proteína não estrutural NS1: A proteína não-estrutural 1 (NS1) está presente nos quatro sorotipos do vírus dengue e pode ser um marcador usado durante a fase aguda da doença (até 05 dias do início dos sintomas) e tem sido indicado para o diagnóstico da doença, utilizam-se testes imunocromatográficos e imunoenaios ELISA para sua detecção (FIGURA 06) (SILVA, 2011; PINAR,2002).

Figura 06: Esquema das proteínas estruturais e não estruturais do vírus dengue



Fonte: MURPHY, 2011.

1.6.2 - Exames inespecíficos

Alterações Hematológicas: O diagnóstico da dengue é baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Dentre os exames laboratoriais utilizam-se os testes inespecíficos: hemograma, coagulograma, prova de função hepática e dosagem de albumina sérica (SRICHAIKUL; NIMMANNITA, 2000; DE PAULA; FONSECA, 2004). O hemograma é utilizado para avaliar as alterações hematológicas periféricas na dengue, avaliando a células sanguíneas em caráter qualitativo e quantitativo. Destaca-se como um dos principais e mais relevantes achados no hemograma a leucopenia, muitas vezes com contagens inferior a 2.000/mm³, no entanto, existem relatos de uma discreta leucocitose no início da doença.

No início da doença a linfocitose é um achado frequente e pode apresentar também uma discreta neutrofilia, seguida de uma leucopenia e de uma linfocitose com a presença de linfócitos atípicos. Entre os parâmetros observados destacam-se o hematócrito, devendo ser monitorado de acordo com os dias da doença, sendo que nos casos de FHD haverá um aumento do hematócrito em 20% do valor basal do paciente associado a uma trombocitopenia (<100.000/mm³) (HOWE, 1977; KAO et al., 2005; AGEEP; MALIK; ELKARSANI, 2006; OISHI et al., 2007). Tanto para avaliação quantitativa das plaquetas que o coagulograma é solicitado, bem como para a avaliação da coagulação sanguínea (tempo de protrombina, tempo parcial de tromboplastina). Estudos têm demonstrado que na dengue um comprometimento na hemostasia, dependendo da forma clínica, o paciente poderá apresentar desde uma plaquetopenia com alteração da agregação plaquetária até consumo dos fatores da coagulação (HOWE, 1977; OISHI et al., 2007; KAO et al., 2005).

Alterações Bioquímica: Tanto em casos de dengue clássica, como em casos de dengue hemorrágico as alterações hepáticas refletidas como hepatomegalia, aumento das enzimas hepáticas, hepatite fulminante e encefalopatia já foram relatadas (UEHARA et al., 2006; SOUZA et al., 2008). Contudo, dentre os exames bioquímicos as mais frequentes alterações ocorrem nos testes de função hepática: aminotransferase aspartato sérica (AST), aminotransferase alanina sérica (ALT), gama GT e fosfatase alcalina

sérica. Outros exames bioquímicos que podem sofrer alterações seriam as dosagens de: uréia, creatinina e albumina sérica (HOWE, 1977; KAO et al., 2005).

1.7 – Prevenção

A prevenção é um grande desafio para o sistema de saúde, principalmente por ainda não existir a disponibilidade de vacinas e a dificuldade em acabar com a circulação do vetor. Essa problemática é discutida em todo o mundo, mesmo em países que realizam campanhas de erradicação do vetor. Para controle de epidemias o governo promove ações que em geral são pouco efetivas, pois para o controle da epidemia deve incluir medidas que causem mobilização da sociedade, obtenção de recursos humanos e financeiros, além de redução do uso contínuo de inseticidas (OMS, 2009; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Portanto, este estudo se propõe a identificar o perfil dos pacientes com suspeita clínica de dengue, por meio de seus sinais e sintomas e com os resultados laboratoriais que normalmente são solicitados na rede de atendimento com dengue e que sinalizem a sua gravidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar as características individuais de casos com suspeita clínica de dengue e correlacionar com exames hematológicos, bioquímicos, sorológicos e virológicos.

2.2. Específicos

- Caracterizar as alterações hematológicas e bioquímicas nos pacientes com suspeita de dengue.
- Avaliar a positividade dos testes específicos para dengue;
- Correlacionar os dados obtidos com gênero e idade.

3. METODOLOGIA

3.1 Estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal descritivo de etiologia febril em pacientes com síndrome febril aguda. No qual foram avaliadas características individuais de casos com suspeita clínica de dengue, correlacionando com exames hematológicos, bioquímicos, sorológicos e virológicos.

3.2 Pacientes

Neste estudo foram recrutados 137 pacientes, desses pacientes, 95 foram incluídos no estudo por busca ativa de acordo com a suspeita clínica de dengue do médico nos serviços de ambulatórios e na enfermagem do Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) de janeiro de 2012 à Janeiro de 2013. Os dados clínicos e epidemiológicos foram colhidos com a utilização de questionário (Apêndice I).

3.2.1 Critérios de inclusão: homens e mulheres, com idade igual ou acima de 18 anos, apresentando quadro febril do primeiro até o quinto dia, associado com, pelo menos, dois dos sintomas descritos a seguir: cefaleia, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia e exantema. Em pacientes internados foram incluídos na pesquisa aqueles que apresentavam quadro febril até o décimo dia, devido ao agravamento da doença, possibilitando uma caracterização mais fidedigna de seus sintomas clínicos.

3.2.2. Critérios de exclusão: menores de 18 anos, mulheres grávidas, pacientes que apresentavam quadro febril a mais de cinco dias, mesmo com a presença dos referidos sintomas: cefaleia, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia e exantema ou pacientes que apresentarem qualquer contra-indicação para coleta de amostras de sangue.

3.3 Definição de caso

A classificação clínica dos pacientes foi considerada dentro dos parâmetros Brasileiros do Ministério da Saúde/ - Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997, 2009). A dengue clássica é caracterizada por febre alta de

início súbito, cefaleia, mialgias, astenia, prostração, dor retro-orbitária, artralgia e exantema, além de manifestações gastrointestinais e linfadenopatias.

A dengue hemorrágica pode ser caracterizada principalmente por essas manifestações: febre alta, fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia e insuficiência circulatória. Sendo classificada em 4 graus devido a sua gravidade: Grau I: febre, prova do laço positivo e/ou tendência a fácil sangramento.

