



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

AUGUSTO CÉSAR ARAGÃO OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DE QUADROS DENGUE-SÍMILE NO  
CEARÁ, NO ANO DE 2008

FORTALEZA  
2011

**AUGUSTO CÉSAR ARAGÃO OLIVEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DE QUADROS DENGUE-SÍMILE NO  
CEARÁ, NO ANO DE 2008**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Malta Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu

FORTALEZA  
2011

AUGUSTO CÉSAR ARAGÃO OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DE QUADROS DENGUE-SÍMILE NO CEARÁ, NO ANO  
DE 2008

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Malta Lima (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Izabel Florindo Guedes  
Universidade Estadual do Ceará- UECE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Raquel Araújo da Silva  
Universidade Estadual do Ceará- UECE

---

Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
Faculdade de Medicina - Christus

*A Deus, autor da criação, cujo Amor dá  
sentido à minha ínfima existência;*

*Aos meus pais, exemplo de amor, luta e  
perseverança na vida e nos caminhos de Deus.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, sem o qual nada teria sido possível, pelo Seu sustento e providência durante todo o mestrado e vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Malta, por sua orientação, zelo, dedicação, paciência, simplicidade, humildade, disponibilidade e acessibilidade e por me ter me ensinado tantas coisas, além de ter trabalhado ativamente no desenvolvimento desse projeto. Sem a senhora, este trabalho não teria sido possível. Muito obrigado por tudo!

Ao Curso de Pós-graduação em Patologia, pela oportunidade.

Ao CNPq, pelo financiamento.

Ao Setor de Parasitologia, pela eterna acolhida e por ter sido minha segunda casa durante tanto tempo, além da estrutura laboratorial e “familiar” que me ofereceu.

Aos professores do mestrado, pelos conhecimentos transmitidos.

À Dra Margarida, que, muito além da coordenação do mestrado, sempre é um grande apoio e auxílio. Obrigado, doutora!

Ao Lacen, especialmente na pessoa da Dr<sup>a</sup> Fernanda, pela atenção e pelas amostras cedidas, essenciais para a realização desta pesquisa.

Ao Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, por toda a estrutura, reagentes e técnicas disponibilizadas.

À Teiliane, sempre muito prestativa, cuja objetividade muito me auxiliou na redação deste dissertação. Obrigado pela amizade sincera e fiel.

À Raíssa e à Claudênia, que, de forma tão compromissada, me ajudaram tanto, principalmente nas fases iniciais desta pesquisa.

À minha namorada, Camila Silveira, por seu amor, por todo apoio e incentivo que sempre me infunde. Te amo, minha preta!

A todos, não-citados, que contribuíram para a realização desta pesquisa o meu muito obrigado!

*“Em realidade, todas as coisas, todos os acontecimentos, para quem sabe lê-los com profundidade, encerram uma mensagem que, em definitivo, remete a Deus” (Beato João Paulo II).*

## RESUMO

A dengue é a arbovirose mais importante no mundo, causando mais de 100 milhões de casos de dengue clássico (DC) e mais de 250 mil casos de febre hemorrágica da dengue (FHD), anualmente. A infecção com o vírus dengue (DENV), família *Flaviviridae*, causa um amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde formas assintomáticas a quadros graves, potencialmente fatais, como os casos hemorrágicos e/ou de choque hipovolêmico. Na maioria das vezes, a doença se apresenta com sintomas inespecíficos. Dessa forma, torna-se difícil diferenciar a dengue de outros casos febris de natureza infecciosa como leptospirose, febre amarela e outras arboviroses, apenas com base nas manifestações clínicas iniciais. Diante disso, o objetivo deste estudo foi identificar a etiologia de 82 pacientes com quadro clínico semelhante ao de dengue e com resultado negativo no isolamento viral (IV) para o DENV. O IV foi realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE), em 2008. Neste estudo, as amostras desses pacientes foram avaliadas para dengue por meio da detecção de anticorpos específicos contra o vírus pela técnica de IgM-ELISA (PanBio Diagnostics®) e pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR). As amostras negativas para dengue foram testadas para a detecção de anticorpos IgM específicos contra bactérias do gênero *Leptospira* por ELISA (PanBio Diagnostics®). Foram testadas também amostras de 73 pacientes quanto a infecção por hantavírus, através da detecção de anticorpos específicos (IgM e IgG) contra antígenos de hantavírus e RT-PCR. Trinta e cinco pacientes (35/82; 42,68%) foram positivos para dengue, sendo que destes, todos foram positivos no IgM-ELISA e 4 foram positivos também no RT-PCR. Das 47 amostras dengue-negativas, apenas 43 foram testadas para infecção por *Leptospira* devido ao volume insuficiente das amostras. Seis pacientes (6/82; 7,32%) foram positivos IgM-ELISA para leptospirose. Três pacientes foram positivos para hantavírus, entretanto apenas 1 (1/82; 1,22%) foi positivo no IgM-ELISA e 2, no IgG-ELISA. A infecção dos 35 (42,68%) pacientes negativos em todos os testes de detecção de infecção aguda foi classificada como síndrome febril indiferenciada (SFI). Esta é a primeira evidência de infecção por hantavírus no Estado do Ceará. Essas doenças podem causar infecção clinicamente indistinguível da dengue e, portanto, deveriam ser incluídas no diagnóstico diferencial no contexto dessas síndromes febris.

**Palavras-chave:** dengue, diagnóstico diferencial, leptospirose, hantavírus.

## ABSTRACT

Dengue is the most important arbovirolosis in the world, causing approximately 100 millions cases of classical dengue fever (DF) and more than 250.000 of dengue hemorrhagic fever (DHF), annually. The dengue virus (DENV) belongs to the *Flaviviridae* family and its infection causes a wide clinical spectrum ranging from asymptomatic forms to severe manifestations, potentially fatal, as in hemorrhagic forms or dengue shock syndrome (DSS). Most of times the disease presents inespecific symptoms. Thus, DF is difficult to distinguish from other acute febrile illnesses, including arboviral ones and leptospirosis, based only on clinical criteria. Given this, the aim of this study was to identify the etiology of 82 patients with clinical picture of dengue-like illness, negative in DENV isolation. The virus isolation was done in Laboratorio Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE), Brazil, in 2008. In the present study, the serum samples from these patients were evaluated for dengue infection by IgM-ELISA (PanBio Diagnostics®) and RT-PCR, following Lanciotti *et alli* protocol (1992). Negative samples to dengue infection were tested to leptospirosis by IgM-ELISA (PanBio Diagnostics®). Seventy-three patients were also tested for hantavirus infection by IgM and IgG by ELISA and RT-PCR. Dengue infection was diagnosed in 35 patients (35/82; 42.68%) of which all were positive in IgM-ELISA, and 4 were also positive in RT-PCR. Of 47 (47/82; 57.32%) DENV-negative samples, only 43 were tested to evaluate leptospiral infection because of insufficient sample volume. Six patients (6/82; 7,32%) were positive to leptospirosis in the IgM-ELISA. Three patients were positives to hantavirus infection, but only 1 (1/82; 1,22%) was positive in the IgM-ELISA and the two others, in the IgG-ELISA. Thirty and five patients (35/82; 42,68%) remained negative em all tests. They were classified as having other febril illness (OFI). To the best of our knowledge, this is the first evidence of hantavirus infection in humans in the state of Ceará, Brazil. These diseases, including leptospirosis, may cause infection clinically indistinguishable from DF and therefore should be included in the differential diagnosis of febrile illnesses in this setting.

**Key-words:** dengue, differential diagnosis, leptospirosis, hantavirus.



## LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

Ag – antígeno

cDNA – DNA complementar

CPVFMRP-USP - Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-  
Universidade de São Paulo

DC – dengue clássico

DCC - dengue com complicações

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

DO - densidade óptica

ELISA - ensaio imunoenzimático

FHD- febre hemorrágica da dengue

FHSR - febre hemorrágica com síndrome renal por hantavírus

IgG – imunoglobulina G

IH - teste de Inibição da Hemaglutinação

IgM – imunoglobulina M

IV – isolamento viral

LACEN-CE – Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará

MAC-ELISA - ELISA para detecção de anticorpos IgM

MAT – teste de aglutinação microscópica ou de microaglutinação

NS – proteína não-estrutural

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – reação em cadeia da polimerase

qPCR - PCR em tempo real

RNA – ácido ribonucléico

RT-PCR – PCR precedido de transcrição reversa

SCD - síndrome do choque por dengue

SCPH - síndrome cardiopulmonar por hantavírus

SFI - síndrome febril indiferenciada

SINAN - sistema de informações de agravos de notificação

sNS1 – proteína não-estrutural 1 na forma secretada

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Países/áreas sob o risco da transmissão de dengue .....	12
<b>Figura 2</b> - Principais testes diagnósticos de dengue na infecção primária e secundária .....	24
<b>Tabela 1</b> – <i>Primers</i> utilizados para amplificação do genoma do vírus dengue e seus sorotipos	38
<b>Tabela 2</b> - <i>Primers</i> utilizados para amplificação do genoma de hantavírus.....	42
<b>Tabela 3</b> - Classificação prévia descrita na ficha do SINAN e distribuição por sexo dos pacientes	43
<b>Tabela 4</b> - Classificação prévia descrita na ficha do SINAN e distribuição das formas clínicas por faixa etária.....	44
<b>Tabela 5</b> - Resultado dos testes diagnósticos de dengue e distribuição por sexo dos pacientes.....	45
<b>Tabela 6</b> - Resultado dos testes diagnósticos de <i>Leptospira</i> e distribuição por sexo dos pacientes.....	46
<b>Tabela 7</b> - Classificação da etiologia febril dos pacientes reagentes para leptospirose, na época da epidemia e após realização do ELISA específico para leptospirose.....	46
<b>Tabela 8</b> - Resultado dos testes diagnósticos de hantavírus e distribuição por sexo dos pacientes.....	48
<b>Tabela 9</b> - Características clínico-laboratoriais dos pacientes com evidência sorológica de infecção por hantavírus.....	48
<b>Tabela 10</b> - Classificação da etiologia febril dos pacientes reagentes para hantavírus, na época da epidemia e após realização dos testes específicos para hantavírus.....	49
<b>Tabela 11</b> - Distribuição por sexo dos pacientes negativos em todos os testes diagnósticos de dengue, leptospirose e hantavírus.....	50
<b>Tabela 12</b> - Distribuição dos pacientes de acordo com a faixa etária e diagnósticos de infecção aguda.....	51
<b>Tabela 13</b> - Distribuição dos pacientes de acordo com o mês da infecção aguda.....	52
<b>Gráfico 1</b> – Distribuição mensal dos casos de dengue detectados .....	45
<b>Gráfico 2</b> - Distribuição mensal dos casos de leptospirose.....	47
<b>Gráfico 3</b> - Distribuição mensal dos casos de hantavirose.....	49
<b>Gráfico 4</b> – Distribuição mensal dos casos de SFI.....	51
<b>Gráfico 5</b> - Distribuição mensal de casos de dengue, leptospirose, hantavirose e casos de outras síndromes febris.....	52

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1 Dengue</b> .....	12
1.1.1 Epidemiologia da dengue .....	12
1.1.2 Agente etiológico da dengue .....	14
1.1.3 Transmissão da dengue .....	16
1.1.4 Manifestações clínicas da dengue .....	18
a) Caso suspeito de dengue .....	18
b) Dengue clássica .....	18
c) Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque por Dengue (SCD).....	19
d) Dengue com Complicações .....	20
1.1.5 Patogênese da FHD .....	20
1.1.6 Diagnóstico de Dengue .....	21
1.1.7 Diagnóstico diferencial da dengue .....	25
<b>1.2 Leptospirose</b> .....	26
1.2.1 Epidemiologia da leptospirose .....	26
1.2.2 Agente etiológico da leptospirose .....	27
1.2.3 Transmissão da leptospirose .....	27
1.2.4 Manifestações clínicas da leptospirose .....	28
1.2.5 Diagnóstico da leptospirose .....	29
<b>1.3 Hantavírus</b> .....	30
1.3.1 Epidemiologia da hantavirose .....	30
1.3.2 Agente etiológico da hantavirose .....	31
1.3.3 Transmissão da hantavirose .....	31
1.3.4 Manifestações clínicas da hantavirose .....	32
1.3.5 Diagnóstico da hantavirose .....	32
<b>1.4 Justificativa</b> .....	33
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	34
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	34
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	34
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	35
<b>3.1 Delineamento do estudo</b> .....	35
<b>3.2 Caracterização das amostras</b> .....	35
<b>3.3 Critérios de inclusão no estudo e obtenção de dados clínicos</b> .....	35
<b>3.4 Técnicas Laboratoriais</b> .....	36
<b>3.4.1 Dengue</b> .....	36
a) Sorologia .....	36
b) Extração do material genético .....	37
c) RT-PCR .....	37
<b>3.4.2 Leptospirose</b> .....	38
a) Sorologia .....	38
<b>3.4.3 Hantavírus</b> .....	39
a) Sorologia .....	39
b) Extração do material genético .....	41

c) Confeção do DNA complementar .....	41
d) PCR .....	42
<b>3.5 Considerações éticas .....</b>	<b>42</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Dados obtidos das fichas do SINAN.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Dengue .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Leptospira .....</b>	<b>46</b>
<b>4.4 Hantavirus .....</b>	<b>47</b>
<b>4.5 SFI .....</b>	<b>50</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6.CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>8. ANEXO I .....</b>	<b>92</b>
<b>9. ANEXO II .....</b>	<b>98</b>

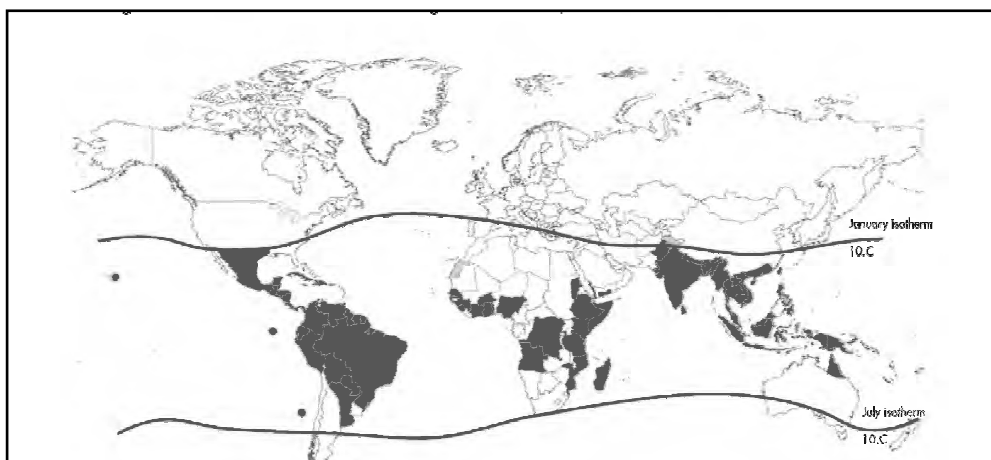
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Dengue

#### 1.1.1 Epidemiologia da dengue

A dengue é uma doença infecciosa aguda viral, endêmico-epidêmica, que constitui um crescente problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente em áreas urbanas e suburbanas (CORDEIRO *et al.*, 2009; WHO, 2011). Ela é a mais importante e mais comum patologia viral veiculada por artrópodes, em termos de morbi-mortalidade, causando mais morte e doença do que qualquer outra arbovirose (MCBRIDEA & BIELEFELDT-OHMANN, 2000; GUZMAN & KOURI, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dengue está na categoria das principais doenças tropicais negligenciadas que não estão sob controle (LINDOSO & LINDOSO, 2009).

A dengue afeta mais de 100 países nas regiões tropicais e subtropicais da África, Américas, oriente do Mediterrâneo, Sudeste da Ásia e oeste do Pacífico (figura 1). As duas últimas regiões são as mais afetadas. Ela põe em risco mais de 2,5 bilhões de pessoas – equivalente a dois quintos da população mundial - que habitam nessas regiões. A OMS estima que ocorrem entre 50 milhões de infecções por dengue em todo o mundo, anualmente, ocasionando de 250.000 a 500.000 casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) e 24.000 óbitos a cada ano (GUBLER & MELTZER, 1999; GUBLER, 2002; WHO, 2000; 2010). O número de casos tanto de dengue clássico (DC) como de FHD aumentou drasticamente nas últimas décadas, e a distribuição geográfica da doença passou a atingir a maioria dos países tropicais (EDELMAN, 2005).



**Figura 1.** Países/áreas sob o risco da transmissão de dengue. Fonte: WHO, 2009

Na década passada, a dengue foi um fenômeno recorrente nas regiões tropicais. Durante o ano de 2002, mais de 30 países latino-americanos relataram mais de um milhão de casos de dengue, com um grande número de casos hemorrágicos. Cada vez mais os casos graves de FHD e Síndrome do Choque por Dengue (SCD) são relatados em crianças, que apresentam a maior parte da morbidade da doença (GUBLER & MELTZER, 1999, DAS & MONGKOLAUNGKON & SURESH, 2009).

A FHD é responsável por elevada morbidade e mortalidade, especialmente de mortalidade infantil no Sudeste Asiático. Nas Américas, todos os grupos etários são ainda suscetíveis, e mesmo a forma menos severa da doença é responsável por grande perda econômica, pois acomete principalmente a população economicamente ativa. Antes de 1970, apenas 9 países apresentaram epidemias de FHD, um número que cresceu mais do que 4 vezes em 1995 (WHO, 2010). Na realidade, o Brasil está enfrentando uma situação hiper-epidêmica com um aumento do número de casos de FHD/SCD em crianças, algumas vezes fatais (DA-ROCHA & TAUILL, 2009 ; SAN-MARTÍN *et al.*, 2010).

Durante epidemias de dengue, as taxas de infecção entre aqueles que não haviam sido expostos previamente ao vírus, normalmente são de 40 a 50%, mas podem atingir taxas de 80 a 90%, sendo um dos fatores responsáveis pela alta susceptibilidade da população afetada pela epidemia (WHO, 2010).

No Brasil, a partir de 1986 a dengue tornou-se endêmica no país, com a circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 e, nas épocas mais quentes e úmidas, têm-se relatos de novos casos e possíveis epidemias (GUZMAN & KOURI, 2003). Desde 1996 a doença deixou de ser intermitente e passou a ocorrer a cada ano (LINDOSO & LINDOSO, 2009).