- Grau II: grau I associada a hemorragias na pele ou outras.
- Grau III: grau I e grau II, associado falência circulatória com pulso rápido, diminuição da pulsação ou hipotensão, presença de sudorese, pele úmida e prostração.
- Grau IV: grau I, II e III acompanhada de choque profundo com pressão e pulso indetectáveis.

Segundo a nova classificação da dengue proposta pela WHO, 2009: Dengue Sem Sinais de Alarme: Com a fase de defervescência os pacientes poderiam melhorar ou piorar, aqueles que melhoram depois desta fase têm dengue sem sinais de alarme.

Dengue Com Sinais de Alarme: Aqueles que pioram depois da fase de defervescência e manifestam os sinais de alarme.

Dengue Grave: Ocorre quando a manifestação desses sinais de alarme evoluem para: significativo extravasamento de plasma que leva ao choque, sangramento grave, grave comprometimento de órgãos e quando o período de escape de plasma se estende, tornando-se clinicamente grave, geralmente dura de 24 a 48 horas.

3.4 Coleta e processamento do material

Foram coletados 10 ml de sangue periférico de cada paciente, utilizando-se tubos vacutainer. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas de isopor contendo bolsas de gelo reciclável, e foram transportadas para o laboratório de destino.

As amostras foram processadas assim que chegaram ao Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará - UFC. O sangue foi submetido à centrifugação de 1.500 x-g

por 5 minutos a 4°C, após retração do coágulo foi obtido soro. As amostras de soro foram estocadas a -70°C para a realização dos testes de diagnósticos.

Os soros dos pacientes suspeitos de dengue foram testados através das técnicas de detecção de anticorpos anti-NS1 (Imunocromatográfico Bioesay®) (Figura 07) e pelo teste imunoenzimático ELISA IgM e a através da técnica RT-PCR segundo as recomendações do fabricante .

3.5 DIAGNÓSTICOS PARA DENGUE

3.5.1 DIAGNÓSTICO SOROLOGICO

As amostras de soro no projeto foram submetidas a detecção de IgM anti-dengue .A sorologia para dengue foi analisada através do ensaio imunoenzimático ELISA, pelo Kit comercializado pela Bioesay®, seguindo as recomendações do fabricante.

ISOLAMENTO VIRAL: As amostras foram encaminhadas ao LACEN para realização do teste de Isolamento viral e lá foram selecionadas as que seriam submetidas aos testes seguindo protocolo padronizado pelo referido laboratório.

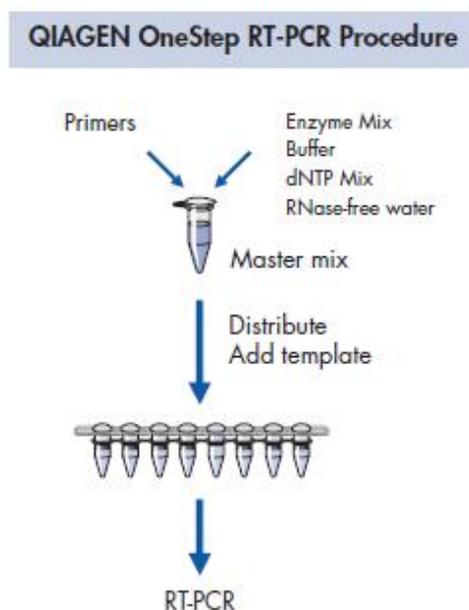
3.5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Extração do RNA e RT-PCR

Para a extração do RNA foi utilizado o kit Invisorb Spin RNA Virus Mini (QIAGEN®). Este teste utiliza uma coluna com sílica gel com afinidade para RNA. Para tanto, 140 µL de cada amostra clínica foi lisada pelo tampão AVL e, após a lise, a amostra foi aplicada a uma coluna com afinidade para RNA e submetida a uma centrifugação de 8000 rpm por 1 minuto. Em seguida, a amostra laboratorial foi lavada duas vezes, uma com a solução tampão AW1 e outra com o tampão AW2. Terminado a lavagem o RNA foi eluído da coluna, pelo tampão AVE e estocado a -70°C.

O RT-PCR foi realizado através do Kit OneStep RT-PCR Kit QIAGEN® (FIGURA 08) segundo as normas do fabricante, foi utilizado para a reação, o material genético que numa solução final de 50µl, que consista de 0,2 mM dNTPs, 2,5U de *Taq*-DNA Polimerase e solução tampão e 20 pmol de cada *primer* AD3 e AD4, que possui 420 pb (HENCHAL, 1991)

Figura 07: Esquematização da técnica: OneStep RT-PCR



Fonte: QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit – Handbook, 2010

O produto da amplificação foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com gel red 1µg/mL, visualizado à luz ultravioleta. O controle negativo da reação foi composto pelos reagentes da RT-PCR adicionados de água.

3.5.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA

Os hemogramas foram realizados em aparelho de automação do Laboratório de Análises Clínicas do HSJ com contagem diferencial por visualização microscópica do esfregaço. Foram considerados os valores absolutos dos leucócitos. Para a análise dos dados foram utilizados os valores de referência segundo definições técnicas baseadas na literatura.

Foi considerado leucopenia o número de leucócitos totais abaixo de 4.000 cel./µl; neutropenia com contagem absoluta de neutrófilos abaixo de 1000 cel./µl (DALE, 2001), linfopenia com contagem absoluta de linfócitos inferior a 1.000 cel./µl (KIPPS, 2001b, p. 969), monocitose com contagem absoluta de monócitos superior a 800 cel./µl (LITCHMAN, 2001) e

plaquetopenia como número de plaquetas abaixo de 150.000 cel./ μ l. A bastonetose foi considerada como número absoluto de neutrófilos bastonetes acima de 700 cel./ μ l (LOURENÇO, 2005). Ressaltando que a unidade μ l equivale a mm^3 . Foi considerada presença de hemoconcentração pela elevação do hematócrito acima de 20% do basal (WHO, 1997b).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados após cada experimento. Todos os dados obtidos foram armazenados no programa EXCELL, o qual foi permitido à tabulação dos mesmos para a realização das análises. Foi aplicado o teste exato de Fisher para traçar uma relação por gênero na classificação da dengue.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de um estudo envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução 196/96 (466/12) do Conselho Nacional de Saúde, o projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa do HSJ sob o número de protocolo: 064/2009.

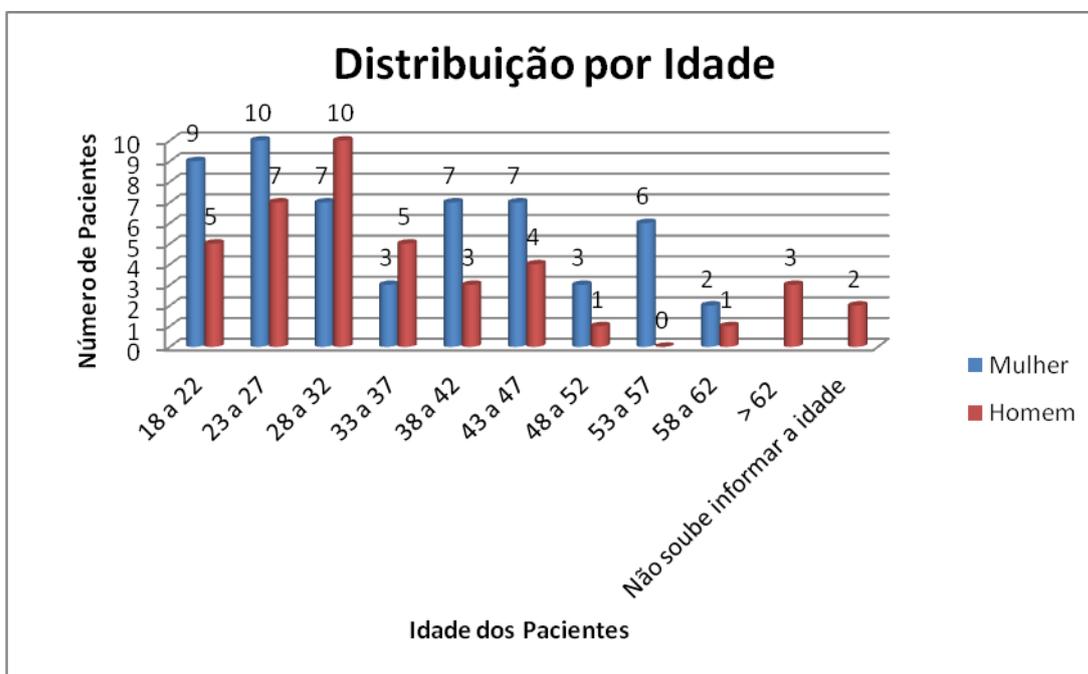
Os pacientes foram informados adequadamente sobre os objetivos do trabalho e foi oferecida a participação voluntária em nosso estudo, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos os casos suspeitos foram notificados aos serviços de vigilância epidemiológica.

4. RESULTADOS

Foram analisados os dados de 95 pacientes com suspeita clínica de dengue, atendidos no HSJ, as informações foram colhidas através da ficha elaborada pelo pesquisador que continha informações clínicas e laboratoriais dos pacientes.

Dos 95 pacientes analisados observamos que 54 pacientes pertenciam ao sexo feminino (56,84%) e 41 masculino (43,16%). Na figura abaixo os pacientes foram divididos em grupos de cinco em cinco anos e a idade dos pacientes variou com o mínimo de 18 anos e o máximo de 82 anos de idade, com uma predominância nos três primeiros grupos de adultos jovens na faixa etária de 18 a 22 anos com 09 mulheres e 05 homens; o segundo grupo de 23 a 27 anos com 10 mulheres e 07 homens e o terceiro grupo com 07 mulheres e 10 homens (Figura 09). Somando um total de 48 pacientes 50,52% nesses três grupos discriminados acima.

Figura08: Distribuição por faixa etária e sexo dos pacientes estudados (n=95)



Dentre os pacientes, 61 (64,21%) foram atendidos no ambulatório emergencial e 34 (35,79%) pacientes internados com suspeita de dengue. Conforme a sintomatologia, podemos observar uma predominância de cefaleia

com 96,8% e mialgia com 93,7% entre os sintomas mais relatados, porém, todos os sintomas clássicos da dengue foram relatados conforme demonstra a figura abaixo. (Tabela 01)

Tabela 01: Distribuição dos sintomas

Sintomas	Presentes	Ausentes
Cefaleia	92 (96,8%)	3
Dor retroorbitária	80 (84,2%)	15
Mialgia	89 (93,7%)	6
Artralgia	74 (77,9%)	21
Prostração	80 (84,2%)	15
Exantema	40 (42,1%)	55

De acordo com a antiga classificação clínica da dengue, 65 (68,42%) pacientes foram classificados como casos de dengue clássica (Tabela02).

Tabela02: Distribuição dos pacientes segundo sexo, através da antiga classificação clínica da dengue.

Classificação Dengue	Feminino	Masculino	Total
Dengue clássica	38	27	65
Dengue com complicação	8	5	13
Febre hemorrágica da dengue	2	3	5
Sem informação	6	6	12
Total	54	41	95

Foi aplicado o teste estatístico exato de Fisher para avaliar a relação sexo x nova classificação da dengue, que apresentou $p = 0,837$

Porém, segundo a nova classificação clínica de dengue da OMS em 2011, podemos observar uma mudança nesse quadro com 53 (55,78%) pacientes, houve uma predominância de casos de dengue com sinais de alarme (DCA) (Tabela 03).

Neste estudo foi aplicado o teste estatístico de Fisher para verificar a relação entre a variável sexo e classificação da dengue. Porém, tanto homens como mulheres são acometidos de forma semelhante pelos tipos de dengue. Isso tanto para a classificação antiga quanto para a nova, visto que não houve significância tendo um $p=0,837$ para antiga classificação de dengue e $p= 0,839$ para a nova classificação.

Tabela 03: Distribuição dos pacientes segundo sexo, através da nova classificação clínica da dengue pela OMS.

Nova Classificação Dengue – OMS	Feminino	Masculino	Total
Dengue sem sinais de alarme	12	10	22
Dengue com sinais de alarme	31	22	53
Dengue grave	4	4	8
Sem informação	7	5	12
Total	54	41	95

Foi aplicado o teste estatístico exato de Fisher para avaliar a relação sexo x nova classificação da dengue, que apresentou $p = 0,839$

Segundo os resultados dos exames inespecíficos, como hemograma e bioquímica, mostraram que na primeira coleta, do 1º ao 5º dia de febre, os parâmetros de hematócrito e plaquetas foram alteradas em 85,3% e 50,5% respectivamente. Os pacientes classificados como sem informação foram aqueles que não realizaram alguns dos testes hematimétricos relacionados na tabela abaixo. Dentre esses pacientes observamos um percentual maior que 50% em pacientes sem informação sobre os resultados dos testes de uréia e creatinina. (Tabela 04).