O primeiro isolamento viral do vírus dengue no Brasil foi relatado em 1981 em Roraima, onde o sorotipo 1 e 4 (DENV-1 e DENV-4, respectivamente) foram isolados e associados com casos de dengue. Os sorotipos 1 e 2 (DENV-1 e DENV-2, respectivamente) foram introduzidos no Rio de Janeiro em 1985 e 1990, respectivamente; então ambos co-circularam por 10 anos causando vários surtos no país, incluindo muitos casos de febre hemorrágica. Em 2000, o sorotipo 3 (DENV-3) foi introduzido no Rio de Janeiro e então se espalhou por todo o país, co-circulando com DENV-1 e DENV-2. Finalmente, o DENV-4 foi isolado de casos de FHD em Manaus, em 2005, sugerindo sua circulação nessa cidade (FONSECA & FIGUEIREDO, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Em julho de 2010, o sorotipo 4 foi isolado em Roraima, após 28 anos da sua ausência no Estado (TEMPORÃO *et al.*, 2011). Depois, mais 2 casos autóctones foram detectados em Manaus, sendo um deles em novembro de 2010 e o outro em janeiro de 2011 (BRASIL, 2011). Após este episódio, em

março do mesmo ano, foram detectados 2 casos de DENV-4 na Bahia e, poucos dias depois, 2 casos também foram confirmados no Rio de Janeiro, sendo que este consistiu no primeiro relato confirmado da presença desse sorotipo na região Sudeste (SALVADOR, 2011; FIOCRUZ, 2011).

O Estado do Ceará é um dos mais importantes em termos de números de notificações de DC e FHD (CUNHA *et al.*, 1998). A notificação dos casos no Estado iniciou-se desde 1986, após isolamento do sorotipo DENV-1. Já os primeiros casos confirmados de FHD ocorreram em 1994, registrando 12 óbitos e atingindo uma alta letalidade de 48% e, a partir de 1998, todos os anos apresentaram casos hemorrágicos. Os anos de 2003, 2007 e 2008 se destacam quanto ao número de casos hemorrágicos com, respectivamente, 291, 300 e 448 ocorrências. No ano de 2008, com 44.244 casos confirmados, a proporção foi de 100 casos de DC para cada caso de FHD. Atualmente muitos municípios possuem a presença do *Aedes aegyti* e, ao invés de erradicação, a perspectiva para o país é o controle do vetor (CEARÁ, 2010).

No Ceará, os depósitos infestados são principalmente aqueles utilizados para o armazenamento de água, como caixas d'água, tambores, potes de barro, tinas, tanques, etc. Além disso, nos últimos 8 anos, o Estado tem registrado casos em todos os meses do ano, entretanto com predomínio no primeiro semestre do ano (CEARÁ, 2010).

Em relação ao sexo, a preponderância é do sexo masculino, com cerca de 60% dos casos confirmados no Estado a cada ano. Além disso, o número de crianças e adolescentes acometidos vem aumentando anualmente, podendo ser observado pela mediana de idade que passou de 38 anos em 2001 para 18 anos em 2008 (CAVALCANTI *et al.*, 2011).

Até o presente momento, não existem vacinas licenciadas para a prevenção de dengue, nem terapias específicas para deter ou limitar a replicação do vírus ou mesmo modular a gravidade dos sintomas dos pacientes afetados, o diagnóstico preciso e precoce é essencial para uma vigilância eficaz e para a instituição adequada de medidas de controle dos surtos (TRICOU *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Agente etiológico da dengue

A dengue é causada por vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae*. O vírus possui 4 sorotipos, estreitamente relacionados, porém antigenicamente distintos: sorotipo dengue 1, 2, 3 ou 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (HENCHAL & PUTNAK, 1990; GUBLER, 1998; HALSTEAD, 2007; WHO, 2009).

Qualquer um dos sorotipos pode causar doença e, após a infecção por um deles, desenvolve-se uma imunidade protetora de longa vida contra este sorotipo específico. Essa imunidade confere proteção parcial, porém transiente, contra infecções subsequentes pelos outros sorotipos. Algumas evidências sugerem que infecções sequenciais por diferentes sorotipos aumentam o risco de desenvolver FHD (WHO, 2010).

Estruturalmente, o vírus caracteriza-se por ser de RNA, envelopado e esférico, com diâmetro aproximado de 50nm. O RNA genômico é de fita simples e de polaridade positiva, e seu comprimento aproximado é de 11 kilobases. Um capsídeo icosaédrico reveste o RNA viral e, cercado o nucleocapsídeo, está uma bicamada lipídica contendo as proteínas E e M. O genoma do vírus dengue codifica suas proteínas na seguinte ordem: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (CHAMBERS *et al.*, 1990; HENCHAL & PUTNAK, 1990). A tradução do genoma do vírus gera um precursor de uma grande poliproteína, que é processado pelas células do hospedeiro e pelas proteases virais, que originam cada uma das proteínas do vírus (CHAMBERS *et al.*, 1990; DUSSART *et al.*, 2006).

As proteínas estruturais desse vírus consistem nas proteínas C, prM-M e E. A proteína C, interage com o RNA viral, formando o nucleocapsídeo. A proteína prM, após sofrer clivagem na sua porção N-terminal, origina a proteína M, que está presente no vírus maduro (HUNG *et al.*, 1999). A glicoproteína E possui conformação tridimensional, importante para a exposição dos determinantes antigênicos virais. Os anticorpos específicos contra o vírus reconhecem os epítomos da proteína E, promovendo lise do envelope ou bloqueio de seus receptores. Essa ação resulta na neutralização viral, uma vez que a entrada do vírus na célula através da ligação do vírus ao receptor de membrana é mediada pela proteína E, localizada nas espículas do envelope do vírus dengue. Os epítomos esta proteína são os mais importantes determinantes antigênicos do vírus e, por isso, definem a produção de anticorpos específicos para o sorotipo viral e para o gênero *Flavivirus* (CHAMBERS *et al.*, 1990). A estrutura tridimensional desta proteína consiste num complexo dimérico com duas subunidades iguais. Possui três regiões: 1) região central da molécula, contendo o radical aminoterminal; 2) região com a maior parte das ligações do dímero; e 3) região com a porção C terminal, relacionada à virulência de determinadas cepas virais (MOTA *et al.*, 2005). Quando os dímeros são submetidos a pH ácido (pH < 6,5), sofrem uma transformação conformacional e se rearranjam em trímeros. Esse rearranjo é fundamental para a fusão do envelope viral com a membrana endossômica, processo que se dá após a ligação do vírus ao receptor de membrana, determinando a entrada da partícula no citoplasma por pinocitose (CHAMBERS *et al.*, 1997).



As proteínas não-estruturais (NS) incluem sete proteínas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (CHAMBERS *et al.*, 1990). A NS1 é uma glicoproteína altamente conservada, aparentemente vital na viabilidade viral. Ela possui atividade na maturação viral e é encontrada na superfície, ligada à membrana da célula infectada, sendo, também, secretada no espaço extracelular (CHAMBERS *et al.*, 1990; SCHLESINGER *et al.*, 1990; MACKENZIE & JONES & YOUNG, 1996; KUMARASAMY *et al.*, 2007). A forma hexamérica solúvel da proteína NS1, liberada apenas de células infectadas dos mamíferos, mas não dos mosquitos, é também encontrada circulando no soro de pacientes na fase aguda, por isso tem sido utilizada para diagnóstico de dengue na fase aguda da doença (CROOKS *et al.*, 1994; FLAMAND *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2000). A proteína NS2 é dividida nas porções NS2A e NS2B, sendo esta última portadora da atividade proteolítica. As proteínas NS3 e NS5 têm sido associadas com os processos de replicação e transcrição do RNA viral. Atividades de protease e trifosfatase/helicase foram atribuídas à proteína NS3, e a atividade de RNA polimerase, à NS5 (CHAMBERS *et al.*, 1990). A proteína NS4 é clivada nas porções NS4A e NS4B e ambas, juntamente com a NS2A e NS2B, associam-se à membrana da célula infectada durante o processo de maturação viral (MONATH & HEINZ, 1996).

### 1.1.3 Transmissão da dengue

Os vírus são transmitidos aos seres humanos pela picada de fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*, infectadas por um dos sorotipos. As espécies de maior importância mundial envolvidas na transmissão são *A. aegypti* e *Aedes albopictus* (*A. albopictus*), sendo o primeiro o de maior importância epidemiológica nas Américas (HENCHAL & PUTNAK, 1990; WHO, 2010). Os mosquitos infectam-se por transmissão transovariana, ou após alimentarem-se de indivíduos virêmicos (JOSHI & MOURYA & SHARMA, 2002; WHO, 2010). Somente depois de um período de incubação extrínseco de 8 a 12 dias é que são capazes de transmitir o vírus para os seres humanos. Após a picada do mosquito, segue-se um período de incubação de 3 a 14 dias depois do qual o indivíduo infectado adoece (WHO, 2000).

A transmissão transovariana do vírus nos mosquitos assegura a presença do patógeno independentemente de sua alimentação a partir de sangue humano infectado pelo DENV. Esta retenção do vírus ao longo das gerações dos mosquitos pode ser responsável pela manutenção do DENV na natureza durante períodos inter-epidêmicos da doença, sendo uma possível causa da reemergência de dengue em áreas previamente expostas ao vírus, além de poder ter importância por amplificar um surto em andamento (ANGEL & JOSHI, 2008; ANGEL & SHARMA & JOSHI, 2008).

No Brasil, a transmissão da dengue está associada principalmente ao *A. aegypti*, estando relacionada especialmente a fatores como a pobreza, condições precárias de saneamento e educação, bem como a temperatura e urbanização desordenada, dentre outros fatores que favorecem sua expansão e dispersão desde sua reintrodução em 1976. Sua elevada capacidade de adaptação ao ambiente urbano não permite o controle de sua população por métodos tradicionais (LINDOSO & LINDOSO, 2009).

O *A. albopictus* é um mosquito oriundo da Ásia que foi introduzido no Brasil por navios mercantes. Este mosquito é menos antropofílico do que o *A. aegypti*, e pode ser encontrado em áreas urbanas e rurais (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Desde sua entrada no território brasileiro, tem sido possível observar sua notável expansão, de forma que apenas 6 Estados brasileiros ainda não relataram a ocorrência dessa espécie. São eles: Amapá, Roraima, Acre, Tocantins, Piauí e Sergipe (SANTOS, 2003; MARTINS *et al.*, 2010). Além de poder atuar como vetor da dengue e da febre amarela, já foi mostrado que, sob condições laboratoriais, a espécie mostrou-se competente à infecção e à transmissão de 22 arbovírus, realçando a importância epidemiológica de seu registro (MOORE & MITCHELL, 1997).

Embora sua ocorrência já tenha sido reportada na maioria dos Estados do país, o *A. albopictus* ainda não foi incriminado como responsável por surtos de dengue no Brasil. Entretanto, essa possibilidade não deve ser descartada, uma vez que ele tem sido bem sucedido na adaptação ao ambiente urbano, o que o torna vetor em potencial do vírus dengue onde esse mosquito ocorre, incluindo a cidade de Fortaleza, uma vez que a ocorrência dessa espécie já foi relatada desde 2006 (MARTINS *et al.*, 2006; 2010).

Há ainda os riscos de transmissão de dengue por transfusões, por picada de agulha, exposição mucocutânea e *intrapartum*, assim como pode ocorrer com os outros vírus transmissíveis por transfusão (RAMOS, 2008). Mohammed e colaboradores (cols.) (2008) encontraram RNA viral e vírus viáveis que puderam ser detectados e cultivados, respectivamente, a partir de doações de sangue, em Porto Rico. Os mesmos autores sugerem que a via de transmissão transfusional é mais comum do que se documenta e que, embora esse tipo de transmissão pareça rara, é admissível supor que esteja sendo negligenciada e que, caso permaneça não investigada, a infecção sub-clínica ou sobreposta a outras patologias continuará quase invisível, podendo ser propagada (RAMOS, 2008; MOHAMMED *et al.*, 2008).

Apesar das outras possibilidades de transmissão, a propagação da dengue é atribuída principalmente à expansão geográfica dos sorotipos e de seus mosquitos vetores, dos quais está o *A. aegypti* como o predominante entre as espécies urbanas. Um aumento rápido em

populações de mosquitos urbanos está levando a um número cada vez maior de pessoas em contato com este vetor, especialmente em áreas favoráveis à reprodução do mosquito como, por exemplo, em locais da residência onde a água é armazenada e onde os serviços de eliminação de resíduos sólidos são inadequados (WHO, 2010).

#### 1.1.4 Manifestações clínicas da dengue

As manifestações clínicas podem variar desde forma assintomática, forma clássica, até as formas mais graves que podem ser fatais: dengue com complicações (DCC), FHD e SCD (HUANG *et al.*, 2006; MCBRIDE, 2009; BRASIL, 2011). As formas graves são de difícil diagnóstico, podendo ser facilmente confundidas com outras doenças caracterizadas por distúrbios da permeabilidade capilar (HENCHAL PUTNAK, 1990).

##### a) Caso suspeito de dengue

O Ministério da Saúde do Brasil define como casos suspeito de dengue todo indivíduo que esteja apresentando doença febril aguda por, no máximo, 7 dias, e presença concomitante de 2 ou mais dos seguintes sinais ou sintomas: cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia, prostração, artralgia ou exantema. Esses sinais/sintomas devem estar associados à epidemiologia local onde o indivíduo com a suspeita reside ou visitou nos últimos 15 dias, quanto à transmissão de dengue e presença do *A. aegypti* e podem estar ou não associadas à hemorragias. Todo caso suspeito de dengue deve ser notificado à vigilância epidemiológica e, nos casos graves, a notificação deve ser imediata (BRASIL, 2011).

##### b) Dengue clássica (DC)

A DC caracteriza-se por uma enfermidade febril aguda, apresentando cefaléia frontal, dores musculares, articulares e exantema. A primeira manifestação clínica é a febre, de intensidade variável, geralmente alta, associada à cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, prostração e exantema. A febre pode durar de dois a sete dias, em média cinco dias. A doença tem a duração média de dez dias, sendo que a partir do 5º dia há diminuição da febre. Podem ocorrer manifestações hemorrágicas de pequena intensidade em casos de dengue clássico, como epistaxe, gengivorragia e hematúria (HENCHAL & PUTNAK, 1990).

Um caso confirmado de dengue clássica é definido como um caso suspeito que foi confirmado ou laboratorialmente ou, durante uma epidemia, pelos critérios clínicos e epidemiológicos. Mas antes de se constatar a epidemia, os primeiros casos devem ser confirmados por critério laboratorial (BRASIL, 2011).

c) Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque por Dengue (SCD)

A FHD e a SCD se caracterizam pelo extravasamento de fluidos e proteínas do leito vascular para os espaços intersticiais e cavidades serosas, ocasionado pelo aumento generalizado da permeabilidade vascular (BRASIL, 2011). Geralmente se manifestam com os mesmos sintomas iniciais e inespecíficos da DC, ou seja, com febre (ocasionalmente 40 a 41°C), mantendo-se elevada por período de 2 a 7 dias, quando então apresenta queda súbita (RIGAU-PERÉZ, 1998).

A FHD/SCD tem sido definida, como um caso confirmado, nas situações em que há febre de sete dias ou menos, com tendências a manifestações hemorrágicas associadas à trombocitopenia ( $<100.000/\text{mm}^3$ ); diagnóstico laboratorial específico positivo e extravasamento plasmático, evidenciado por um dos seguintes dados clínicos: derrame pleural, ascite, elevação do hematócrito em mais de 20% acima dos valores basais e/ou choque, geralmente acompanhado de valores elevados do hematócrito (RIGAU-PERÉZ, 1998; BRASIL, 2011).

Dentre as manifestações hemorrágicas, estão presentes as petéquias, púrpuras, equimoses e epistaxes; hemorragia gastrointestinal e hematúria são menos frequentes. Uma baixa contagem de plaquetas ( $\leq 100.000/\text{mm}^3$ ) é usualmente encontrada entre o terceiro e oitavo dias de doença. Quando o diagnóstico não é realizado rapidamente e, portanto a intervenção clínica não é adequada, alguns pacientes com FHD desenvolvem choque, que pode ser leve e transitório ou severo com pulso e pressão sanguínea não detectáveis, que em alguns casos pode levar a morte (RIGAU-PÉREZ, 1998).

De acordo com a OMS, a FHD é classificada em quatro graus de gravidade, grau I, II, III e IV. No grau I, a febre é acompanhada de sintomas inespecíficos e a única manifestação hemorrágica observável é induzida, a prova do laço positiva. No grau II, estão presentes as mesmas manifestações do grau I mais a presença de manifestações hemorrágicas espontâneas leves, como epistaxe, sangramento de pele, gengivorragia, etc. No grau III, o paciente apresenta colapso circulatório, com pulso fraco e rápido, estreitamento da pressão arterial ou hipotensão, pele fria e pegajosa e inquietação. No grau IV, o paciente encontra-se em choque profundo, que constitui a SCD (BRASIL, 2011).

A classificação final de um caso de SCD se dá após a confirmação e caracterização como um caso confirmado de FHD, de grau IV. Apresenta-se com sinais de insuficiência circulatória, que pode ser evidenciada pelos seguintes achados: pulso rápido e fraco, diminuição da pressão vascular periférica ( $\leq 20\text{mmHg}$ ). O choque é de início abrupto,

ocorrendo na fase da defervescência, geralmente entre 2 a 5 dias após o início da febre. É de curta duração, não excedendo 48 horas, na maioria dos casos. É resultado da hipovolemia causada pelo extravasamento plasmático, que também gera aumento do hematócrito, a diminuição do nível plasmático de albumina, do débito cardíaco e do urinário, a redução da perfusão tecidual e arterial, e o choque. Caso não tratado adequadamente, o paciente corre risco de óbito ou de disfunção orgânica pós-choque (BRASIL, 2011).

#### d) Dengue com complicações (DCC)

A forma DCC é todo caso grave que não pode ser classificado como FHD por não preencher todos os critérios de FHD. A apresentação de pelo menos uma das seguintes alterações clínicas é suficiente para a confirmação final de um caso de DCC: alterações neurológicas, insuficiência hepática, hemorragia digestiva volumosa, disfunção cardiorrespiratória, derrame pleural, pericárdico e ascite; plaquetopenia inferior a  $20.000/\text{mm}^3$ , contagem de leucócitos  $\leq 1.000/\text{mm}^3$ , ou qualquer caso suspeito de dengue fatal que não possua todos os requisitos para a classificação final de FHD (BRASIL, 2011).

#### 1.1.5 Patogênese da FHD

A patogênese da forma hemorrágica da dengue ainda não está bem definida e algumas hipóteses existem para tentar explicá-la. A de maior aceitação refere-se a um fenômeno denominado “aumento da infecção mediada por anticorpos”. Segundo esta hipótese, anticorpos adquiridos em infecções prévias por um determinado sorotipo do vírus dengue não seriam neutralizantes ou teriam títulos muito baixos para neutralizarem o sorotipo responsável pela infecção atual. Estes anticorpos se ligariam a outros epítomos do sorotipo responsável pela infecção atual, comuns aos 4 sorotipos virais, mas não o neutralizaria, formando então, complexos vírus-anticorpos que facilitariam a penetração do vírus opsonizado em células monocitárias, que são as células-alvo para a replicação viral. Células mononucleares expressam na sua superfície receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, região implicada na ligação dos complexos vírus-anticorpos a estas células, facilitando assim a internalização dos complexos vírus-anticorpos durante a reciclagem das membranas celulares. Esta facilidade de penetração do vírus nestas células resulta em uma maior carga viral, maior intensidade da resposta imune a esta infecção com liberação de citocinas e aminas vasoativas e como consequência uma doença mais grave (HALSTEAD, 1988).

As proteínas não estruturais (NS1-NS5), que são expressas associadas às membranas das células infectadas e na forma secretada, também têm sido implicadas na patogênese da dengue grave. Evidências apontam para o envolvimento de NS1 na replicação do RNA viral (YOUNG *et al.*, 2000). Os níveis plasmáticos de NS1 secretada (sNS1) correlacionam-se com títulos virais, sendo maior em pacientes com FHD do que em pacientes com DC (LIBRATY *et al.*, 2002). Além disso, elevados níveis de sNS1 livre, dentro de 72 horas do início da doença, indica risco de evolução para FHD e níveis muito altos dessa proteína são detectados na fase aguda de pacientes com infecção secundária por dengue, mas não em infecções primárias. Isso sugere que NS1 pode contribuir para a formação de complexos imunes, os quais parecem exercer importante papel na patogênese de formas graves da doença (YOUNG *et al.*, 2000).

Rosen propôs, em 1977, uma teoria baseada na virulência viral para explicar a patogênese da FHD. Segundo esta, as formas graves da doença estavam associadas a algumas cepas virais com maior virulência, adquiridas a partir de mutações em seu genótipos. Essa virulência teria se originado de mutações genéticas decorrentes de replicações sucessivas em hospedeiros habitantes de localidades em períodos de hiperendemicidade e circulação de múltiplos sorotipos, concomitantemente (GIBBONS & VAUGHN, 2002).

Outra hipótese que tenta explicar a patogênese da FHD é a teoria integral da multicausalidade. Esta sustenta que a FHD ocorre em consequência de fatores múltiplos, complexos e intrincados nos quais aspectos relacionados ao vírus, ao hospedeiro e à epidemiologia estão envolvidos. Os fatores virais consistem na virulência da cepa, o sorotipo envolvido, mutações no genótipo viral, etc; já os fatores de risco individual incluem idade, sexo, estatus nutricional, infecção secundária, a imunocompetência do indivíduo, dentre outros; e os fatores de risco epidemiológicos são o número de indivíduos susceptíveis, alta densidade vetorial, circulação de diferentes sorotipos, hiperendemicidade, etc. Segundo essa hipótese, a interseção dos três grupos de fatores leva à FHD epidêmica (GUZMÁN & KOURI, 2002).

#### 1.1.6 Diagnóstico de Dengue

Os critérios internacionais para o diagnóstico final de um caso suspeito de FHD estabelecem que o mesmo só é possível através de confirmação laboratorial. E, mesmo em períodos epidêmicos, quando não há possibilidade de se realizar essa confirmação em todos os casos, em virtude do grande volume de pacientes, o diagnóstico confirmatório laboratorial é requerido nos seguintes casos: óbitos, casos com manifestações hemorrágicas espontâneas ou

induzidas, casos com manifestações clínicas não-usuais, casos de internação, gestantes, e casos com presença de exantemas em crianças menores de 5 anos para diagnóstico diferencial com rubéola e sarampo. Entretanto, nos períodos não-epidêmicos, a confirmação laboratorial é obrigatória (BRASIL, 2011).

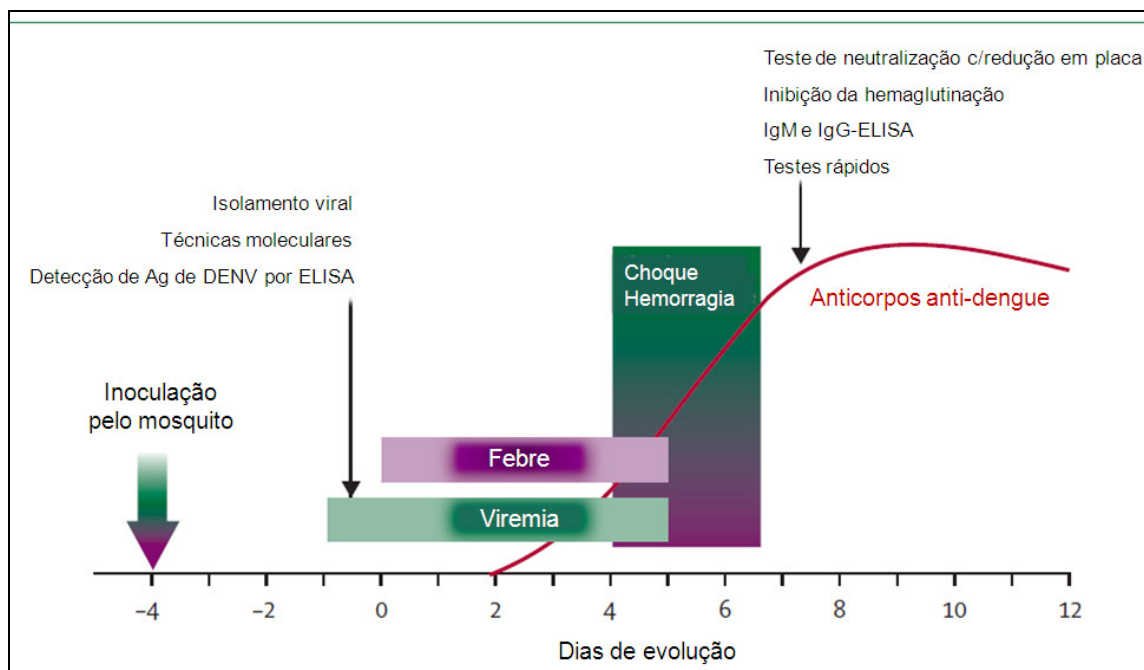
O diagnóstico laboratorial específico da dengue é essencial para o diagnóstico conclusivo e para diferenciá-la de outras síndromes febris tropicais. Pode ser realizado através de diversas técnicas sorológicas, virológicas e moleculares (GUZMAN & KOURI, 1996; SHU & HUANG, 2004; VELATHANTHIRIA *et al.*, 2006). Dentre essas técnicas, os testes mais amplamente aplicados na rotina laboratorial são: MAC-ELISA, IgG-ELISA e isolamento viral em linhagens de células de mosquitos infectadas, como, por exemplo, a linhagem C6/36 de *A. albopictus* (WHO, 1997; SINGHI & KISSOON & BANSAL, 2007; MENAKA *et al.*, 2007). Atualmente, estão disponíveis no mercado os testes que detectam o Ag NS1 do vírus dengue no soro ou plasma de indivíduos infectados, através das técnicas de ELISA e imunocromatografia de fluxo lateral (ALCON *et al.*, 2002; KUMARASAMY *et al.*, 2007). Outros testes também são aplicados para o diagnóstico da dengue, embora mais utilizados na pesquisa científica, como, por exemplo, RT-PCR, PCR em tempo real (qPCR), inoculação viral em cérebro de camundongos recém-nascidos, inoculação viral em mosquitos, teste de inibição da hemaglutinação (IH), teste de neutralização, teste de fixação do complemento, entre outros (RACE & WILLIAMS & AGOSTINI, 1979; KUNO *et al.*, 1985; GUZMÁN & KOURÍ, 1996; WHO, 1997; MENAKA *et al.*, 2007).

Na infecção primária, o vírus circula na corrente sanguínea por um período relativamente coincidente com a duração da febre e, assim, pode ser detectado por métodos virológicos no soro ou plasma por, aproximadamente, 2 a 7 dias, período que consiste na fase aguda da doença. Entretanto, em infecções secundárias, a viremia pode durar apenas 2 ou 3 dias (HALSTEAD, 2007; SHU & HUANG, 2004).

A proteína NS1 é secretada por células de mamíferos infectadas *in vitro* por *Flavivirus*, mas o mesmo não acontece em linhagens celulares de *A. albopictus* (FLAMAND *et al.*, 1999). Durante a fase aguda a mesma pode ser utilizada no diagnóstico para detectar anticorpos séricos anti-NS1 ou como antígeno (Ag) circulante a ser pesquisado (CHUANSUMRIT *et al.*, 2008; DUSSART *et al.*, 2006; LAPPHRA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2006; YOUNG *et al.*, 2000). O ELISA que detecta a secreção de NS1 *in vivo* tem demonstrado que o Ag NS1 é detectável a partir do 1º dia de febre, no sangue de indivíduos infectados, até o 9º dia, e mesmo quando a amostra é negativa no RT-PCR e no IgM (ALCON *et al.*, 2002).

Durante a fase aguda da doença, no período virêmico, os métodos diagnósticos recomendados são os que necessitam da viabilidade viral, como o isolamento viral, RT-PCR, qPCR e NS1 (ELISA e/ou imunocromatografia). No final da fase aguda, o diagnóstico sorológico é o método de escolha, como por exemplo, IgM-ELISA, IgG-ELISA, IH, etc (HASLSTEAD, 2007; WHO, 2009) (figura 2). O diagnóstico sorológico para dengue só se torna possível a partir da defervescência ou ao final da viremia. Entre o 3º e o 5º dia de doença, cerca de 50% dos pacientes tem IgM detectável (GUBLER, 1998; SCHILLING *et al.*, 2004; SHU & HUANG, 2004; WHO, 2009). Por volta do 5º dia de doença esse número aumenta para cerca de 80% e, no 10º dia, 99% desenvolveu produção detectável de IgM. O mesmo persiste no soro por 2 a 3 meses (GUBLER, 1998; WHO, 2009). Em infecções primárias, o IgG aparece no soro dentro de um dia ou dois após a detecção de IgM, podendo levar de 10 a 14 dias para se tornar detectável (GUBLER, 1998; SCHILLING *et al.*, 2004; SHU & HUANG, 2004). O IgG apresenta um aumento moderado ao longo das semanas seguintes e persistindo, provavelmente, por toda a vida. Em infecções secundárias, o IgG está presente logo no início da doença e aumenta a níveis muito elevados dentro da primeira semana da infecção e a resposta de IgM é significativamente menor do que nas infecções primárias, podendo ser indetectável em alguns casos. Os títulos de IgG nesses pacientes podem permanecer altos por 10 meses após a infecção (GUBLER, 1998; SHU & HUANG, 2004). A presença de IgG numa amostra que esteja no 1º dia da manifestação dos sintomas é evidência de que o paciente está apresentando uma infecção secundária (MCBRIDE, 2009). Alguns protocolos determinam que um aumento dos títulos de IgG em 4 vezes em amostras pareadas indica infecção aguda ou recente por flavivírus. Já a detecção de altos níveis de IgG logo no início da doença, sugere infecção secundária ou múltipla (WHO, 2009). Outros protocolos consideram que uma razão IgM/IgG maior do que 1,78 é um marcador de infecção primária e razão menor que essa indicaria infecção secundária (FERNANDEZ & VAZQUEZ, 1990; KUNO & GOMEZ & GUBLER, 1991; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1999).





**Figura 2.** Principais testes diagnósticos de dengue de acordo com a evolução da doença.  
Fonte: adaptado de HALSTEAD, 2007

É importante ressaltar que a sorologia por ELISA, para detecção de IgM ou IgG, é o teste mais amplamente utilizado na rotina laboratorial, devido à sua alta sensibilidade de 90-97% em comparação com o teste de IH, que é considerado o padrão-ouro para dengue (KUNO & GOMEZ & GUBLER, 1991; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1999; NAWA *et al.*, 2001). No Brasil, o teste ELISA também é o mais utilizado para o diagnóstico de dengue por apresentar uma série de vantagens, em relação aos outros testes, como, por exemplo, uma grande flexibilidade no tempo de coleta das amostras, após a fase aguda, uma vez que as respostas de anticorpos permanecem detectáveis por mais tempo; a maior termoestabilidade dos anticorpos, em comparação à labilidade viral e do material genético; os serviços de sorologia são mais prontamente acessíveis, as técnicas são relativamente simples e os reagentes são comercializados. Por outro lado, resultados falso-positivos podem ser obtidos, podendo ser causados por ativação policlonal de linfócitos B ou por reações cruzadas geradas por certos grupos, complexos ou subcomplexos de epítomos comuns a outras espécies do gênero *Flavivirus*. Sendo assim, outros flavivírus, como o vírus da encefalite japonesa, por exemplo, podem induzir a produção de anticorpos que podem reagir cruzadamente com o vírus dengue e, dessa forma, o diagnóstico de dengue pode ser confundido, especialmente em áreas onde outros flavivírus estão presentes (WHO, 1997).

O diagnóstico confirmatório de um caso suspeito de dengue, além de ser importante para o paciente, para que receba tratamento e cuidados específicos, é importante a nível

coletivo, uma vez que, a partir do conhecimento do perfil epidemiológico de uma doença de notificação compulsória, como é o caso da dengue, torna-se possível estabelecer medidas preventivas e de controle específicas (BRASIL, 2011).

#### 1.1.7 Diagnóstico diferencial da dengue

Considerando-se que a dengue possui um amplo espectro clínico, torna-se difícil, em alguns casos, distingui-la de outras doenças utilizando apenas critérios clínico-epidemiológicos, sem o emprego de técnicas laboratoriais. Por isso, de acordo com o Ministério da Saúde, as principais doenças que entram no diagnóstico diferencial com a dengue são: influenza, sarampo, rubéola, citomegalovírus, hepatites virais, hantavirose, febre amarela, oropouche, leptospirose, malária, dentre outras, a depender da situação epidemiológica da região (BRASIL, 2007).

No Brasil, as arboviroses representam um grave problema de Saúde Pública, dentre elas provocadas pelos vírus dos gêneros *Flavivirus*, *Bunyoniavirus* e *Alphavirus* são as mais importantes causadoras de surtos ou epidemias (VASCONCELOS *et al.*, 1992; FIGUEIREDO, 1994). Cinco arbovírus foram identificados como importantes em termos de Saúde Pública, pois estão associados com epidemias urbanas, são os vírus dengue, mayaro, oropouche, rocio e febre amarela (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997). O vírus dengue e oropouche estão associados com doença humana epidêmica em áreas urbanas enquanto mayaro, rocio e febre amarela especialmente em áreas rurais. O vírus mayaro é associado com doença febril exantemática. O vírus da febre amarela é um arbovírus causador de doença hemorrágica encontrado na região Amazônica, enquanto o oropouche causa doença febril e algumas vezes acompanhada de meningite asséptica (VASCONCELOS *et al.*, 1992).

Assim como a dengue é a mais importante arbovirose do mundo, a leptospirose é, provavelmente, a zoonose mais difundida do globo e as duas, por sua similaridade clínica e sazonal, tem sido não raramente confundidas, por isso também faz parte da lista das doenças que fazem diagnóstico diferencial com a dengue (BRASIL, 2009; BROWN *et al.*, 2010).

## 1.2 Leptospirose

### 1.2.1 Epidemiologia da leptospirose

A leptospirose é uma doença infecciosa febril, sistêmica, de início súbito e caráter zoonótico, endêmica em ambientes tropicais, onde várias epidemias têm sido registradas e, segundo a OMS, sua incidência em regiões tropicais varia de 10 a 100 casos/100.000 habitantes (BHARTI *et al.*, 2003; REITSTETTER, 2006, WHO, 2010).

Embora essa doença seja, provavelmente, a zoonose mais difundida do mundo, dados confiáveis da incidência e prevalência de casos humanos são escassos devido à pobre qualidade dos dados de vigilância, dificuldade de diagnóstico por apresentar muitos sintomas inespecíficos, baixa sensibilidade dos testes diagnósticos padrão e porque conhecimentos sobre susceptibilidade e reinfecção ainda não estão totalmente esclarecidos, necessitando de mais estudos (BOUNLU *et al.*, 1998; MCBRIDE *et al.*, 2005; ABELA-RIDDER & SIKKEMA & HARTSKEERL, 2010; WHO, 2010). É provável que a leptospirose seja uma doença negligenciada e subestimada em muitas partes do mundo (BOUNLU *et al.*, 1998; WHO, 2010). Dados obtidos de estudos de vigilância de síndromes febris identificaram a presença de *Leptospira* em 20 a 30% dos pacientes, apoiando que realmente há subnotificação dessa doença (ISMAIL *et al.*, 2005; LAROCQUE *et al.*, 2005; MOHAREB *et al.*, 2005).

A leptospirose no Brasil é um importante problema de saúde pública por sua incidência, elevada taxa de letalidade e alta taxa de internação hospitalar. (BRASIL, 2002). O coeficiente de incidência foi de 1,8 casos/100.000 habitantes em 2008, consistindo numa média menor do que a descrita pela OMS (BRASIL, 2010). Porém, as avaliações do sistema de vigilância da leptospirose no Brasil, realizadas de 2005 a 2007, sugeriram sua baixa sensibilidade (BRASIL, 2008). Sua maior ocorrência se dá nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Esta tem ocupado o terceiro lugar em número de casos do país, anualmente. No estado do Ceará, a doença é relatada desde 1995, que foi o ano com o maior número de casos confirmados, seguidos pelos anos de 2003 e 2004, com incidências superiores a 1/100.000 habitantes. Já em 2008, houve 192 casos notificados e, destes, 85 foram confirmados em 18 municípios, destacando-se o município de Várzea Alegre que relatou um surto com 29 casos da doença (BRASIL, 2008; CEARÁ, 2010).

Dentre alguns fatores que aumentam o risco de contrair a doença, é possível citar enchentes e condições sanitárias impróprias à saúde humana, pois essas situações facilitam o contato humano com a urina de animais infectados; além de algumas profissões que expõem os trabalhadores ao patógeno como, por exemplo, biólogos, veterinários, bombeiros,

limpadores de esgoto, catadores de lixo, pescadores, entre outros (BRASIL, 2009; WHO, 2010).