Tabela 04: Distribuição dos resultados dos exames inespecíficos realizados na 1ª coleta dos pacientes estudados.

Índices hematimétricos	Alterado	Normal
Hemoglobina (g/dL)	25	66
Hematócrito (%)	81	10
Glóbulos Brancos	41	49
Seguimentados (%)	38	50
Linfócitos (%)	52	36
Plaquetas	48	42
TGO / AST	40	30
TGP / ALT	40	31
Albumina	8	49
Uréia	11	35
Creatinina	13	30

Os resultados dos exames inespecíficos realizados na segunda coleta, que ocorreu do 6º ao 10º dia de febre dos pacientes, observamos uma alteração nos parâmetros de hematócrito com 38%, seguidos de uma alteração

de 30,5% tanto nas plaquetas como nos linfócitos. Contudo temos uma taxa de exames inespecíficos sem informação maior que 50% nos dados paramétricos do hemograma e maior que 65% nos dados dos testes bioquímicos, devido à ausência dos pacientes em realizar os respectivos testes, visto que em sua maioria já haviam passado da fase de convalescença quando foram solicitados que retornassem ao hospital para a realização da 2ª coleta e portanto, os mesmos não retornaram (Tabela 05).

Tabela 05: Distribuição dos resultados dos exames inespecíficos realizado na 2ª coleta dos pacientes estudados.

Índices hematimétricos	Alterado	Normal
Hemoglobina (g/dL)	12	34
Hematócrito (%)	37	9
Glóbulos Brancos	18	28
Seguimentados (%)	19	25
Linfócitos (%)	29	17
Plaquetas	29	17
TGO / AST	26	7
TGP / ALT	25	8
Albumina	3	24
Uréia	8	16
Creatinina	5	17

Durante a 1ª coleta foram realizados testes específicos para dengue: teste de Imunocromatografia NS1 (FIGURA 09), RT-PCR, ELISA NS1 e isolamento viral, sendo que o teste de isolamento viral foi realizado pelo LACEN. Durante a 2ª coleta foi realizado o teste sorológico de ELISA IgM. (Tabela 06). Assim, tivemos 56 pacientes positivos para dengue e 39 negativos.

Dentre esses resultados podemos observar que todos os pacientes positivos foram confirmados em, pelo menos, dois testes concomitantemente. Ressaltando que os três pacientes positivos no isolamento viral foram confirmados com o sorotipo DEN-4, esses três pacientes, dois foram confirmados através dos testes de Isolamento viral e ELISA IgM, enquanto um paciente foi confirmado em 4 testes: isolamento viral, ELISA IgM, Imunocromatográfico NS1 e ELISA NS1. Os pacientes que foram classificados

na tabela 06 como: sem informação, são os pacientes que não realizaram os referidos testes.

Figura 09: Teste Imunocromatográfico NS1

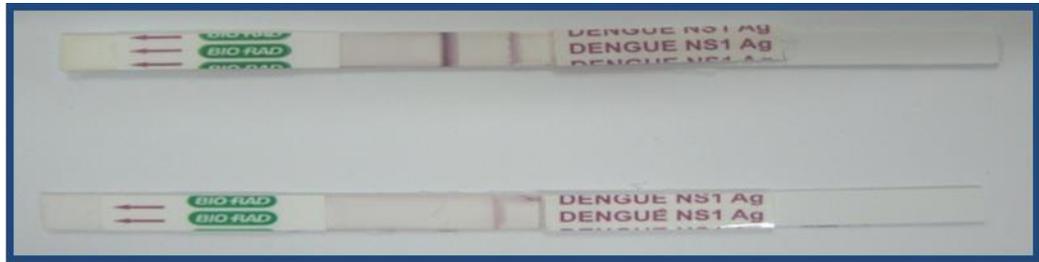


Tabela 06: Distribuição dos resultados dos testes específicos para dengue realizado nos pacientes do estudo.

Exames Específicos	Positivo	Negativo
NS1	9	86
ELISA NS1	8	35
ELISA IgM	35	11
RT-PCR	1	94
Isolamento Viral	3	47

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que em relação ao gênero houve um pequeno predomínio do sexo feminino (56,84%). Ao ser analisado o resultado dos pacientes separando as faixas etárias de 5 em 5 anos, observou-se uma prevalência da doença em adultos jovens de 18 a 32 anos com 50,52%, dados que se assemelham com o estudo de Barros et al. (2008) e Oliveira et al. (2009). Provavelmente, por esse grupo de adulto jovens está mais susceptível ao sorotipo circulante (DEN-04) no período do estudo, visto que já haviam sido sensibilizados a outros sorotipos.

Cavalcanti *et al.* (2010) demonstraram como sinais e sintomas mais frequentes: cefaleia, dor retro-orbitaria, prostração, artralgia, exantema e mialgia em pacientes com dengue no ano de 2003 no estado do Ceará, sendo esses, dados semelhantes aos encontrados nesse estudo (GIBBONS ; VAUGHN, 2002).

Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2009) demonstraram um predomínio da forma clássica em relação às graves, mesmo sendo um hospital de referência para dengue. Dados que corroboram com os encontrados nesse estudo e semelhantes a estudos da literatura (KITTGUL et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Devido à dengue ser uma doença viral, se espera encontrar características nos exames laboratoriais próprias dessa etiologia, o que nem sempre acontece em todas as fases da doença. Podendo ocorrer desde uma leucocitose, neutrofilia, e plaquetas normais, como também não se observar alterações nas enzimas.

O envolvimento hepático durante a infecção na dengue tem sido descrito na literatura, onde as alterações no TGO/ AST parecem ser mais expressivas do que a TGP/ALT, dados que são confirmados nesse estudo (HOWE, 1977; KALAYANAROOJ et al., 1999; SENEVIRATNE et al., 2006).

O padrão de AST e ALT durante a evolução da dengue demonstrou que o AST se eleva no início da sintomatologia e mantendo-se em níveis elevados de grau variado durante o período das coletas analisadas no presente estudo. O ALT também iniciou com valores acima da normalidade, se mantendo durante toda a evolução da doença. Resultados esses semelhantes aos dados

da literatura, em que demonstram um aumento progressivo das enzimas hepáticas na infecção por dengue (HOWE, 1977; KALAYANAROOJ et al., 1999; SENEVIRATNE et al., 2006).

O aumento do hematócrito nos resultados dos pacientes também foi presente concordando com a literatura já descrita (BARROS, 2008; ASU, 2008; LIN et al., 2006; OISHI et al., 2007). Sobre a hemoconcentração é relatado que a produção de citocinas ocasiona um aumento da permeabilidade vascular causando um extravasamento de plasma, alteração fisiopatológica fundamental da dengue, na qual ocorre perda de líquidos e proteínas para o espaço extravascular (BASU, 2008; LIN et al., 2006; OISHI et al., 2007).

Nossos dados corroboram com os obtidos por Oliveira et al. (2009) é o perfil da dinâmica dos linfócitos que foi caracterizado por uma diminuição no início da doença e um aumento no número dos linfócitos no decorrer da evolução. Concordando também com o estudo realizado por Gubler et al. (1997), que observaram uma diminuição do número de leucócitos totais e aumento do número de linfócitos a medida que a fase febril aproxima-se do final.

Em relação a contagem de plaquetas durante o período das duas coletas que foram analisadas a doença demonstrou que a trombocitopenia ocorreu principalmente no início da sintomatologia. Ao contrário dos resultados encontrados na literatura onde reportam que a trombocitopenia é mais tardia, principalmente na forma clássica da doença (GUBLER et al., 1997; KITTIGUL et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; CHAU et al., 2010).

Em 2013 foi publicado o primeiro estudo brasileiro que se propôs a comparar a antiga classificação da dengue e a nova classificação proposta pela OMS, os dados encontrados no referido estudo de Lima, demonstraram que usando a antiga classificação a maioria dos pacientes foram classificados como dengue clássica (82,9 %). Estes dados, embora ligeiramente mais elevados, são semelhantes aos dados encontrados neste estudo em que 65 pacientes (68,43%) foram classificados com dengue clássica, dados que também corroboram com o estudo de Moura e colaboradores que encontrou um percentual de 66,3 % pacientes com dengue clássica (NARVAEZ, 2011; BARNIOL, 2011; MOURÃO, 2007). A classificação antiga é mais rígida quanto

aos critérios para se determinar os casos de dengue hemorrágica, dificultando a identificação precoce de casos mais graves.

Quando observamos a nova classificação proposta pela OMS percebemos que houve uma diferença no padrão, pois tivemos 53 pacientes (55,78%) classificados em dengue com sinais de alarme, e 22 pacientes (23,15%) classificados com dengue sem sinais de alarme. Demonstrando que grande parte dos pacientes classificados como dengue clássica foram reclassificados, dados que corroboram com o encontrado por Barniol e colaboradores que tiveram 57,6% dos seus pacientes reclassificados e por Lima em 2013 que teve 70% dos seus pacientes reclassificados com a nova proposta sugerida pela OMS. A grande exigência para atender todos os critérios gera grande dificuldade no estadiamento de casos graves, diversos autores relatam dificuldades para classificar pacientes com FHD (NARVAEZ, 2011; SAMSI, 1990; SRIVASTAVA, 1990).

No presente estudo dos 95 pacientes analisados, 46 realizaram teste de sorologia ELISA IgM anti-dengue, 35/46 (76,08%) foram positivos e 11/46 negativos. 49 pacientes não realizaram o teste de ELISA IgM anti-dengue porque não retornaram para realizar a 2ª coleta sanguínea. Silva e colaboradores desenvolveu um estudo semelhante em que 83 amostras foram submetidas ao teste ELISA IgM obtendo uma positividade de 66 (79,51%) amostras. Dados que corroboram com o presente estudo. Porém, no estudo de Barros e colaboradores em 2008 o teste sorológico realizado pelo método de ELISA IgM anti-dengue mostrou-se positiva para 99/210 (47,1%) e 52,9% de casos negativos na pesquisa sorológica. O teste ELISA de rotina para diagnóstico sorológico da dengue apresentou bons resultados, porém somente detecta a doença em sua fase tardia, sendo a partir do quinto dia do início dos sintomas, quando os títulos de anticorpos IgM estão elevados, assim passa a ter também uma finalidade de orientação das ações de vigilância epidemiológica (SILVA, 2011; POERSCH, 2007)

O isolamento viral é a técnica considerada referência para detecção e identificação do vírus dengue e no estudo de Silva e colaboradores em 2011 eles obtiveram 64/136 (47,1%) amostras positivas no isolamento viral enquanto no presente estudo obtivemos 3/50 (6%) de positividade nas amostras. Esse contraste ocorre devido ao difícil manejo do procedimento que requer

instalações apropriadas, possui custo elevado e demora cerca de 7 a 10 dias para ser concluído. Além disso, após o terceiro dia do início dos sintomas o nível de anticorpos começa a subir, o que interfere diretamente no resultado e na sensibilidade do isolamento. (SILVA 2011; YOUNG,2000)

No teste de imunocromatografia NS1 obtivemos uma positividade de 9/95 (9,47%) enquanto no estudo de Silva, 2011 foi encontrada uma positividade de 50/54 (92,60%) dados que não corroboram com o presente estudo e pode ser explicado que no momento das coletas da pesquisa o sorotipo circulante na região era o DEN-4, que apresenta indícios de uma baixa sensibilidade nos testes de detecção da proteína não estrutural NS1, além de que pacientes com viremia muito baixa podem não apresentar NS1 detectável. O RT-PCR apresentou uma positividade de 1/95 (1,0%) nas amostras testadas o que pode ser explicado por uma baixa especificidade do primer ao sorotipo circulante (DEN-4) (SILVA 2001; FONSECA, 2002). Com estes dados podemos verificar que a maior flexibilidade na classificação revista pode ajudar no monitoramento de pacientes em risco de evoluir para uma forma mais grave da doença e assim como um diagnóstico preciso auxilia tanto no monitoramento do paciente como em ações epidemiológicas.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo observamos que as alterações das enzimas hepáticas continuam presentes nos casos suspeitos de dengue e sendo assim, deve-se chamar a atenção dos profissionais de saúde, em relação a solicitação desse teste, pois pode auxiliar no monitoramento para que o caso não evolua para formas mais graves.