### 1.2.2 Agente etiológico da leptospirose

A leptospirose é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* que infectam seres humanos e animais silvestres e domésticos. Essas bactérias podem infectar uma série de tecidos diferentes produzindo um amplo espectro clínico, não específico, que varia desde uma síndrome febril indiferenciada até falência múltipla de órgãos e morte, a depender da idade, saúde e competência imunológica do hospedeiro (BHARTI *et al.*, 2003; REITSTETTER, 2006; ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Entretanto, a maioria dos indivíduos infectados por *Leptospira*, especialmente os que habitam em áreas endêmicas, adquirem infecção assintomática ou apresentam sintomas moderados (DAHER *et al.*, 2010).

Atualmente se conhecem sete espécies patogênicas da bactéria, sendo *L. interrogans* a mais importante. A unidade taxonômica básica é o sorovares (sorotipo) e mais de 200 já foram identificados. Cada sorovar possui um hospedeiro preferencial (alguns possuem mais de um). Além disso, uma só espécie animal pode ser reservatório de um ou mais sorovares. Qualquer sorovar pode originar as diversas formas de apresentação clínica no homem. Entretanto, os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhagen* estão mais frequentemente correlacionados a casos mais graves (BRASIL, 2009).

### 1.2.3 Transmissão da leptospirose

As leptospiras patogênicas têm como hábitat as porções proximais dos túbulos renais dos rins dos seus reservatórios, ainda que outros tecidos e órgãos também possam servir como fonte de infecção. A partir dos rins, essas bactérias podem ser excretadas pela urina e, então, contaminar o solo, águas superficiais, córregos, rios, etc. Os seres humanos comumente se infectam através do contato direto da pele ou mucosas com água ou solo contaminados por urina ou outros fluidos de animais infectados, sendo o período de incubação de 2 a 20 dias (ADLER & MOCTEZUMA, 2010; SLACK, 2010; WHO, 2010).

Dentre os fatores relacionados ao agente etiológico que favorecem a persistência dos focos de leptospirose, destacam-se o elevado grau de variação antigênica, a prolongada capacidade de sobrevivência no meio ambiente (que pode resistir até 180 dias) e a ampla variedade de animais susceptíveis reservatórios como ratos, ratazanas, camundongos (principais reservatórios), bois, porcos, carneiros, cassacos, morcegos e outros. Tem sido

demonstrado que quase todos os mamíferos, incluindo os aquáticos, podem ser reservatórios. A infecção animal pode ser assintomática e, no entanto, a eliminação do patógeno pode perdurar por toda a vida do animal, enquanto que os seres humanos quase nunca se tornam portadores crônicos da doença, mas sofrem infecções agudas podendo causar sequelas (BRASIL, 2009; ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

Após infecção, o ser humano adquire imunidade sorovar-específica, significando que um mesmo indivíduo pode apresentar a doença mais de uma vez, contanto que se infecte por outro sorovar diferente do anterior (BRASIL, 2009).

#### 1.2.4 Manifestações clínicas da leptospirose

Os sinais clínicos e sintomas da leptospirose são variáveis e se apresentam desde manifestações subclínicas até formas potencialmente fatais. As primeiras tem sido relatadas com frequência e, devido à sua natureza inespecífica, tornam o diagnóstico difícil. Estas manifestações brandas também podem ser relacionadas a manifestações futuras de sintomas e doença crônica. A forma anictérica é a mais comum forma moderada da doença, sendo caracterizada por sintomas não-específicos como febre, dor de cabeça, calafrios, mialgia, náuseas e dor abdominal. Já a forma ictérica é a manifestação clássica da leptospirose grave, potencialmente fatal, também conhecida como Síndrome de Weil, a qual tipicamente apresenta-se com complicações renais, hepáticas e vasculares, e acomete cerca de 15% dos pacientes com leptospirose (ASHFORD *et al.*, 2000).

A doença é dividida em duas fases: a fase septicêmica ou precoce e a fase imune ou tardia. Cerca de 90% dos casos de leptospirose correspondem a fase septicêmica e dura cerca de uma semana, no entanto, poucos casos são detectados em virtude das dificuldades inerentes ao diagnóstico clínico e à confirmação laboratorial. O desafio de se diagnosticar a leptospirose nessa fase se deve ao quadro clínico inespecífico presente nessa fase, iniciando-se com febre súbita, cefaléia, mialgia, anorexia, náuseas e vômitos, podendo ocorrer também diarreia, artralgia, hiperemia ou hemorragia conjuntival, fotofobia, dor ocular e tosse. Exantemas ocorrem em 10 a 20% dos pacientes, distribuídos no tronco ou região pré-tibial. Menos comumente (<20%), pode ocorrer hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia. Entretanto, os principais sintomas nesse estágio consistem em febre alta, fortes dores de cabeça, mialgia, calafrios, derrame conjuntival, dor abdominal, icterícia, hemorragias na pele e mucosas, vômitos, diarreia e erupções cutâneas (PLANK & DEAN, 2000; LEVETT, 2001; BRASIL, 2009). Esta fase tende a ser autolimitada e regride em 3 a 7 dias, sem deixar sequelas. É frequentemente diagnosticada como uma “síndrome gripal”, “virose” ou outras

doenças que ocorrem na mesma época, como dengue ou influenza (SMITS *et al.*, 2001; BRASIL, 2009).

A fase tardia ou imune caracteriza-se pela produção de anticorpos e excreção das leptospiros na urina e aproximadamente 5 a 10% dos pacientes evoluem para essa fase (TURNER, 1968 apud LEVETT, 2001; FARR, 1995). Nessa fase, dano renal, falência hepática, insuficiência respiratória, meningite e morte são algumas manifestações graves que podem ocorrer (WHO, 2010). A icterícia é considerada como um sinal característico, aparecendo entre o 3º e o 5º dia de doença, e sua presença é indicador de mal prognóstico, uma vez que está associada à Síndrome de Weil. Ainda assim, pode ocorrer manifestações graves em pacientes anictéricos. Outras manifestações frequentes na leptospirose grave são: miocardite, arritmias, pancreatite, anemia e distúrbios neurológico, como confusão, delírio, alucinações e sinais de irritação meníngea. Além disso, tem sido frequentemente associada à meningite asséptica (LEVETT, 2001; BRASIL, 2009).

#### 1.2.5 Diagnóstico da leptospirose

Para diagnóstico de leptospirose, as leptospiros podem ser visualizadas por exame direto através da inoculação em meios de cultura ou em animais de laboratório e/ou pela detecção do DNA da bactéria, pelo PCR, preferencialmente na fase precoce. Na fase tardia, as leptospiros podem ser cultivadas ou inoculadas em animais a partir da urina. Esses testes são confiáveis, mas os métodos de escolha são os sorológicos, principalmente o ELISA-IgM e a microaglutinação (MAT), que, no Brasil, são os testes realizados nos LACENs (BRASIL, 2009). Os anticorpos anti-*Leptospira* podem ser detectados por volta do 6º e 10º dia de doença e, geralmente, seus níveis atingem o pico máximo de produção dentro de 3 a 4 semanas de infecção, os quais gradualmente regridem, mas podem permanecer detectáveis por muitos anos (CHALAYON *et al.*, 2011).

A microaglutinação (MAT) é o teste de escolha nos laboratórios de referência por causa de sua alta sensibilidade e especificidade, além de ser o método indicado pela OMS (COLE & SULZER & PURSELL, 1973 apud BAJANI *et al.*, 2003; CHALAYON *et al.*, 2011). Entretanto, por ser uma técnica complexa, necessitar de amostras pareadas para uma correta interpretação e por não permitir um diagnóstico rápido para o manejo dos pacientes, alguns testes baseados na detecção de IgM por ELISA ou por imunocromatografia tem sido desenvolvidos e se mostrado altamente específicos e sensíveis (CINCO & BALANZIN & BANFI, 1992; RIBEIRO & SOUZA & ALMEIDA, 1995; SILVA *et al.*, 1997; LEVETT *et al.*, 2001; BAJANI *et al.*, 2003; VITALE *et al.*, 2004).

Devido ao amplo espectro clínico, a leptospirose, dentre muitas outras doenças, faz diagnóstico diferencial com a dengue (BRASIL, 2009).

### 1.3 Hantavírus

#### 1.3.1 Epidemiologia da hantavirose

A hantavirose é uma doença emergente que pode se manifestar de diferentes formas, como infecção subclínica; doença febril aguda, cuja suspeita se baseia em informações epidemiológicas; quadros pulmonares e cardiovasculares ou como casos de febre hemorrágica com síndrome renal (BRASIL, 2005).

Comumente, refere-se à infecção pelos hantavírus como hantavirose do Velho Mundo ou do Novo Mundo, em virtude da distinta distribuição geográfica dos reservatórios e da forma clínica que causam: a febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR), ocorrendo no Velho Mundo; ou a síndrome cardiopulmonar por hantavírus (SCPH), que ocorre nas Américas. Em alguns surtos, a FHSR e a SCPH podem atingir taxas de mortalidade de até 12% e 60%, respectivamente (JONSSON & FIGUEIREDO & VAPALAHTI, 2010).

Em todo o mundo, é possível que haja cerca de 150.000 casos de FHSR anualmente. Em contrapartida, cerca de 2.000 casos de SCPH já foram relatados em focos esporádicos nas Américas (JONSSON & FIGUEIREDO & VAPALAHTI, 2010). Nas Américas, a SCPH tem sido detectada desde 1993 e, desde então, é reconhecida como um importante problema de saúde pública (NICHOL *et al.*, 1993). No Brasil, 1.195 casos de SCPH foram relatados entre 1993 e 2009, com taxa de fatalidade de 40% (BRASIL, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

A epidemiologia dos casos humanos está relacionada à distribuição e à biologia dos seus hospedeiros preferenciais, sejam eles roedores ou insetívoros (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; JONSSON & FIGUEIREDO & VAPALAHTI, 2010).

É uma doença de notificação compulsória e sua ocorrência já foi relatada em vários Estados do Brasil, como, Pará, Rondônia, Amazonas, Bahia, Maranhão, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2010). Os casos relatados em Pernambuco e Rio Grande do Norte apresentaram-se clinicamente de forma semelhante à FHSR (HINRICHSEN *et al.*, 1993; FERREIRA, 2003).

Um estudo soro-epidemiológico realizado no Maranhão mostrou uma soroprevalência de 4,7% de hantavirose em seres humanos, distribuída em 6 municípios, evidenciando a circulação de hantavírus naquele Estado. Entretanto, nenhum dos pacientes soro-positivos

relatou sintomatologia indicativa de hantavirose, sugerindo que casos moderados ou assintomáticos estão ocorrendo nessas localidades (MENDES *et al.*, 2010).

Outro estudo de soroprevalência de hantavirose realizado no estado do Ceará mostrou a ocorrência de anticorpos anti-hantavírus em roedores (*Necromys lasiurus*), entretanto, a ocorrência de casos humanos da doença no Estado ainda não foi relatada, talvez devido à dificuldade de distinção entre as doenças que com ela fazem diagnóstico diferencial, como é o caso da leptospirose e da dengue (BRASIL, 2009; CHIORATTO *et al.*, 2010).

A prevenção das infecções por hantavírus baseia-se em medidas educativas tomadas junto às comunidades, direta ou indiretamente relacionadas com o meio rural, no sentido de prevenir o contato com os roedores ou suas excretas (CAMPOS *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Agente etiológico da hantavirose

Os hantavírus pertencem à família *Bunyaviridae*, gênero *Hantavirus*, que são vírus de RNA de fita simples, envelopados, esféricos, medindo de 80 a 120 nm de diâmetro. Seu genoma é trissegmentado e com polaridade negativa e os segmentos são assim denominados: L (*large* – grande), que codifica a transcriptase viral; M (*medium* – médio) que codifica as glicoproteínas G1 e G2 do envelope, relacionados ao reconhecimento de receptores celulares e à indução de imunidade; e S (*small* – pequeno), responsável pela codificação da proteína do nucleocapsídeo viral (PINCELLI *et al.*, 2003; JONSSON & FIGUEIREDO & VAPALAHTI, 2010). Essa família possui mais de 300 vírus que podem infectar plantas, animais, artrópodes e seres humanos, sendo que o hantavírus é o único bunyavírus que não é um arbovírus (BRASIL, 2009; JONSSON & FIGUEIREDO & VAPALAHTI, 2010).

As linhagens filogenéticas denominadas Juquitiba, Araraquara, Castelo dos Sonhos, Anajatuba e Laguna Negra são os hantavírus relacionados à doença humana no Brasil e as linhagens Mearim e Rio Marmoré também foram detectadas no país, mas apenas em roedores (JOHNSON *et al.*, 1999; BRASIL, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

### 1.3.3 Transmissão da hantavirose

Os seres humanos normalmente se infectam através da inalação de aerossóis contendo partículas virais excretadas pela urina, fezes e/ou secreções de roedores contaminados. Mais raramente, podem infectar-se através de mordeduras de animais infectados (CHILDS *et al.*, 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 2010). O período de incubação descrito é de 9 a 33 dias, com média de 14 a 17 dias (YOUNG *et al.*, 2000).



A FHSR tem, como transmissores principais, roedores dos gêneros *Myodes*, *Rattus* e *Apodemus*. Já a SCPH é transmitida por roedores silvestres americanos da subfamília *Sigmodontinae*. Geralmente, a infecção desses reservatórios pelos seus respectivos hantavírus não causa doença aparente, uma vez que esses vírus parecem ter antiga e estreita relação, provavelmente tendo coevoluído com seus reservatórios animais (PLYUSNIN & VAPALAHTI & VAHERI, 1996; ZHAO & HAY, 1997; FIGUEIREDO *et al.*, 2010; JONSSON & FIGUEIREDO & VAPALAHTI, 2010).

#### 1.3.4 Manifestações clínicas da hantavirose

Nas primeiras descrições da doença, os pacientes apresentavam um quadro *influenza-símile*, com febre, cefaléia, mialgias e calafrios, que progredia para insuficiência respiratória grave. Aproximadamente 50% dos casos evoluíam para choque cárdio-circulatório, motivo pelo qual a doença passou a ser chamada de SCPH (KHAN *et al.*, 1996; SAGGIORO *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas da SCPH ocorrem em duas fases: prodrômica ou inespecífica e a pulmonar. Na primeira, os sintomas mais comuns incluem febre, mialgia, dor dorso-lombar, dor abdominal, cefaléia intensa e sintomas gastrointestinais como náuseas, vômitos e diarréia, e os sintomas perduram por cerca de 6 dias, podendo prolongar-se até 15 dias. O final dessa fase é evidenciado pelo surgimento de tosse seca, que corresponde ao início da fase pulmonar. A fase pulmonar caracteriza-se pela referida tosse, acompanhada de taquicardia, taquidispnéia e hipoxemia. Pode ocorrer rápida evolução para edema pulmonar não cardiogênico, hipotensão arterial e colapso circulatório. Comumente, pode-se encontrar derrame pleural de pequena magnitude. Opostamente ao que se observa no choque séptico, o índice cardíaco encontra-se baixo e a resistência periférica, elevada. Pode haver também comprometimento renal, geralmente leve ou moderado, podendo evoluir para insuficiência renal. Essa fase apresenta uma elevada taxa de letalidade de cerca de 40% e os casos fatais ocorrem, mais comumente, entre o 4º ou 6º dia após o início dos sintomas (BRASIL, 2009).

#### 1.3.5 Diagnóstico da hantavirose

O diagnóstico da infecção aguda por hantavírus pode ser realizado por sorologia, sendo que os testes mais utilizados no Brasil são o ELISA (IgM e IgG) utilizando Ags de vírus *Sin Nombre* ou *Los Andes* e o RT-PCR, amplificando os genes das proteínas N e G1, a partir de sangue ou de biópsias de pacientes (GRAZIANO & TEMPEST, 2002; MORELI &

SOUSA & FIGUEIREDO, 2004). Nos casos de óbito, a imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-hantavírus *Puumala* (1:200, clone GB04-BF07, CDC – Atlanta, EUA) costuma ser utilizada para confirmar o diagnóstico (SAGGIORO *et al.*, 2007).

#### **1.4 Justificativa**

No ano de 2008 o Ceará apresentou 2º maior número de casos de dengue desde 1986 principalmente em virtude de elevadas infestações pelo *A. aegypti*, a circulação simultânea de três sorotipos virais e um grande contingente populacional susceptível à doença (CEARÁ, 2010).

Não há dúvidas de que a observação clínica é o critério mais importante no diagnóstico da dengue, especialmente em épocas de epidemias, porém, o diagnóstico definitivo requer a confirmação por meio das técnicas laboratoriais (VORNDAM & KUNO, 1997; WHO, 1997; GUZMAN & KOURI, 2004).

Uma vez que, numa epidemia, o diagnóstico de dengue pode ser confirmado pelo critério clínico-epidemiológico em qualquer indivíduo que apresente sintomas característicos da dengue e que habite em regiões com epidemiologia favorável à dengue, há uma considerável possibilidade da ocorrência de duas situações hipotéticas: 1) uma superestimação do número de casos de dengue, quando a síndrome febril indiferenciada apresentada pelo paciente é considerada como um caso de dengue mesmo sem a realização ou positividade em testes específicos de dengue e 2) a não-identificação/subnotificação de outras patologias cuja manifestação clínica é inespecífica, da mesma maneira que a dengue.

Diante da possibilidade de outros patógenos causarem doença com quadro clínico semelhante ao da dengue, o objetivo desse estudo foi pesquisar a ocorrência de outros agentes etiológicos causadores de síndromes dengue-símeles nos pacientes que foram considerados clinicamente como casos suspeitos de dengue, mas que apresentaram diagnóstico virológico negativo pelo LACEN-CE, no ano de 2008.

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Identificar a etiologia do quadro dengue-símile de pacientes com isolamento viral negativo para dengue, realizado pelo LACEN-CE, no ano de 2008.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Investigar laboratorialmente infecção aguda de dengue, através da técnica de ELISA (IgM) e RT-PCR.
- b) Realizar a sorotipagem do vírus dengue pela técnica RT-PCR multiplex;
- c) Demonstrar circulação de hantavírus, através da técnica de ELISA e RT-PCR;
- d) Elucidar, através da detecção de IgM anti-*Leptospira* sp., se há participação de bactérias do gênero *Leptospira* como agentes causadores dos quadros dengue-símeis dos pacientes negativos para dengue.

### **3.0 METODOLOGIA**

#### **3.1 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo retrospectivo descritivo-exploratório de etiologia febril de pacientes com quadro suspeito de dengue e resultado negativo no isolamento viral no período de janeiro a dezembro de 2008.

#### **3.2 Caracterização das amostras**

Foram cedidas pelo LACEN-CE 128 amostras selecionadas aleatoriamente de um total de 584 amostras negativas no isolamento viral em linhagem celular C6/36 de *A. albopictus* realizado pelo LACEN-CE em 2008, coletadas de pacientes residentes no estado do Ceará com suspeita de dengue, de janeiro a dezembro do mesmo ano. As 128 amostras eram provenientes de 114 pacientes, sendo 9 amostras de sangue, 1 de líquido e 118 soros.

As amostras foram enviadas para o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e foram distribuídas em 3 alíquotas, que foram estocadas a -70°C, até a realização dos testes laboratoriais.

#### **3.3 Critérios de inclusão no estudo e obtenção de dados clínicos**

Os critérios de inclusão compreendiam a notificação no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), corresponder aos critérios de casos suspeitos de dengue preconizados pelo ministério da saúde, anteriormente citados (item 1.1.4a) e apresentar resultado negativo no IV de DENV, realizado no LACEN-CE, em 2008.

Foram excluídos do estudo pacientes com fichas inadequadamente preenchidas ou aqueles cujas amostras não possuíam volume suficiente para a realização de, no mínimo, um dos testes para diagnóstico de dengue.

Os dados como tempo de febre, sexo, idade, endereço, data e local do atendimento e critério de confirmação de dengue (laboratorial ou clínico), foram obtidos das fichas do SINAN e/ou das fichas encaminhadas para o LACEN juntamente com as amostras. As informações sobre sintomas foram obtidas apenas dos pacientes cujas fichas tiveram preenchidos os campos concernentes à sintomatologia.

### 3.4 Técnicas laboratoriais

Todas as amostras incluídas no estudo foram testadas para dengue e, em seguida, aquelas com resultado negativo foram então analisadas para leptospirose. Em seguida, todas as amostras com volume suficiente foram testadas para pesquisa de hantavírus a fim de avaliar não apenas a etiologia da síndrome febril, mas também a possível circulação de hantavírus em humanos, no estado do Ceará.

#### 3.4.1 Dengue

As amostras incluídas (90) eram provenientes de 82 pacientes e foram avaliadas quanto à presença de infecção aguda por dengue pelos seguintes testes diagnósticos:

a) Sorologia

A sorologia para dengue foi realizada 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 de anticorpos IgM anti-dengue no soro dos pacientes, os quais, se presentes, ligam-se a anticorpos anti-IgM humano aderidos à superfície de poliestireno de cada um dos 96 poços disponíveis no kit.

Antes do procedimento, todos os reagentes tiveram sua temperatura equilibrada à temperatura ambiente (20 a 25°C). Em seguida, os controles positivo e negativo, o calibrador (fornecidos pelo kit) e as amostras dos pacientes foram diluídos de 1:100, utilizando o diluente das amostras (kit); e o Ag de 1:250, usando o diluente do Ag (kit). Em seguida, o Ag diluído foi adicionado de igual volume do anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase HRP (MAb) e incubados por 1h, à temperatura ambiente, permitindo a formação de complexos Ag-MAb. Durante os 10 minutos iniciais da incubação do Ag-MAb, 100µl das amostras diluídas dos pacientes e dos controles (positivo, negativo e calibrador) foram adicionadas à placa, sendo que um poço foi destinado ao controle negativo, outro para o controle positivo, e para o calibrador, uma triplicata. As amostras dos pacientes foram adicionadas à placa em duplicata. A placa foi coberta e incubada por 1h a 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, 100µl do Ag-MAb foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 1h. 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, num comprimento de onda de 450 nm com filtro de referência a 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 absorbâncias 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

b) Extração do material genético

A extração e purificação de RNA viral do vírus dengue foi realizada através do kit QIAamp® Viral Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Para isso, foi utilizada uma alíquota de 140µl de soro/sangue/líquor.

A técnica de extração do RNA pelo kit mencionado acima utiliza uma coluna com sílica gel com afinidade para RNA. Para tanto, 140µl de cada amostra clínica foi lisada pelo tampão AVL e, após a lise, a amostra foi aplicada a uma coluna com afinidade para RNA viral e submetida a uma centrifugação de 8000rpm por 1 minuto. Após centrifugação, a amostra laboratorial foi lavada duas vezes, uma com o tampão AW1 e outra com o tampão AW2. Terminada a lavagem, o RNA foi eluído da coluna, por 800µl do tampão AVE e estocado a -70°C.

c) RT-PCR

Para amplificação do genoma do vírus dengue foi utilizado o sistema SuperScrip™ One Step RT-PCR (QIAGEN), que dispensa a confecção prévia de cDNA. Ele utiliza moléculas de RNA para sintetizar o cDNA e amplificá-lo por RT-PCR num único tubo utilizando oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos. O sistema consiste de dois componentes principais: o mix RT/ Platinum® *Taq* e o 2X Reaction Mix. O primeiro contém uma mistura de SuperScript™ II Reverse Transcriptase e Platinum® *Taq* DNA Polymerase para a síntese de cDNA e para a amplificação por PCR. O segundo contém 0.4 mM de cada dNTP e 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>.

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para amplificação do genoma dos vírus dengue e seus sorotipos

Etiologia	Primer	Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência
DENGUE	D1 (sense)	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	511	LANCIOTTI <i>et al.</i> , 1992
	Ts1 (anti-sense)	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482	
	Ts2 (anti-sense)	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119	
	Ts3 (anti-sense)	TAACATCATCATGAGACAGAGC	290	
	Ts4 (anti-sense)	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392	

Foi realizado um RT-PCR multiplex utilizando 5µl do RNA extraído (2 µg), 1µl de cada um dos *primers* D1, Ts1, Ts2, Ts3 e Ts4 na concentração de 20pmol, 1µl de dNTPs mix (10mM), 5µl do tampão 5X One-Step RT-PCR (Tris·Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT; pH 8.7), 8,5µl de água DEPC (Gibco) e 0,5µl da enzima Super Script<sup>TM</sup> RT/platinum<sup>R</sup> Taq Mix (QIAGEN) (5U/µL), num volume final de 25µl. Anteriormente aos ciclos de amplificação, as amostras foram submetidas às temperaturas de 50°C por 30 segundos e 95°C por 15 minutos para a desnaturação do cDNA. As reações de amplificação foram realizadas usando 40 ciclos. Um ciclo de amplificação consistiu na desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto para a desnaturação das fitas, o anelamento dos primers a 55°C por 1 minuto e a extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos, houve mais uma incubação a 72°C por 10 minutos, para a inativação da enzima.

O controle da reação para a detecção do genoma do vírus dengue utilizado foi o RNA extraído de uma cultura de células C6/36 de *A. albopictus* infectada com vírus DENV-2, *New Guinea* (NGC) e DENV-3, H-87.

O resultado das amplificações foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo 1µg/mL, visualizado à luz ultravioleta.

As amostras negativas para dengue foram testadas para leptospirose.

### 3.4.2 Leptospirose

Somente as amostras negativas no item 3.4.1 (dengue) supracitado foram analisadas quanto à presença de infecção por *Leptospira* sp. Todas as etapas do diagnóstico de leptospirose foram realizadas no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Ceará.

#### a) Sorologia

A sorologia para leptospirose foi realizada através do kit comercial de imunoenensaio enzimático, comercializada pela PanBio Diagnostics<sup>®</sup> (Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. O teste destina-se à detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-*Leptospira* no soro

dos pacientes, os quais, se presentes, ligam-se a Ags de *Leptospira* aderidos à superfície de poliestireno de cada um dos 96 poços disponíveis no kit.

Antes do procedimento, todos os reagentes tiveram sua temperatura equilibrada à temperatura ambiente (20 a 25°C). Em seguida, foram diluídos os controles positivo e negativo, o calibrador e as amostras dos pacientes de 1:100, utilizando o diluente fornecido pelo kit. Em seguida, 100µl das amostras diluídas dos pacientes e dos controles (positivo, negativo e calibrador) foram adicionadas à placa, sendo um poço destinado ao controle negativo, outro para o controle positivo, e três poços para o calibrador. As amostras dos pacientes foram adicionadas à placa em duplicata. A placa foi coberta e incubada por 30 minutos a 37°C. Após essa incubação, o soro residual que não reagiu com o Ag aderido à placa, foi removido por meio de lavagens sucessivas com o tampão de lavagem do kit, previamente diluído. Em seguida, foi adicionado 100µl do IgM anti-humano conjugado com peroxidase HRP em cada poço, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se 100µl do TMB/poço, e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. O substrato, quando presente, foi então hidrolisado pela enzima e o cromógeno desenvolveu uma cor azul. Finalmente, após adição de 100µl de ácido fosfórico 1M (kit) para interromper a reação, o TMB se tornou amarelo. A placa finalmente foi lida em aparelho leitor de ELISA, num comprimento de onda de 450 nm com filtro de referência a 650 nm.

Para análise dos resultados, seguiram-se as instruções fornecidas pelo fabricante, contidas na bula do kit, que foram expressos em unidades Panbio, calculados conforme explicitado anteriormente no subitem “sorologia de dengue”.

### 3.4.3 Hantavírus

Para avaliar se hantavirose foi a etiologia do quadro clínico dos pacientes e para verificar se havia circulação de hantavírus no estado do Ceará, pretendeu-se avaliar todas as amostras disponíveis.

Todas as técnicas para pesquisa de hantavírus, que requerem laboratórios classificados com um nível mínimo de biossegurança nº 3, foram realizadas no CPVFMRP-USP, sob a orientação do professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo.

#### a) Sorologia

A sorologia para hantavírus foi realizada com base na pesquisa de anticorpos da classe IgM e IgG específicos para a proteína recombinante N do Hantavírus Araraquara. A diferenciação entre infecção atual e infecção prévia se deu através de reação positiva para



IgM ou para IgG, respectivamente. Os testes utilizando o aludido Ag foram realizados em IgM e IgG-ELISA para detecção de infecção humana por hantavírus (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Os controles positivos foram preparados a partir de pool de 5 soros humanos, sabidamente positivos para hantavírus, e os controles negativos, a partir do pool de 5 humanos soros sabidamente negativos para o patógeno.

Os Ags foram adicionados a microplacas de 96 poços segundo a seguinte ordem: na parte superior (poços A, B, C e D, de 1 a 12) continham a proteína N recombinante do hantavírus Araraquara, diluído em solução tampão carbonato (pH 9,6); e na parte inferior (poços E, F, G e H, de 1 ao 12), continham extrato de *E. coli* (Ag negativo) diluído na mesma solução tampão. Os brancos não continham nenhum dos Ags e se localizavam nos poços, H11 e 12. Os Ags (positivo e negativo) foram adicionados na concentração de 2µg/mL, num volume de 50µL/poço. Após a adição dos Ags, estas foram incubadas por um pernoite em câmara úmida. Em seguida foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween a 0,05% (pH 7,4) e bloqueadas com leite em pó desnatado (Molico) a 10% em PBS, no volume de 200µL/poço, seguidas de incubação por 2 horas a 37 °C. Durante a incubação, os soros (incluindo soros teste e soros controles positivos e negativos) foram diluídos a 1:100. O diluente dos soros foi o mesmo utilizado para preparação da solução de bloqueio. Os soros foram adicionados às placas em duplicata tanto para o Ag positivo, como para o Ag negativo. O controle positivo foi adicionado num volume de 50µL/poço, em quadruplicata, numa única diluição nos poços D9 até D12 (sensibilizados com Ag de hantavírus) e H9 a H10 (sensibilizados com Ag negativo de *E. coli*). Os soros controle-negativos foram adicionados em quadruplicata nos poços A9 até A12, diluídos de 1/100. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas por 1 h, a 37 ° C e em câmara úmida, sendo, em seguida, lavadas 6 vezes e adicionadas 50µL/poço de uma mistura de conjugados de peroxidase (KPL, USA) contendo anticorpos anti-*Peromyscus leucopus* e anti-*Rattus norvegicus*, 1:1, diluídos de 1:2000. Após incubação por mais 1h, realizou-se a última lavagem, por 6 vezes, com PBS-Tween a 0,05% (pH 7,4). Finalmente, adicionou-se 50µL/poço do substrato o-phenylenediamine (OPD), preparado previamente a partir de pastilha de OPD contendo 5mg (SIGMA, EUA) diluída em 12,5 mL em solução tampão citrato-fosfato, acrescida de 50µL do peróxido de hidrogênio a 30% (MERK). Para a revelação de cor, as placas foram envoltas em papel alumínio e incubadas por cerca de 20min a 37°C e em câmara úmida. Após surgimento de cor amarela, a reação foi bloqueada com 50µL de solução de HCl 1 M. A densidade óptica (DO) foi lida a 450nm em espectrofotômetro leitor de placas. A DO foi calculada pela subtração das DOs dos poços com

Ag de hantavírus Araraquara com as DOs dos poços com Ag de *E. coli*. Para determinação do ponto de corte, que determina os soros positivos, utilizou-se a média das replicatas do *pool* de soros negativos + 3 desvios-padrão. Assim, foram considerados positivos as amostras cujas DOs foram maiores que o valor do ponto de corte. O título de cada soro foi considerado como a maior diluição onde se observou resultado positivo.

b) Extração do material genético

A extração do RNA viral foi realizada através do kit QIAamp® Viral Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA), conforme anteriormente citado no subitem “b”, do tópico dengue.

c) Confeção do DNA complementar (cDNA)

Para a detecção de hantavírus, após extração do RNA total, a primeira fita do cDNA foi confeccionada utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (5U/μL), (PROMEGA) e o oligonucleotídeo iniciador randômico – primer pd(N)<sub>6</sub> (GIBCO® BRL, USA) com capacidade para hibridizar-se a RNA e permitir síntese de DNA complementar (cDNA).

Para isso, adicionou-se 6μl do RNA extraído (2μg) de cada amostra ou controle a uma mistura de 4μl de água DEPC (GIBCO) e 2μl (2μg) de primer randômico pd(N)<sub>6</sub> num tubo eppendorf de 200μl e submeteu-se a aquecimento a 95°C por 5 minutos para a completa desnaturação da estrutura secundária da fita molde (template). Em seguida, os tubos com as amostras foram imediatamente incubados em gelo por 5 minutos, para evitar a reconfiguração de estrutura secundária. Posteriormente, os tubos preparados foram acrescidos de 1μl de dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP e dTTP, a 10mM), 4μl de água DEPC (GIBCO), 2μl do tampão da enzima M-MLV RT 5x reaction Tampão (250mM Tris-HCl pH 8,3 a 25°C, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub> e 50mM DTT) e, por último, 1μl da enzima M-MLV Reverse Transcriptase (5U/μL) (PROMEGA). Assim, o volume final da reação foi de 20μl. Por fim, os tubos foram conduzidos ao termociclador e submetidos às seguintes temperaturas 25°C por 10 minutos (anelamento do primer), 37°C por 120 minutos (extensão da fita), 85°C por 5 minutos (inativação da enzima) e 10°C por 2 horas.

Após a confeção dos cDNAs, os mesmos foram enviados para o Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo (CPVFMRP-USP) para pesquisa de hantavírus por PCR.

## d) PCR

Para a realização do PCR, o cDNA de cada amostra foi adicionado a 2 tubos, num volume de 3,25µl/tubo. Cada tubo continha 5µl do tampão da enzima PCR Tampão 10x sem Mg<sup>2+</sup>, 1µl de dNTP mix (10mM), 1µl dos primers S ou G1 (em tubos separados), sense e anti-sense (15µM) (tabela 2), 38µl de água DEPC e, por último, 1,25µl da enzima Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase (5U/µL), diluída em 0,5µl do tampão da enzima e em 3,25µl de água DEPC.

**Tabela 2.** Primers utilizados para amplificação do genoma de hantavírus

Etiologia	Primer	Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência
Hantavírus	S (sense)	GAT GAA TCA TCC TTG AAC CCT A	264	MORELI & SOUSA & FIGUEIREDO, 2004
	S (anti-sense)	CAA AAC CAG TTG ATC CAA CAG		
	G1 (sense)	ACA TTT AGC AGT TTG CCA TGG G	140	
	G1 (anti-sense)	GGG CAG TAA GTG CTG AAA C		

O controle da reação utilizado para a detecção do genoma de hantavírus foram células Vero E6 infectadas com o vírus Mamoré.

O resultado das amplificações foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo 1µg/mL, visualizado à luz ultravioleta.

### 3.5 Considerações éticas

O estudo foi realizado somente após aprovação do comitê de ética em pesquisa, do Hospital São José de Doenças Infecciosas, protocolo n° 031/2009, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos estabelecidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

## 4.0 RESULTADOS

Das 128 amostras, 38 (de 32 pacientes) foram excluídas por não se adequarem aos critérios de inclusão. Noventa amostras foram utilizadas no estudo, provenientes de 82 pacientes, dos quais 36 eram do sexo masculino e 46, do sexo feminino.

### 4.1. Dados obtidos das fichas do SINAN

Quarenta e nove pacientes (49/82; 59,76%) foram notificados como dengue no SINAN. Destes, 29 pacientes (29/49; 35,37%) haviam recebido diagnóstico final de DC, sendo que, 19 foram confirmados por critérios clínico-epidemiológicos e 10 por critério laboratorial. Dezoito indivíduos (18/49; 21,95%) receberam diagnóstico de FHD, dos quais 17 foram confirmados por critério laboratorial e 1 por critério clínico epidemiológico; 2 pacientes (2/49; 2,44%) foram classificados como dengue com complicações, sendo que 1 deles foi confirmado por critério clínico-epidemiológico e o outro, laboratorial. Trinta e três pacientes (33/82; 40,24%) foram diagnosticados como síndrome febril indiferenciada (SFI), descartados para dengue, permanecendo sem diagnóstico definido. Destes, apenas 1 foi considerado como SFI por critérios clínico-epidemiológicos, e os outros 32, por critério laboratorial, apresentando resultado negativo nos exames laboratoriais para dengue. A distribuição por sexo de acordo com o quadro clínico está resumida na tabela 3. A partir dos dados obtidos das fichas do SINAN, foi possível observar que, no total dos 49 pacientes classificados como dengue, 28 foram confirmados por critério laboratorial e 21 pelo critério clínico-epidemiológico.

**Tabela 3.** Classificação prévia descrita na ficha do SINAN e distribuição por sexo dos pacientes.

Sexo	Dengue			SFI
	DC	FHD	DCC	
<b>Masculino</b>	16	8	1	11
<b>Feminino</b>	13	10	1	22
<b>Total</b>	<b>49 (59,76%)</b>			<b>33 (40,24%)</b>

Dentre os pacientes confirmados com DC e FHD, é possível observar, na tabela 4, que a faixa etária mais acometida nos casos notificados ao SINAN foi a de 0 a 9 anos de idade, indicando que a frequência foi maior nas crianças desta população de estudo.