A nova classificação sugerida pela OMS demonstrou maior flexibilidade para o manejo do paciente, em relação a classificação antiga, o que pode facilitar uma melhor orientação terapêutica.

Com relação aos testes específicos o ELISA IgM anti-dengue apresentou uma maior positividade nos resultados da pesquisa. Portanto, esses resultados são relevantes na avaliação da doença e demonstrou que a avaliação dos sinais e sintomas dentro da evolução cronológica da doença podem ser utilizados como sinalizadores para uma evolução para as formas mais graves e com isso fazer um monitoramento adequado ao paciente e auxiliar em uma conduta terapêutica eficaz para o paciente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEEP, A.K.; MALIK, A.A.; ELKARSANI, M.S. Clinical presentations and laboratory findings in suspected casos of dengue virus. *Saudi Med. J.*, v.27, n.11, p. 1711-1713, 2006.

AGUIAR DB FONTÃO A, RUFINO P, MACEDO VA, RIÓS-VELÁSQUEZ CM, CASTRO MG, HONÓRIO NA. 2008 Primeiro registro de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em Roraima, Brasil. *Acta Amazônica* 38 (2) 357-360.

ANDERSON, C.R.; DOWNS, W.G.; HILL, A.E. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. *Science*, v. 124, n. 3214, p. 224-225, 1956.

DENGUE 3 in Central America. Dengue Branch, San Juan, Puerto Rico. Division of Vector-Borne Infectious. *Dengue surveillance*, v. 70, p. 1-4, 1995.

AYYUB, M. ; KHAZINDAR, A.M.; LUBBAD, E.H.; BARLAS, S.; ALFI, A.Y.; AI-UKAYLI, S. Characteristics of dengue fever in a large public hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *J. Ayub. Med. Coll.*, v.18, n. 2, p.9-13, 2006.

BALESTRA RA, PEREIRA RK, RIBEIRO MJ, SILVA JS, ALENCAR J. 2008. Ocorrência de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em área urbana do Estado do Tocantins. *Neotropical Entomology* 37(2): 233-235.

BARNIOL J, GACZKOWSKI R, BARBATO EV, CUNHA RV, SALGADO D, MARTINEZ E, ET AL. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multicentre study in 18 countries. *BMC Infectious Dis.* 2011;11:106, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-11-106>.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud. Av.*, v. 22, n.64, p.53-72, 2008.

BARROS, L. P. S.; IGAWA, S.E.S.; JOCUNDO, S.Y.; BRITO JUNIOR, L.C. Análise crítica dos achados hematológicos e sorológicos de pacientes com suspeita de dengue. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 30, n. 5, p. 363-366, 2008.

BASU, A.; CHATURVEDI, U.C. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.53, n.3, p.287-299, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue: diagnóstico e manejo clínico. 2. ed. Brasília, DF, 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed. Brasília, DF, 2005b. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

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. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 43, n. 4, p. 355-358, 2010.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. Dengue: Informe Semanal, p.1-10, fev. 2010.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. Dengue: Informe Semanal, p. 1-10, mar. 2007.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. Dengue: Informe Semanal, p.1-10, nov. 2009.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. Dengue: Informe Semanal, p.1-14, jun 2012

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Dengue and Dengue Hemorrhagic. 1992. Disponível em:

<<http://wonder.cdc.gov/wonder/prevguid/p0000373.asp>>. Acesso em: 17 Agosto de 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Dengue-3 in Central America. Dengue Surveillance Summary, n. 70, 1995.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHAU, T.N. B.; ANDERS, K.L. ; LIEN, L.B.; HUNG, N.T.; HIEU, L.T.M.; TUAN, N.M.; THUY, T.T.; PHUONG, L.T.; THAM, N. T.T.; LANH, M.N.; FARRAR, J.J.; WHITEHEAD, S.S.; SIMMONS, C.P. Clinical and Virological Features of Dengue in Vietnamese Infants. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 4, n. 4, p. e657, Apr. 2010.

CHEN, R.F.; YANG, K.D.; WANG, L.; LIU, J.W.; CHIU, C.C.; CHENG, J.T. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.101, n.11, p.1106-1113, 2007.

CORDEIRO, M. T.; SILVA, A.M.; BRITO, C. A. A.; NASCIMENTO, E.J. M.; MAGALHÃES, M. C. F.; GUIMARÃES, G.F.; SILVA, N.L.; CARVALHO, E.M. F.; MARQUES JR, E. T. A. Characterization of a Dengue Patient Cohort in Recife, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 77, n.6, p. 1128-1134, 2007.

CORTIÑAS, M. G.; GONZÁLEZ, D. V.; CORDEIRO, J. C.; OLIVEIRAS, M. L. L. Dengue hemorrágico: Estudo clínico de 200 pacientes. *Rev. Cub. Med.*, v. 38, p. 13-18, 1999.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

DEEN, J.L.; HARRIS, E.; WILLS, B.; BALMASEDA, A.; HAMMOND, S.N.; ROCHA, C.; DUNG, N.M.; HUNG, N.T.; HIEN, T.T.; FARRAR, J.J . The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*, v. 368, n.9530, p. 170-173, 2006.

DENGUE 3 in Central America. Dengue Branch, San Juan, Puerto Rico. Division of Vector-Borne Infectious. *Dengue surveillance*, v. 70, p. 1-4, 1995.

DENGUE: aspectos clínicos e diagnóstico laboratorial. Disponível em: <http://www.lincx.com.br/lincx/saude_a_z/outras_doencas/dengue_aspectos.asp>. Acesso em: 25 jul. 2012.

DHALIA, R.; MACIEL JUNIOR, M.; CRUZ, F. S.; VIANA, I. F.; PALMA, M. L.; AUGUST, T.; MARQUES JR, E. T. Membrane and envelope virus proteins co-expressed as lysosome associated membrane protein (LAMP) fused antigens: a potential tool to develop DNA vaccines against flaviviruses. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 81, n.4, p. 663-669, 2009.

DONALÍSIO MR. O dengue no espaço habitado. Editora Humanismo, Ciência e Tecnologia, São Paulo, 1999.