**Tabela 4.** Classificação prévia descrita na ficha do SINAN e distribuição das formas clínicas por faixa etária.

<b>Faixa etária</b>	<b>DC</b>	<b>FHD</b>	<b>DCC</b>	<b>SFI</b>
0-9	<b>7</b> (24,14%)	<b>6</b> (33,34%)	-	<b>1</b> (3,03%)
10-19	5 (17,24%)	3 (16,67%)	-	4 (12,12%)
20-29	4 (13,79%)	1 (5,55%)	1 (50%)	<b>11</b> (33,33%)
30-39	5 (17,24%)	3 (16,67%)	-	5 (15,15%)
40-49	3 (10,34%)	3 (16,67%)	1 (50%)	-
50-59	1 (3,45%)	1 (5,55%)	-	4 (12,12%)
60-69	2 (6,90%)	-	-	2 (6,07%)
≥70	2 (6,90%)	1 (5,55%)	-	1 (3,03%)
ñ-informado	-	-	-	5 (15,15%)
<b>Total (100%)</b>	<b>29</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>33</b>

## 4.2 Dengue

As amostras que satisfizeram os critérios de inclusão foram avaliadas para dengue através dos testes ELISA-IgM e RT-PCR multiplex. Dentre os 82 pacientes, 35 (42,68%) apresentaram positividade para dengue através de pelo menos uma das técnicas, e 47 (57,32%) pacientes foram negativos para dengue.

Dentre os pacientes positivos, 4 haviam sido classificados no SINAN como SFI e 4 como DC por critério clínico-epidemiológico.

Dentre as 90 amostras analisadas, 38 foram positivas no ELISA e 4 no RT-PCR, sendo que 34 (34/90; 37,78%) apresentaram positividade apenas no ELISA, e 4 amostras (4/90; 4,44%) foram positivas no ELISA e no RT-PCR, enquanto as outras 52 (52/90; 57,78%) permaneceram negativas para dengue.

Quinze pacientes (42,86%) com resultado positivo para dengue eram do sexo feminino e 20 (57,14%), do sexo masculino (tabela 5).

**Tabela 5.** Resultado dos testes diagnósticos de dengue e distribuição por sexo dos pacientes.

GÊNERO	Dengue positivo (n= 35)	
	N	%
Feminino	15	42,86
Masculino	20	57,14
<b>TOTAL</b>	<b>35</b>	<b>100</b>

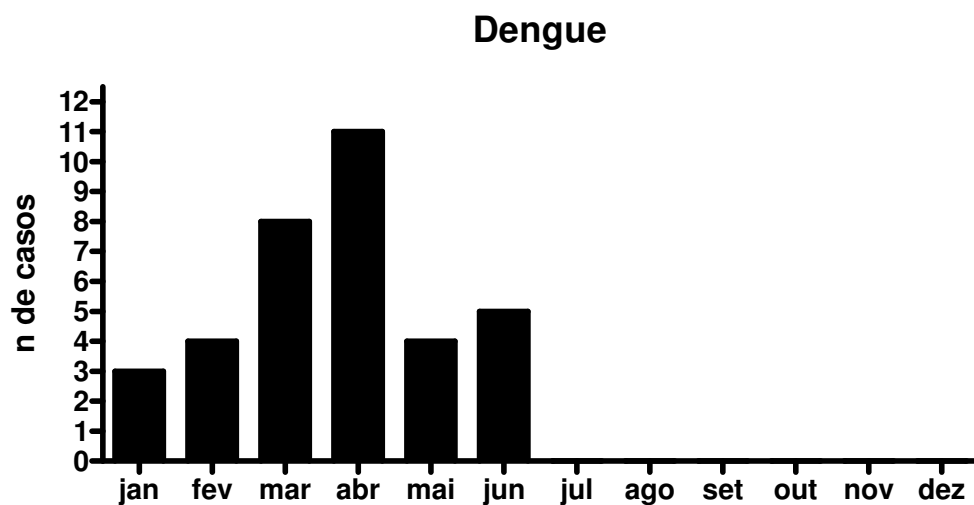
A sorotipagem das amostras dos quatro pacientes positivos no RT-PCR revelou a circulação de DENV-2 (2 pacientes) e de DENV-3 (2 pacientes).

Todas as faixas etárias exibiram casos, no entanto, a faixa de 0 a 9 anos demonstrou maior número de casos de dengue, com 11 ocorrências.

Quanto ao município de procedência, 24 pacientes eram provenientes de Fortaleza e os outros 11, oriundos dos seguintes municípios: Pacajús, Redenção (3), Quixadá, Caucaia (2), Itaitinga, Itapiuna e Maracanaú (2).

Dezesseis pacientes (45,71%) tiveram suas amostras coletadas entre o primeiro e o 5º dia do início dos sintomas e os outros 19 (54,29%) se encontravam a partir do 6º dia de doença.

Os casos de dengue se concentraram no primeiro semestre do ano, ocorrendo em cada um dos 6 primeiros meses, porém com maior número de casos no mês de abril (11 pacientes) e março (8 pacientes). Nenhum dos pacientes diagnosticados neste estudo apresentou infecção por dengue nos meses do segundo semestre do ano de 2008 (gráfico 1).

**Gráfico 1.** Distribuição mensal dos 35 casos de dengue detectados.

Quarenta e sete pacientes tiveram diagnóstico negativo de dengue, entretanto, 2 deles foram testados para dengue apenas por ELISA-IgM e outros 2, mesmo tendo sido testados para dengue no ELISA e no RT-PCR, não foram testados para os outros agentes etiológicos estudados neste trabalho, pois suas amostras não continham volume suficiente para a realização dos respectivos testes. Estes 4 pacientes, dessa forma, foram definidos como SFI após apresentar resultado negativo para dengue, já que essa foi a única etiologia pesquisada nos mesmos. Os 43 pacientes, negativos para dengue, foram testados para leptospirose.

### 4.3 Leptospirose

Dos 43 pacientes analisados quanto à presença de IgM anti-*Leptospira*, 6 (6/43; 13,95%) foram positivos para leptospirose e 37 (37/43; 86,05%) permaneceram negativos.

A distribuição por sexo dos pacientes acometidos por leptospirose foi de 2 pacientes (2/6; 33,33%) do sexo masculino e quatro (4/6; 66,67%) do sexo feminino (tabela 6).

**Tabela 6.** Resultado dos testes diagnósticos de *Leptospira* e distribuição por sexo dos pacientes.

GÊNERO	<i>Leptospira</i> positivo (n= 6)	
	N	%
Feminino	4	66,67
Masculino	2	33,33
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>100</b>

Em 2008, na época da infecção, 5 deles haviam recebido diagnóstico final de SFI e o outro paciente, havia sido diagnosticado como dengue pelo critério clínico-epidemiológico, tendo sido assim classificados na ficha do SINAN naquele período (tabela 7).

**Tabela 7.** Classificação da etiologia febril dos pacientes reagentes para leptospirose, na época da epidemia e após realização do ELISA específico para leptospirose.

Paciente	Classificação SINAN	IgM-ELISA <i>Leptospira</i>
MAHL	SFI	+
JGP	SFI	+
JCN	SFI	+
MLET	SFI	+
RMA	SFI	+
IHS	DC (clínico- epidemiológico)	+

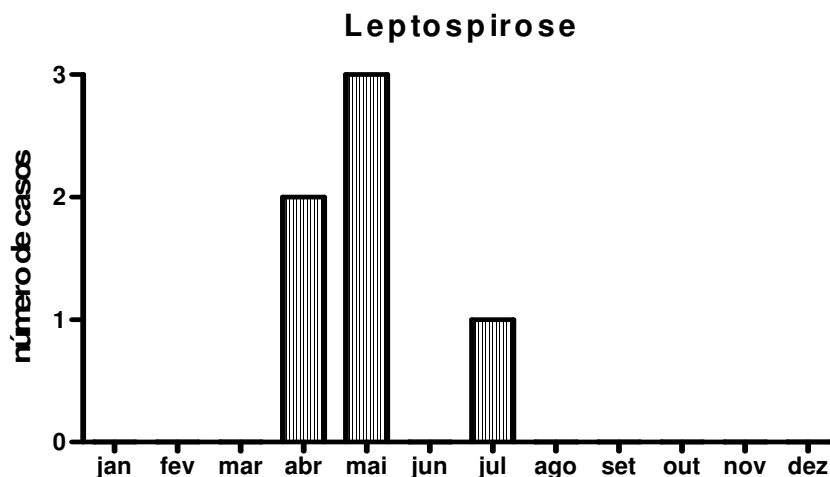
Os sintomas mais comuns desses pacientes foram febre, cefaléia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, astenia, náuseas/vômitos, menos frequentemente, e em alguns casos, diarreia e manifestações hemorrágicas. Um dos 6 pacientes, o paciente JCN, evoluiu a óbito.

A média de idade dos pacientes *Leptospira*-positivos foi de 35 anos (variação, 24-66 anos). O grupo etário com maior número de casos de leptospirose foi a faixa de 20 a 29 anos de idade. Quatro pacientes nessa faixa etária apresentaram leptospirose e os outros 2 estavam nas faixas de 40 a 49 anos e de 60 a 69 anos.

Mais de 66% dos pacientes acometidos por leptospirose residiam em Fortaleza. Os municípios de onde vieram os outros casos detectados foram Pacatuba e Guaraciaba do Norte.

Quatro pacientes (66,67%) estavam ainda nos primeiros 5 dias das manifestações sintomáticas ao momento da coleta das amostras de sangue, enquanto os outros 2 (33,33%) apresentaram os sintomas há mais de 6 dias.

Os casos de leptospirose detectados se distribuíram nos meses de abril, maio e julho, sendo que o mês com o maior número de casos foi maio, com 50% dos casos (3/6), enquanto o mês de abril apresentou 2 casos, e o mês de julho, uma ocorrência (gráfico 2).



**Gráfico 2.** Distribuição mensal de casos de leptospirose.

#### 4.4 Hantavirus

Para a avaliação da presença de hantavirose como etiologia da infecção aguda dos pacientes e para avaliar a circulação de hantavirus em humanos, analisou-se o maior número de amostras possíveis. Devido ao esgotamento do volume das amostras de 10 indivíduos, o total de pacientes avaliados quanto à presença de hantavírus foi de 72 pacientes. Dentre os pacientes analisados, foi encontrada evidência de infecção em 3 pacientes (4,17%).



Entretanto, apenas um deles apresentou positividade para a presença de anticorpos IgM específicos contra hantavírus no soro, mas o mesmo foi não-reagente para anticorpos IgG específicos contra o referido patógeno. Os outros dois pacientes mostraram a presença de anticorpos IgG contra o vírus, mas não foram positivos para anticorpos IgM. Assim, apenas 1 paciente (1/72; 1,39%) apresentou evidência de infecção aguda por hantavírus e os outros 71 (71/72; 98,61%) foram negativos. Dos 3 pacientes com positividade para hantavírus, 2 eram do sexo masculino e um do sexo feminino, sendo do sexo masculino o paciente com IgM positivo (tabela 8).

**Tabela 8.** Resultado dos testes diagnósticos de hantavírus e distribuição por sexo dos pacientes.

GÊNERO	Hantavírus positivo (n= 3)			
	IgM		IgG	
	N	%	N	%
Feminino	-	-	1	33,33
Masculino	1	33,33	1	33,33
<b>TOTAL</b>	<b>3 (100%)</b>			

Os 3 pacientes com amostras reagentes na sorologia, assim como todos os não-reagentes no ELISA para hantavírus, foram negativos para amplificação do genoma do vírus através da técnica de RT-PCR. Os títulos no ELISA foram de 1:100 nos pacientes FSP e DMDM (IgG e IgM, respectivamente), e de 1:400 no paciente JGPJ (IgG), conforme mostrado na tabela 9, juntamente com os dados clínico-laboratoriais desses pacientes.

**Tabela 9.** Características clínico-laboratoriais dos pacientes com evidência sorológica de infecção por hantavirus.

Paciente	Tempo de sintomas	Idade	Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /uL)	Hematócrito (%)	ELISA Hantavírus		ELISA Dengue
					IgG	IgM	IgM
FSP	1º dia	25	111	35.2	+ (1:100)	-	-
JGPJ	10º dia	31	203	45.3	+ (1:400)	-	+ (1:100)
DMDM	4º dia	10	130	11.6	-	+ (1:100)	-

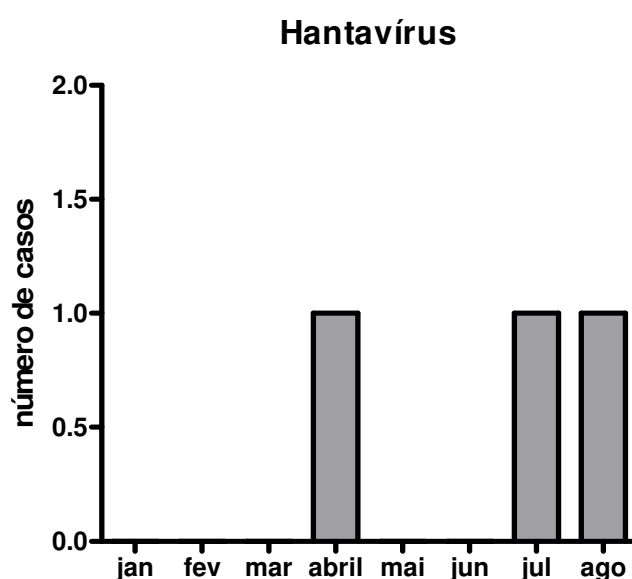
De acordo com a tabela 10, o paciente FSP, IgG-positivo, teve diagnóstico de SFI no SINAN, na época da infecção, pois os testes laboratoriais para dengue que havia realizado

foram negativos. O mesmo permaneceu com etiologia febril desconhecida no presente trabalho, uma vez que a detecção de IgG não significa infecção atual. Já o paciente JGPJ, havia sido classificado como SFI no SINAN. Entretanto, mesmo tendo sido positivo para IgG anti-hantavirus, a etiologia febril desse paciente consistia num quadro de dengue, uma vez que o mesmo foi positivo na detecção de IgM anti-dengue por ELISA realizada neste estudo. Já o paciente DMDM, positivo para IgM anti-hantavírus, havia sido outrora confirmado no SINAN como caso de dengue pelo critério clínico-epidemiológico. Os três pacientes evoluíram para a cura clínica.

**Tabela 10.** Classificação da etiologia febril dos pacientes reagentes para hantavírus, na época da epidemia e após realização dos testes específicos para hantavírus.

Paciente	Diagnóstico Anterior	Diagnóstico atual	Evolução clínica
FSP	SFI	SFI	Cura
JGPJ	SFI	Dengue	Cura
DMDM	Dengue (clínico-epidemiológico)	Hantavirose	Cura

Não houve faixa etária predominante e todos os pacientes eram procedentes de Fortaleza. O paciente que apresentou IgM positivo (DMDM) estava no 4º dia do início dos sintomas, enquanto os outros dois estavam no 1º e no 10º dia (FSP e JGPJ, respectivamente) do início dos sintomas ao momento da coleta de sangue.



**Gráfico 3.** Distribuição mensal de casos de hantavirose.

Os pacientes com evidência de infecção por hantavírus mostraram casos em abril, julho e agosto, sendo que o mês de julho foi o que o paciente IgM positivo procurou assistência médica em virtude do quadro febril que o mesmo apresentou, no ano de 2008. Já os pacientes IgG positivos manifestaram quadro suspeito de dengue em abril e agosto de 2008 (gráfico 3).

O único paciente positivo na detecção de IgM, era proveniente do bairro da Parquelândia da cidade de Fortaleza, tinha 10 anos de idade em 2008, e estava no 4º dia de manifestações sintomáticas ao momento da coleta das amostras. O mesmo apresentou cefaléia, prostração e adinofagia, e não relatou manifestações hemorrágicas. Em 2008, o único exame solicitado para o mesmo foi o isolamento viral, o qual foi negativo, assim como nos outros testes de dengue realizados no presente trabalho.

#### 4.6 SFI

Ao final do estudo, 40 pacientes (40/82; 48,78%) foram classificados como SFI por terem sido negativos em todos os testes realizados, permanecendo com etiologia da síndrome febril desconhecidas, mesmo após a realização dos testes específicos para dengue, leptospirose e hantavírus. Assim, as etiologias desses pacientes foram classificadas como SFI.

A maioria desses pacientes, 67,5% (27/40), era do sexo feminino, enquanto apenas 32,5% (13/40) eram do sexo masculino (tabela 11).

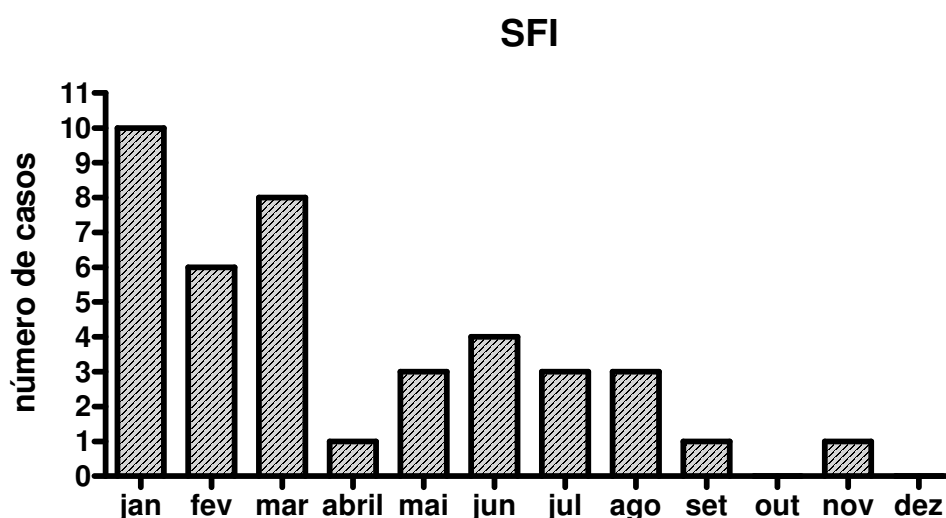
**Tabela 11.** Distribuição por sexo dos pacientes negativos em todos os testes diagnósticos de dengue, leptospirose e hantavírus.

GÊNERO	SFI (n= 35)	
	N	%
Feminino	27	67,5
Masculino	13	32,5
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

A média de idade dos pacientes que ficaram sem diagnóstico definido foi de 33 anos (variação de 0 a 69 anos). Esses pacientes se distribuíram nas mais diversas faixas etárias, no entanto, a faixa com maior número de pacientes com SFI foi de 20 a 29 anos, com uma frequência de 11 pacientes. Também a maioria desses pacientes (35/40; 87,5%) residia em Fortaleza, de fato, apenas 5 pacientes (14,28%) não tinham a informação sobre o município de residência nas fichas do SINAN.