FARRAR, J.; FOCKS, D.; GUBLER, D.; BARRERA, R.; GUZMAN, M.G.; SIMMONS, C.; KALAYANAROOJ, S.; LUM, L.; MCCALL, P.J.; LLOYD, L.; HORSTICK, O.; DAYAL-DRAGER, R.; NATHAN, M.B.; KROEGER, A. Towards a global dengue research agenda. *Trop. Med. Int. Health*, v. 12, n. 6, p. 695-699, 2007.

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

Forattini OP. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Brasil. *Revista de Saúde Pública*

FONSECA BAL, FONSECA SNS. Dengue vírus infections. *Curr Opin Pediatr.* 2002; 14(1):67-71.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (Brasil). Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Brasília, DF, 2002. (Série A, Normas e Manuais Técnicos, n. 176).

GAGNON, S.J.; ZENG, W.; KURANE, I.; ENNIS, F.A. Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J. Virol.*, v. 70, n. 1, p. 141-147, 1996.

GHOSH, K.; GANGODKAR, S.; JAIN, P.; SHETTY, S.; RAMJEE, S.; PODDAR, P.; BASU, A. Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy. *J. Electron Microsc.*, v. 57, n. 3, p. 113-118, 2008.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. *BMJ*, v. 324, n. 7353, p. 1563-1566, 2002.

GOMES AC, SOUZA JMP, BERGAMASCHI DP, SANTOS JLF, ANDRADE VR, LEITE OF, RANGEL O, SOUZA SSL, GUIMARÃES NSN, LIMA VLC. 2005. Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, n. 3, p. 480-496, July 1998.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. *Dengue and dengue hemorrhagic*. New York: CAB international, 1997. cap. 1, p. 1-21.

GURUGAMA, P.; GARG, P.; PERERA, J.; WIJEWICKRAMA, A.; SENEVIRATNE, S. L. Dengue viral infections. *Indian J. Dermatol.*, v. 55, n.1, p.68-78, 2010.

GUZMAN, M.G.; ALVAREZ, M.; RODRIGUEZ-ROCHE, R.; BERNARDO, L.; MONTES, T.; VAZQUEZ, S.; MORIER, L.; ALVAREZ, A.; GOULD, E.A.; KOURI, G.; HALSTEAD, S.B. Neutralizing Antibodies after infection with Dengue 1 virus. *Emerg. Infect. Dis.*, v.13, n.2, p.282- 286, 2007.

HAMMON, W. M. C. D.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. *Science*, v.31, p. 1102-1103, 1960.

HEINZ, F. X. ; ALLISON, S. L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.4, p. 450-455, 2001.

HOWE, G.M. *World geography of human diseases*. New York: Academic Press, 1977.

HUBERT, B.; HALSTEAD S.B. Dengue 1 Vírus and Dengue Hemorrhagic Fever, French Polynesia, 2001. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 15, n. 8, Aug. 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/eid>>. Acesso em: 25 de agosto de 2013.

HUNSPERGER, E.A.; YOKSAN, S. ; BUCHY, P.; NGUYEN, V.C.; SEKARAN, S.D.; ENRIA, D.A.; PELEGRINO, J.L.; VÁZQUEZ, S.; ARTSOB, H.; DREBOT, M.; GUBLER, D.J.; HALSTEAD, S.B.; GUZMÁN, M.G.; MARGOLIS, H.S.; NATHANSON, C.M.; RIZZO LIC, N.R.; BESSOF, K.E.; KLIKS, S.; PEELING, R.W. Evaluation of Commercially Available Anti-Dengue Virus immunoglobulin M Tests. *Emerg. Infect. Dis.*, v.15, n.3, p. 436-439, 2009.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.*, v. 40, p. 531-544, 1978.

IZURIETA, R.O.; MACALUSO,M.; WATTS,D.M.; TESH, R.B.; GUERRA,B.; CRUZ,L.M.C. GALWANKAR,S. VERMUND, S.H. Anamnestic Immune Response to Dengue and Decreased Severity of Yellow Fever. J. Glob. Infect. Dis., v. 1, n. 2, p.111-116, 2009.

KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; GREEN, S. Can doctors make an accurate diagnosis of dengue infections at an early stage? Dengue Bull., v.23, p. 1-9, 1999.

KAO, C.L.; KING, C.C.; CHAO, D.Y.; WU, H.L.; CHANG, G.J. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. J. Mibrobiol. Immunol. Infect., v. 38, p. 5-16, 2005.

KITTIGUL, L.; PITAKARNJANAKUL, P.; SUJIRARAT, D.; SIRIPANICHGON, K. The differences of clinical manifestation and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. J. Clin. Virol., v.39, p. 76- 81, 2007.

KOURI, G.P.; GUZMAN, M. G.; BRAVO, J. Dengue hemorrágico en Cuba. Crônica de una epidemia. Bol. Ofic. Sanit. Panam., v.100, n. 3, p. 322-329, 1986.

KUBELKA, C. Febre da Dengue e Dengue Hemorrágico. 2001. Disponível em <<http://www.sbimunologia.com.br/sbinarede/SBInarede5/dengue.htm>>. Acesso em: 26 de Agosto de 2013.

KUHN, J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. Cell., v. 108, p. 717-725, 2002.

KULARATNE, S. A.; GAWARAMMANA, I. B.; KUMARASIRI, P. R. Epidemiology, clinical features, laboratory investigations and early diagnosis of

dengue fever in adults: a descriptive study in Sri Lanka. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36, p.686–692, 2005.

LEE, M.S. ; HWANG, K. P.; CHEN, T.C.; LU, P.C.; CHEN, T.P. Clinical characteristics of dengue and dengue haemorrhagic fever in a medical center of southern Taiwan during the 2002 epidemic. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v.39, n.2, p.121-129, 2006.

LEE, V. J.; LYE, D.C.B.; FERNANDEZ, G.; ONG, A.; LEO, S.Y. Predictive value of simple clinical and laboratory variables for dengue hemorrhagic fever in adults. *J. Clin. Virol.*, v. 42, p.34-39, 2008.

LIMA FR, CRODA MG, MUNIZ DA, GOMES IT, SOARES KR, CARDOSO MR, ET AL. Evaluation of the traditional and revised world health organization classifications of dengue cases in Brazil. *Clinics*. 2013;68(10):1299-1304.

LIN, C.; WAN, S. W.; CHENG, H. J.; LEI, H. Y.; LIN, Y. S. Autoimmune pathogenesis in dengue vírus infection. *Viral Immunol.*, v. 19, n. 2, p. 127-132, 2006.