As amostras dos pacientes negativos para todos os agentes etiológicos testados foram colhidas em diversos dias de sintomas, com maior frequência até o 5º dia (32/40; 80%).

Os meses com maior número de casos de SFI foram janeiro (10/40), março (8/40) e fevereiro (6/40), respectivamente. Entretanto, houve casos de SFI em quase todos os meses, com exceção de outubro e dezembro (gráfico 4).



**Gráfico 4.** Distribuição mensal de casos de SFI, incluídos no estudo.

A tabela 12 ilustra a distribuição etária de acordo com a infecção que apresentaram os pacientes incluídos nesse trabalho.

**Tabela 12.** Distribuição dos pacientes de acordo com a faixa etária e diagnósticos de infecção aguda.

Faixa etária	Dengue	<i>Leptospira</i>	Hantavírus	SFI
0-9	<b>11</b>	-	-	3
10-19	6	-	<b>1</b>	5
20-29	2	<b>4</b>	-	<b>11</b>
30-39	7	-	-	6
40-49	4	1	-	2
50-59	1	-	-	5
60-69	1	1	-	2
≥70	3	-	-	1
ñ-informado	-	-	-	5
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>40</b>

De forma semelhante, a tabela 13 permite comparar a distribuição dos casos das diferentes infecções dengue-símiles, ao longo do ano de 2008.

Tabela 13. Distribuição dos pacientes de acordo com o mês da infecção aguda.

Mês infecção	Dengue	<i>Leptospira</i>	Hantavírus	SFI
Jan	3	-	-	10
Fev	4	-	-	6
Mar	8	-	-	8
Abr	11	2	-	1
Mai	4	3	-	3
Jun	5	-	-	4
Jul	-	1	1	3
Ago	-	-	-	3
Set	-	-	-	1
Out	-	-	-	-
Nov	-	-	-	1
Dez	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>40</b>

O gráfico seguinte (gráfico 5) evidencia a distribuição mensal de todas as infecções de dengue e dengue-símile, incluídas neste trabalho.

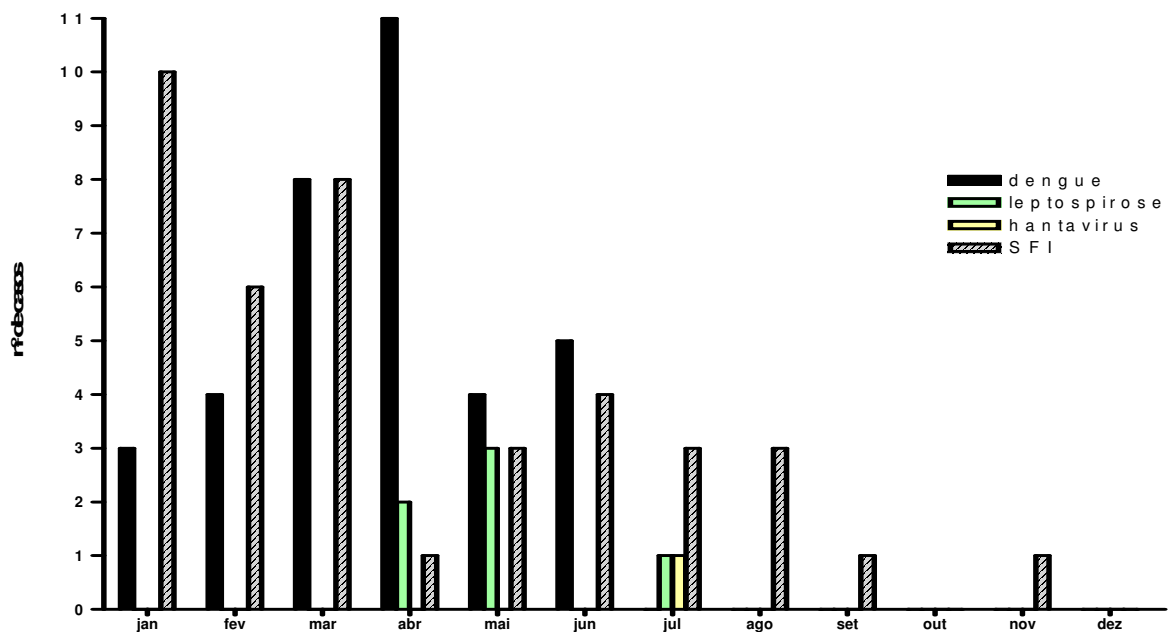


Gráfico 5. Distribuição mensal de casos de dengue, leptospirose, hantavirose e casos de outras síndromes febris.

Dentre os 82 pacientes incluídos no estudo, 35 (35/82; 42,68%) foram classificados como dengue, 7 pacientes (7/82; 8,54%) foram identificados com uma das patologias estudadas neste trabalho (6 com leptospirose; 1 com hantavirose), e 40 pacientes (48,78%) não tiveram etiologia do seu quadro clínico identificada e foram classificados como SFI.

## 5.0 DISCUSSÃO

A dengue é uma doença infecciosa sistêmica e dinâmica e, por ser uma doença de notificação compulsória, deve ser comunicada às autoridades sanitárias locais responsáveis pelo controle da mesma (BRASIL, 2010; OPAS, 2010). Geralmente, essa comunicação é realizada por meio de sistemas eletrônicos de notificação, como é o caso do SINAN, que tem mostrado grande valia, não somente para fornecer subsídios à vigilância e ao controle da doença, como também por servir como fonte de dados para pesquisas (MORAES & DUARTE, 2009; BRASIL, 2010).

A ficha do SINAN possui diversos campos de preenchimento que, quando adequadamente preenchidos, fornecem importantes dados epidemiológicos, virológicos e clínicos. A ficha permite a coleta de dados epidemiológicos tais como o nome, o endereço, a idade, a ocupação, o telefone e o sexo do paciente, o hospital e a data de atendimento, o(s) sorotipo(s) circulantes numa dada região, a autoctonia do município, a data do início dos sintomas e a classificação final do caso. Dentre os dados laboratoriais, ela pode informar sobre a realização/não-realização de RT-PCR, IgM-ELISA e IV e os resultados dos respectivos testes, bem como o sorotipo isolado, em caso de IV positivo. Informações clínicas também são possíveis de ser obtidas, tais como a evolução do caso, a presença/ausência de manifestações hemorrágicas, caso com complicações, o grau de FHD/SCD, número de plaquetas, o método pelo qual o extravasamento plasmático foi evidenciado, se houve necessidade de internação e o hospital onde o paciente foi internado.

Os dados dos pacientes incluídos neste trabalho, foram coletados das fichas do SINAN e forneceram informações sobre a idade, o tempo decorrido do início dos sintomas até o período da primeira avaliação médica, o sexo, o endereço, a data, os testes diagnósticos realizados, e o critério de confirmação laboratorial ou clínico-epidemiológico dos casos de dengue ou dos classificados como SFI, descartados para dengue. Infelizmente, informações importantes sobre a evolução do caso, a autoctonia, a natureza primária ou secundária da infecção e, especialmente, dados sobre a clínica do paciente, foram, na maioria das fichas, ausentes. Infelizmente, o preenchimento incompleto dessas fichas é uma realidade frequente no estado do Ceará e no país como um todo. De fato, diversos trabalhos tem mostrado que são frequentes as falhas de preenchimento das fichas do SINAN, além de possíveis superestimções no número de casos de dengue relatados sem confirmação laboratorial,

limitando a qualidade dos dados fornecidos por esse sistema (SKABA *et al.*, 2004; TOLEDO *et al.*, 2006; MACHADO & OLIVEIRA & SOUZA-SANTOS, 2009).

Toledo e colaboradores (cols.) (2006), analisando a confiabilidade do diagnóstico final de notificações de casos de dengue em período epidêmico através de fichas do SINAN, encontraram elevada proporção de informação ignorada para a maioria das variáveis, com exceção dos campos de preenchimento obrigatório como nome, sexo, idade, endereço e data de notificação. Tal fato certamente interfere na avaliação de uma dada epidemia, dificultando, assim, o conhecimento fidedigno do perfil clínico-epidemiológico da mesma (TOLEDO *et al.*, 2006). Rique e Silva (2011), estudando notificações de casos de óbito por AIDS, encontraram um percentual de subnotificação de 12,4% no SINAN, mostrando que este parece estar ainda subempregado, não desempenhando todo o seu potencial na vigilância epidemiológica e na produção científica.

Um provável motivo para as falhas da ficha do SINAN, encontradas no presente estudo, pode ter sido devido à elevada demanda do número de casos, uma vez que 2008 foi um ano epidêmico com exorbitante número de casos, fato que pode ter sobrecarregado os serviços de atendimento e de vigilância epidemiológica, diminuindo a qualidade dos dados por ele disponibilizados.

A classificação da dengue, segundo a Organização Mundial de Saúde, é retrospectiva e depende de critérios clínicos e laboratoriais que nem sempre estão disponíveis nos primeiros dias da doença. É perfeitamente possível que um paciente com dengue, apresentando febre, mialgia e dor retroorbitária, por exemplo, evolua sem qualquer complicação, ou pode ser que, por volta do 5º dia de doença, sem febre, surjam dispnéia, dor abdominal e hematêmese com evolução gravíssima para FHD/SCD ou para DCC. Por essas razões, o Ministério da Saúde propõe uma abordagem clínico-evolutiva (BRASIL, 2007; 2011).

A rigor, um caso suspeito de dengue só pode ser confirmado após diagnóstico laboratorial. Entretanto, devido à quantidade exorbitante de casos suspeitos durante períodos epidêmicos, a confirmação pode ser realizada através de critérios clínicos associados à epidemiologia (BRASIL, 2011). Todavia, a utilização destes critérios como única base para o diagnóstico pode ser arriscada, uma vez que muitos sintomas inespecíficos da dengue se assemelham aos de outras doenças infecciosas, as quais requerem tratamento específico (CASTRO-JORGE *et al.*, 2010). Neste estudo, observou-se que 57,14% (28/49) dos pacientes confirmados como dengue no SINAN haviam sido classificados como dengue por critério laboratorial, enquanto 42,86% (21/49) haviam sido classificados como dengue pelo critério

clínico-epidemiológico, visto que o ano de 2008 foi um ano epidêmico com um importante número de casos clássicos e hemorrágicos no estado do Ceará.

Não há questionamentos acerca da importância da clínica no diagnóstico da dengue, especialmente porque, na ausência de manifestações sintomáticas o paciente dificilmente procura assistência médica e sem sintomas específicos, a suspeita clínica inicial torna-se difícil. Entretanto, em anos epidêmicos, a mídia e o conhecimento atual sobre a letalidade da dengue tem alertado os profissionais de saúde e a população sobre os riscos de contrair a doença e sobre a necessidade de sempre se considerar qualquer síndrome febril como sendo um caso suspeito de dengue, mesmo sem sintomas específicos, especialmente no primeiro semestre desses períodos.

Nos estágios mais precoces da doença, a clínica, assim como a maioria dos testes laboratoriais, não corresponde aos critérios da OMS (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997). O primeiro ELISA que detecta a proteína viral NS1 a partir do soro dos pacientes na fase inicial da doença foi desenvolvido no ano 2000 (YOUNG *et al.*, 2000). A partir desse dado, a detecção do vírus pode ser realizada precocemente, quando a maioria dos métodos ainda não é capaz de detectar nem o vírus, nem os anticorpos produzidos contra o mesmo. No entanto, é plausível supor que a maioria dos pacientes com suspeita de dengue atendidos nos hospitais não se encontra no estágio mais precoce. O fato é que, dependendo do atendimento do paciente, por meio de uma anamnese detalhada, pode ser possível coletar informações relevantes que propiciem um diagnóstico clínico mais embasado e, portanto, fornecer um diagnóstico mais confiável, principalmente em períodos epidêmicos.

Em teoria, os dados clínicos deveriam sempre estar associados aos achados laboratoriais, um dando suporte ao outro, pois, assim como os exames laboratoriais fornecem um certo grau de certeza diagnóstica, a depender do teste (dentre uma série de outros fatores), a clínica é indispensável e fornece informações e evidências muito importantes acerca da doença.

A dengue pode ser diagnosticada pelos mais diversos métodos, que podem diferir em vários aspectos como o tempo de doença, a rapidez do teste, o preço, a infra-estrutura do laboratório, finalidade do teste (diagnóstico clínico, inquérito epidemiológico, pesquisas para desenvolvimento de vacinas), etc. Para a confirmação de um caso suspeito de dengue, pode se lançar mão dos métodos de detecção do vírus, do ácido nucléico viral, de Ags virais, de anticorpos específicos contra o vírus, ou ainda uma combinação dessas técnicas. Nos estágios mais precoces, o IV, a detecção do material genético ou de Ags virais podem ser utilizados, visto que essas técnicas requerem a viabilidade viral e que o vírus pode ser detectado até cerca



do 5º dia após o início dos sintomas. Já ao final da fase aguda, os mais recomendados são os métodos sorológicos (WHO, 2009).

Neste estudo, 35 pacientes tiveram diagnóstico de dengue, sendo que 34 deles tiveram suas amostras positivas apenas no ELISA e 4 positivos no ELISA e também no RT-PCR. Quatro pacientes, anteriormente classificados como DC por critérios clínico-epidemiológicos no SINAN, foram confirmados como dengue-positivos por ELISA, bem como outros 4 pacientes, que haviam sido classificados como SFI. A confirmação laboratorial dos 4 primeiros demonstra como o critério clínico, muitas vezes, permite um diagnóstico correto. Por outro lado, os outros 4 pacientes, classificados como SFI no SINAN, provavelmente apresentaram infecção subclínica, pois, mesmo infectados com o DENV, não apresentaram sintomatologia suficiente para preencher os requisitos preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Infelizmente, nenhum teste é completamente específico e sensível ao mesmo tempo, e, conseqüentemente, todos são passíveis de falsos positivos e/ou falsos negativos. Para a escolha do melhor método deve se levar em consideração as vantagens e os fatores limitantes que cada teste apresenta.

O teste de inibição de hemaglutinação (HI) é uma técnica sensível e reprodutível, com as vantagens de utilizar reagentes que podem ser localmente preparados, ser capaz de diferenciar infecções primárias de secundárias, baseado nos títulos de anticorpos e detectar infecções prévias, sendo ideal para estudos soro-epidemiológicos (YAMADA *et al.*, 2002; SHU & HUANG, 2004; KAO *et al.*, 2005). Entre as principais desvantagens desse método é possível citar a necessidade de pré-tratamento das amostras com reagentes como a acetona ou kaolina para remover inibidores inespecíficos da hemaglutinação; a necessidade de hemácias de ganso ou de sangue humano do tipo O para remover aglutininas inespecíficas; a indispensável aquisição de amostras de soro pareadas, tanto da fase aguda como de convalescência; e também a dificuldade de distinção de dengue entre outros flavivírus pela possibilidade de haver reações cruzadas, especialmente em áreas onde a dengue ocorre que são endêmicas também para esses flavivírus (YAMADA *et al.*, 2002; KAO *et al.*, 2005). Essa técnica não foi utilizada neste estudo em decorrência de todas essas desvantagens, somada ao reduzido volume das amostras.

O IV é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de dengue e, embora apresente a vantagem de permitir a identificação do sorotipo envolvido na infecção, apresenta as desvantagens de despender muito tempo para a obtenção dos resultados, uma vez que a taxa de replicação do vírus é baixa; ser sensível apenas no período virêmico, que é curto; ser

afetado pela presença de anticorpos nas amostras, a depender do tempo de apresentação de febre do paciente e/ou de infecção anterior por outro sorotipo; requerer cuidados indispensáveis no manuseio e acondicionamento das amostras para evitar a inativação térmica do vírus; e a necessidade de laboratórios munidos com equipamentos imprescindíveis para cultura de células e profissionais de laboratório bem treinados. A falta de recursos necessários para criar e manter estes laboratórios limita bastante o uso dessa técnica (WHO, 1997; GUZMÁN & KOURI, 2004; KAO *et al.*, 2005; TELES, 2011). Além disso, o IV pode falhar quando o inóculo possui pequenas quantidades de vírus viáveis e/ou quando há presença de complexos vírus-anticorpos (LANCIOTTI *et al.*, 1992). O fator tempo para resultado diagnóstico atualmente é fundamental para a conduta clínica, o que esclarece a utilização desse teste muito mais frequentemente na pesquisa do que na rotina laboratorial. O IV possui uma sensibilidade baixa, razão pela qual a amostragem do presente trabalho foi realizada a partir de amostras negativas nesse teste.

Por outro lado, o IV permite a identificação do sorotipo responsável pela infecção. Essa determinação dos sorotipos da dengue em epidemias passadas e atuais, é crucial para prever a gravidade e também para detectar quando há mudança do sorotipo predominante, o que poderia servir como sinal de alerta para um surto de dengue (PUTTIKHUNT *et al.*, 2011). No Ceará, os sorotipos que circularam em 2008 foram DENV-2 e DENV-3 (CEARÁ, 2011). De fato, a sorotipagem realizada nesse estudo, realizada através do RT-PCR, também mostrou a presença dos referidos sorotipos nas amostras positivas neste teste.

O diagnóstico molecular, baseado no RT-PCR e/ou no qPCR tem substituído gradativamente o isolamento viral, tornando-se um forte candidato a ser considerado padrão-ouro para a detecção viral na fase aguda da doença (SHU & HUANG, 2004). Isso porque, além de demandar menos tempo que o IV, é mais sensível, pois é capaz de amplificar o material genético até mesmo de vírus inativados. Além disso, alguns estudos têm mostrado que o RT-PCR pode permitir a detecção de dengue em amostras estocadas por longos períodos, mesmo em amostras com mais de 15 anos (ALVAREZ *et al.*, 1996; SARIOL *et al.*, 1999). Vários protocolos têm sido desenvolvidos, variando nas sequências-alvo, especificidades e sensibilidades dos mesmos (KAO *et al.*, 2005). Nas Américas, o protocolo descrito por LANCIOTTI e colaboradores (1992) tem sido amplamente utilizado. Este consiste num RT-PCR multiplex que utiliza *primers* desenhados a partir de uma região consenso e quatro *primers* específicos para cada sorotipo, gerando fragmentos de tamanhos diferentes, e permitindo a diferenciação do(s) sorotipo(s) responsável (eis) pela infecção e possui sensibilidades de 94%, 93%, para DENV-1 e DENV-2, respectivamente, e de 100%

para o DENV-3 e DENV-4, em comparação com o IV (LANCIOTTI *et al.*, 1992). Araújo e cols. (2006) relataram um caso ocorrido em 2003 de co-infecção por DENV-2 e DENV-3 em um paciente residente em Tauá, no estado do Ceará. Este paciente apresentou sintomas leves, mesmo com a infecção dupla, que foi confirmada tanto por IV quanto pelo RT-PCR, seguindo a técnica de Lanciotti e cols. (1992) (ARAÚJO *et al.*, 2006).