LUPI, O.; CARNEIRO, G. C.; COELHO, I.C.B. Manifestações mucocutâneas da dengue. *An. Bras. Dermatol.*, v. 82, n. 4, p. 1 - 22, jul./ago. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036505962007000400002> Acesso em: 25 de agosto de 2013.

MAGALHÃES GB, ZANELLA ME. 2013 Comportamento espacial da dengue e sua relação com o clima na região metropolitana de fortaleza. *Revista Brasileira de Climatologia*. Ano 09 Vol.12.

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

MARTINS VE, ALENCAR CH, FACÓ PE, DUTRA RF, ALVES CR, PONTES RJ, GUEDES MI. 2010. Distribuição espacial e características dos criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

MOURA, M.O. O clima urbano de Fortaleza sob o nível do campo térmico. Fortaleza, 2008. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Geografia). Programa de Pós-graduação em Geografia, Universidade Federal do Ceará.

MOURÃO MPG, LACERDA MVG, MACEDO VO, SANTOS JB. Thrombocytopenia in patients with virus infection in the Brazilian Amazon. Platelets. 2007;18(8):605-12, <http://dx.doi.org/10.1080/09537100701426604>.

NARVAEZ F, GUTIERREZ G, PEREZ MA, ELIZONDO D, NUNˆEZ A, BALMASEDA A, ET AL. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(11):e1397, [http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001397](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001397).

NOGUEIRA RMR, MIAGOSTOVICH MP, FILIPIS AMP, PEREIRA MAS, SCHATZMAYR HG. Dengue virus type 2 in Rio de Janeiro, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96: 925-926, 2001.

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

NOISAKRAN, S.; PERNG, G. C. Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/Dengue Shock Syndrome (DSS) in dengue virus infection. Exp. Biol. Med., v.233, n. 4, p. 401–408, 2008.

OISHI, K.; SAITO, M.; MAPUA, C.A.; NATIVIDAD, F.F. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. J. Infect. Chemother., v. 13, n. 3, p. 125-133, 2007.

OLIVEIRA, É. C. L.; PONTES, E.R.J.C.; CUNHA, R.V.; FRÓES, I.B.; NASCIMENTO, D. Alterações hematológicas em pacientes com dengue. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.42, n. 6, p. 682-685, 2009.

OOI, E.-E.; GUBLER, D.J. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. Cad. Saúde Pública, v. 25, supl.1, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue and dengue haemorrhagic fever. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: 27 de julho de 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneve, WHO, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneve, 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Dengue in the Americas: 1980-87. Epidemiol. Bull., v. 10, n. 1, p. 1-8, 1989.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Washington, DC, 2008. Disponível em: <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>>. Acesso em: 18 May 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Re-emergence of dengue in the Americas. Epidemiol. Bull., v.18, n. 2, p. 1-7, 1997.

PESSANHA, J. E. M.; CAIAFFA, W.T.; KROON, E.G.; PROIETTI, F.A. Dengue em três distritos sanitários de Belo Horizonte, Brasil: inquérito soropidemiológico de base populacional, 2006 a 2007. Rev. Panam. Salud

Publica, v.27, n. 4, p.252-258, 2010. RIO DE JANEIRO. Secretaria de Estado de Saúde.

PESSOA M VE, SILVEIRA DA, CAVALCANTE IL, FLORINDO MI. 2013. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. *Entomotropica* 28(2): 75-86.

POERSCH CO. Desenvolvimento e avaliação de métodos moleculares para o diagnóstico da dengue. [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2007.

SAMSI TK, WULUR H, SUGIANTO D, BARTZ CR, TAN R. Some clinical and epidemiological observations on virologically confirmed dengue hemorrhagic fever. *Paediatr Indones.* 1990;30(11-12):293-303.

SCHTZMAYR, H. G. *Viroses emergentes e re-emergentes.* *Cad. Saúde Pública*, v. 17, p. 209-213, 2001.

SENEVIRATNE, S.L.; MALAVIGE, G.N.; SILVA, H.J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 100, p. 608-614, 2006.

SILVA, L. J. da.; ANGERAMI, R. N. *Viroses Emergentes no Brasil.* Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 132 p., 2008.

SILVA, G.F., SILVA, S. J., ROCCO, M. I., Evaluation of commercial kits for detecting the antigen NS1-dengue – São Paulo. *Bepa* ;p.14-26, 2011.

SOUZA, L. J.; COELHO, J. M. C. O; SILVA, E. J.; ABUKATER, M.; ALMEIDA, F. C. R.; FONTE, A. S.; SOUZA, L. A. Acute hepatitis due to dengue virus in a chronic hepatitis patient. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 12, n.5, p. 456-459, 2008.

SCHATZMAYR HG, NOGUEIRA RMR, ROSA APAT. An outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81: 245-246, 1986.

SRICHAIKUL, T.; NIMMANNITA, S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, v. 13, p.261-276, 2000.

SRIVASTAVA VK, SURI S, BHASIN A, SRIVASTAVA L, BHARADWAJ M. An epidemic of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome in Delhi: a clinical study. *Ann Trop Paediatr.* 1990;10(4):329-34.

TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M. L.; GUERRA Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiol. SUS*, v. 8, n. 4, dez. 1999.

VASCONCELOS Pedro F. C, José Wellington O. Lima, Amélia P. A. Travassos da Rosa, Maria J. Timbó, Elizabeth S. Travassos da Rosa, Hascalon R. Lima, Sueli G. Rodrigues e Jorge F. S. Travassos da Rosa. 1998 Epidemia de Dengue em Fortaleza: Inquérito soro-epidemiológico de aleatório. *Revista de Saúde Pública* 32 (5) 447-54.

WICHMANN, O.; STARK, K.; SHU, P.Y.; NIEDRIG, M.; FRANK, C.; HUANG, J.H.; JELINEK, T. Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMC Infect. Dis.*, v. 21, n.6, p. 120, 2006.

YOUNG, P. R.; HILDITCH, P. A.; BLETCHLY, C.; HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, n.3, p.1053-1057, 2000.

ZHANG, Y.; CORVER, J.; CHIPMAN, P. R.; ZHANG, W.; PLETNEV, S. V.; SEDLAK, D.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. C. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.*, v.22, n. 11, p 2604-2261, 2003