Dentre as desvantagens e desafios desse método, é possível citar o curto período virêmico, a possibilidade de contaminação, a necessidade de estocagem das amostras em temperaturas extremamente baixas, devido à intrínseca termolabilidade do RNA viral, em potentes refrigeradores, os quais não são facilmente adquiridos em áreas endêmicas, a necessidade de equipamentos de precisão e de profissionais bem-treinados, além do alto custo dos aparelhos e da sua complexidade (TELES *et al.*, 2011; WENG *et al.*, 2011).

Apesar de ser um método de crescente aceitação e que tem mostrado bons resultados, o RT-PCR utilizado neste estudo, mesmo seguindo o protocolo de Lanciotti (1992) foi positivo em apenas quatro amostras. Um dos prováveis fatores determinantes foi o tempo decorrido da data dos primeiros sintomas até a coleta das amostras, pois a maioria dos pacientes dengue-positivos (54,29%) teve suas amostras coletadas após o 5º dia do início das manifestações sintomáticas e, no entanto, sabe-se que o RT-PCR, assim como o IV, é mais sensível nos primeiros cinco a seis dias de infecção, enquanto os testes sorológicos, como o ELISA-IgM, são mais sensíveis após esse período (POERSCH *et al.*, 2005). Outra explicação plausível seria a degradação do RNA viral, que pode ter ocorrido em várias etapas: durante a preparação da reação, ou nas etapas pré-analíticas do manuseio das amostras colhidas, transporte e acondicionamento das mesmas. Estes dois últimos merecem especial atenção por não serem, normalmente, controlados nos estudos retrospectivos (NAJIOULLAH *et al.*, 2011). Além disso, a sensibilidade dos métodos de RT-PCR varia não somente de acordo com o protocolo adotado, mas também com os diferentes *primers*, enzimas, tampões, condições das reações, sequências-alvo do genoma. Qualquer um desses critérios pode influenciar os resultados de uma reação de PCR (KAO *et al.*, 2005).

Dentre os testes sorológicos, a OMS considera o MAC-ELISA como o padrão-ouro dos métodos sorológicos para a detecção de anticorpos IgM específicos contra o vírus dengue, que é utilizado como um parâmetro de diagnóstico presuntivo de infecções recentes causadas por um dos quatro sorotipos onde o vírus circula. Embora esse método venha sendo utilizado por mais de duas décadas, ele apresenta a grande desvantagem de consumir cerca de 72 horas para a obtenção dos resultados (NUNES *et al.*, 2011). A detecção de IgM e IgG por ELISA

apresenta diversas vantagens sobre o IV como o fato de serem mais disponíveis do que os testes virológicos nos países onde a dengue é endêmica; não serem bastante afetados pela temperatura ambiente dos países tropicais, pois as imunoglobulinas permanecem estáveis nessas temperaturas, o que leva o transporte das amostras a não ser um problema; permitem uma maior flexibilidade no tempo de coleta das amostras, uma vez que as respostas de anticorpos permanecem detectáveis por mais tempo, após início da doença; os serviços de sorologia são mais prontamente acessíveis, as técnicas são relativamente simples e os reagentes são comercializados (WHO, 1997; 2009). Além disso, os anticorpos podem ser detectados não somente a partir do soro dos pacientes infectados, como também de outros fluidos corpóreos como a saliva e o líquido cefalorraquidiano e esses testes são de execução e padronização mais simples, o que os torna apropriados para serem considerados os métodos de rotina para o diagnóstico de dengue (CHEN & HUANG & FANG, 1991; PANCHAREON & THISYAKORN, 2001; HU *et al.*, 2011). Vários kits comerciais de ELISA tem sido desenvolvidos para a detecção de IgM e também de IgG, variando em sensibilidades e especificidades. Dentre eles, os kits desenvolvidos pela PanBio<sup>®</sup> tem mostrado grande valia no diagnóstico de dengue e na distinção entre infecções primárias e secundárias e tem sido bastante utilizados na rotina laboratorial (VAUGN *et al.*, 1999; CHAKRAVARTI *et al.*, 2000; CUZZUBBO *et al.*, 2000; SATHISH *et al.*, 2003).

O aparecimento de anticorpos IgM anti-dengue ocorre, geralmente, a partir do 5º dia da doença, e, na maioria dos pacientes, podem persistir por 60 a 90 dias após o início da doença (KAO *et al.*, 2005).

Embora o ELISA seja o método mais utilizado na rotina laboratorial, ele também apresenta uma série de desvantagens, das quais é possível citar que: não é um teste muito sensível antes do 5º dia de doença; de maneira geral, cerca de 10% de casos falso-negativos e 1,7% de falso-positivos podem ser observados na detecção de IgM; resultados falso-positivos podem ser causados por ativação policlonal de linfócitos B ou por reações cruzadas geradas por certos epítomos, comuns a outras espécies do gênero *Flavivirus*. Esses epítomos compartilhados, especialmente os do envelope glicoprotéico, levam à produção de anticorpos contra um sorotipo do vírus, que podem reagir cruzadamente com outros sorotipos, diferentes daquele que induziu a sua produção ou mesmo com outros flavivírus (como o vírus da encefalopatia japonesa, o da encefalite de Saint Louis e o da febre amarela). Isso tem importância especialmente em áreas onde dois ou mais flavivírus co-circulam; anticorpos IgG tem alto grau de reações cruzadas a Ags homólogos e heterólogos, podendo gerar falso-positivos; o sorodiagnóstico de infecções passadas, recentes ou atuais de dengue é difícil, uma

vez que o IgG adquirido em infecções prévias pode persistir por muito tempo ou até mesmo por toda a vida (INNIS *et al.*, 1989; GUBLER, 1996; GUZMÁN & KOURI, 2004).

Neste estudo, o IgM-ELISA mostrou resultados satisfatórios, detectando presença de anticorpos IgM em 35 pacientes. Entretanto, a positividade no teste sugere infecção atual ou recente, mas não é útil para a determinação do sorotipo, além de que depende do estado imune do hospedeiro e pode estar ausente em infecções secundárias. Estes últimos são importantes porque podem exercer efeitos diretos no diagnóstico (KAO *et al.*, 2005; TELES & PRAZERES & LIMA-FILHO, 2005). Outros fatores que não permitem que a detecção de IgM numa única amostras seja suficiente para classificar uma infecção como atual é que esses anticorpos podem permanecer por cerca de três meses ou mais, em alguns indivíduos, e o fato de sua detecção não ser tipo-específica (VORNDAM & KUNO, 1997). Por não ter sido possível averiguar a produção de anticorpos IgG específicos contra o vírus dengue, não se pode estimar o número de casos que podem ter sido subestimados neste estudo, visto que o IgM em infecções secundárias é produzido em quantidades menores ou mesmo indetectáveis (WHO, 2009).

O diagnóstico precoce da dengue permanece como um problema para os países endêmicos, especialmente para os mais pobres, pois os testes sorológicos não fornecem resultados antes do 5º dia de doença e, dependendo do teste, pode ser necessário utilizar amostras pareadas, aumentando o tempo de diagnóstico. O RT-PCR, embora permita o diagnóstico na fase virêmica, é extremamente caro e necessita de técnicos bem treinados, além de infra-estrutura adequada à realização das diferentes etapas do método, para evitar contaminação com *amplicons*. Por sua vez, o IV é a abordagem mais conclusiva para o diagnóstico de dengue, mas é impróprio para o manejo dos pacientes, devido ao tempo necessário para obter os resultados finais. A detecção de NS1 do vírus dengue tem se tornado uma alternativa atraente para o diagnóstico precoce de dengue.

A NS1 é uma glicoproteína altamente conservada, presente em todos os sorotipos do vírus dengue, podendo ser expressa na membrana ou ser secretada na forma solúvel (FALCONAR, 1997; FLAMAND *et al.*, 1999). Esta circula no soro dos pacientes infectados por dengue principalmente durante os estágios precoces e, nesses períodos, podem ser detectados por meio de diversos testes comerciais de ELISA e/ou imunocromatografia (YOUNG *et al.*, 2000; KUMARASAMY *et al.*, 2007; BLACKSELL *et al.*, 2008; DUSSART *et al.*, 2006; CHAIYARATANA *et al.*, 2009; HANG *et al.*, 2009; MCBRIDE, 2009; ZAINAH *et al.*, 2009; NAJIOULLAH *et al.*, 2011). O NS1 circulante pode ser detectado desde o 1º dia de doença até o início da fase de convalescença (HU *et al.*, 2011). A detecção

sérica do NS1 é mais sensível nas infecções primárias do que nas secundárias e já foi mostrado que anticorpos IgG anti-NS1 estão presentes durante os primeiros dias de uma infecção secundária, podendo se ligar a uma quantidade razoável do Ag, levando à diminuição da sua detecção. Talvez isso explique a observação do ponto mais baixo da sensibilidade do teste ocorrer por volta do 6º dia de doença (NAJILOULLAHA *et al.*, 2011). Uma evidência de que esse fato ocorre é que a dissociação desses complexos Ag-anticorpos aumenta moderadamente a sensibilidade do teste, especialmente nas infecções secundárias (LAPPHRA *et al.*, 2008). A antigenemia do NS1-ELISA tem se mostrado detectável até o 8º dia, em alguns trabalhos, mas em alguns casos, pode ser encontrada no 18º dia após o início dos sintomas (ALCON *et al.*, 2002; DUSSART *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2006; CASTRO-JORGE *et al.*, 2010).

A detecção de NS1 possui diversas vantagens, a despeito do RT-PCR, que incluem a rapidez, conveniência, o custo-benefício, a fácil aplicação e padronização, e o período mais longo para a detecção, em relação ao curso da doença, o que o torna bastante adequado para a pesquisa em países pobres (HU *et al.*, 2011). Além disso, a utilização de anticorpos NS1 sorotipo-específicos pode ser utilizada para diferenciar a dengue de outras flavivirose (XU *et al.*, 2006; QIU *et al.*, 2009). Alguns trabalhos sugerem ainda que o NS1-ELISA pode ser mais sensível do que o RT-PCR (KUMARASAMY *et al.*, 2007; BESSOFF *et al.*, 2010). Najiloullaha e cols. (2011) compararam, prospectivamente, o NS1-ELISA e o teste de imunocromatografia de fluxo lateral (ICFL) com o RT-PCR para o diagnóstico de dengue e não encontraram casos falso-positivos em nenhum dos dois testes para a detecção do referido Ag. A reduzida sensibilidade nas infecções secundárias, próximo do momento mais crítico para uma possível ocorrência de FHD/SCD, é a principal limitação dos testes de detecção de NS1 (NAJILOULLAHA *et al.*, 2011).

Atualmente, pelo fato de que a dengue representa a mais importante arbovirose em todo o mundo, em termos de morbi-mortalidade e, considerando o seu espectro clínico inespecífico, torna-se difícil distingui-la de outras doenças febris utilizando apenas critérios clínico-epidemiológicos, sem lançar mão de métodos laboratoriais (MCBRIDEA & BIELEFELDT-OHMANN, 2000; GUZMAN & KOURI, 2003). Para tanto, o Ministério da Saúde recomenda a realização de diagnóstico diferencial para uma série de patologias, dentre as quais se encontram a leptospirose, febre do oropouche e hantavirose, dentre outras (BRASIL, 2007).

A leptospirose apresenta como sintomas mais comuns, na fase precoce, febre de início abrupto, calafrios, dor de cabeça, mialgia, sufusão conjuntival e icterícia, entretanto a febre

pode ser o único sintoma identificável em muitos casos (WHO, 2003; KO *et al.*, 1999). De fato, a leptospirose caracteriza-se como uma doença febril na maioria, ou em todos os casos sintomáticos. Por outro lado, as manifestações subclínicas ou assintomáticas não são bem compreendidas (TAKAFUJI *et al.*, 1984; HEATH & ALEXANDER & GALTON, 1965).

Seu quadro clínico inespecífico torna difícil distingui-la de outras doenças febris, especialmente aquelas que também se manifestam com sintomas inespecíficos como dor de cabeça e mialgia como dengue, influenza e outras (BAJANI *et al.*, 2003). Dessa forma é que, em vários países em desenvolvimento, ela é uma causa comum de síndrome febril indiferenciada, podendo ser responsável por 20-40% dessas infecções (KO *et al.*, 1999; EL JALII & BAHAMAN, 2004; MURDOCH *et al.*, 2004; SUTTINONT *et al.*, 2006; WUTHIEKANUN *et al.*, 2007).

Nesta pesquisa, seis pacientes mostraram positividade para a produção de anticorpos IgM anti-*Leptospira*. Diversos trabalhos têm evidenciado confusão diagnóstica entre dengue e leptospirose e, dentre eles, alguns, realizados em áreas endêmicas para ambos, indicam a leptospirose como etiologia de síndrome febril indiferenciada em pacientes com sintomas de dengue (SANDERS *et al.*, 1999; FLANNERY *et al.*, 2001). Bruce e cols. (2005), estudando casos com suspeita de dengue em Porto Rico, encontraram leptospirose como etiologia dos casos. LEVETT e cols. (2000) em estudo realizado em Barbados, também detectaram leptospirose entre os casos de suspeita de dengue. Da mesma maneira, casos de dengue têm sido detectados em pacientes com suspeita de leptospirose (LEVETT & BRANCH & EDWARDS, 2000).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil são necessários apenas dois sintomas de dengue associados a febre de até sete dias para se considerar um caso suspeito, que deve ser notificado à Vigilância Epidemiológica. Além disso, em épocas de epidemias de dengue, quando um caso suspeito não é confirmado pelos exames laboratoriais, a confirmação pode ser realizada levando em consideração apenas os critérios clínico-epidemiológicos, com exceção dos primeiros casos da área, os quais necessariamente precisam ter sido confirmados laboratorialmente (BRASIL, 2007). Entretanto, é provável que muitos casos de dengue confirmados dessa maneira, sejam na verdade, infecções causadas por outros agentes etiológicos, dentre eles, bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. De fato, neste estudo, um paciente havia sido classificado no SINAN como um caso de dengue, pelo critério clínico-epidemiológico, mas, na verdade, estava acometido por leptospirose. Esse fato sugere que, durante uma epidemia de dengue, alguns casos suspeitos, confirmados pela sintomatologia clínica associada a dados epidemiológicos mesmo sem apoio laboratorial, são falsos positivos,

uma vez que os sintomas iniciais da dengue são inespecíficos. Assim, há uma grande possibilidade de que, em períodos epidêmicos, outras infecções que causem a mesma sintomatologia inespecífica, sejam então diagnosticadas como dengue pelo critério clínico-epidemiológico.

Os casos de leptospirose detectados nesse estudo se concentraram no primeiro semestre do ano e a faixa etária de 20 a 49 anos foi a mais acometida, em conformidade com a literatura, que relata exatamente a mesma sazonalidade e faixa etária. Entretanto, neste estudo a frequência de pessoas do sexo feminino foi maior do que do sexo masculino, o que se contrapõe ao dados dos últimos anos da secretaria de saúde do Estado do Ceará, que mostra um percentual de 85,8% de casos que acometem a população masculina (MAGALHÃES & ZANELLA & SALES, 2009; CEARÁ, 2011).

O IgM-ELISA utilizado nesse estudo é um teste sensível e específico, quando utilizado na fase aguda da leptospirose. Os anticorpos IgM se tornam detectáveis durante a primeira semana da doença, permitindo a confirmação diagnóstica laboratorial do caso e o início do tratamento (ZAQUI & SHANBAG, 2010). Além de ser de fácil execução, rápido e de permitir o emprego de uma única amostra de soro, este teste eliminou as deficiências da MAT, que é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de leptospirose. Esta técnica tem a grande desvantagem de não ser suficientemente sensível para orientar o diagnóstico a tempo de influenciar o tratamento de um único paciente (KARANDE *et al.*, 2005).

A leptospirose vem sendo notificada no Estado desde 1995. De acordo com o informe epidemiológico de leptospirose da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA-CE) publicado no dia 31 de janeiro de 2011, no ano de 2008, 192 casos de leptospirose foram notificados, com 79 deles confirmados em 18 municípios e, dentre eles, 29 casos ocorreram no município de Várzea Alegre/CE (CEARÁ, 2011). Entretanto, um estudo de 315 casos suspeitos de leptospirose (com resultado laboratorial negativo para dengue), realizado neste município pela equipe do Programa de Treinamento em Epidemiologia Aplicada aos Serviços do SUS (EPISUS), mostrou 68 casos confirmados de leptospirose (BRASIL, 2008). Assim, essa discordância nos dados de incidência, em Várzea Alegre, sugere que o número de casos confirmados no Ceará em 2008 foi subestimado.

Já em 2009, foram notificados 602 casos e confirmados 281 em 48 municípios. Destacaram-se, pelo número de casos, os municípios de Fortaleza (48), Várzea Alegre (48) e Pacoti (36). A ocupação que apresentou maior percentual de casos foram trabalhadores ligados a agricultura e pecuária (37%), estudantes (14,8%) e donas de casa (11,1%). Nesse mesmo ano foram confirmados 9 óbitos com uma letalidade de 3,3%, e em 2010, com dados



até 10 de outubro, houveram 81 casos notificados e 25 confirmados, em 13 municípios. A ocorrência foi de 6 óbitos, sendo 3 na capital e 3 no interior do Estado (CEARÁ, 2010). Esses dados mostram que a leptospirose vem apresentando um grande número de casos no Estado, mostrando que é uma doença de importância local, visto que tem se mantido endêmica.

Dentre as amostras negativas para dengue que foram avaliadas para a detecção de leptospirose neste trabalho, foram detectados anticorpos IgM anti-*Leptospira* em 6 pacientes. Esses dados corroboram com relatos de infecção por leptospirose descritos em trabalhos realizados em Porto Rico (SANDERS *et al.*, 1999) e em Bangladesh (LAROCQUE *et al.*, 2005), onde casos desta doença foram diagnosticados através do reteste do soro de pacientes com quadros dengue-símiles porém laboratorialmente negativos para dengue. Isso sugere que o diagnóstico incorreto de dengue e leptospirose leva a um falso aumento do número de casos de dengue durante as epidemias e, mais gravemente, a uma subnotificação de leptospirose nesses períodos (SANDERS *et al.*, 1999; LAROCQUE *et al.*, 2005).

Algumas limitações desse trabalho não permitem afirmar com certeza se os pacientes com positividade para leptospirose verdadeiramente a apresentavam como etiologia do quadro dengue-símile. Primeiramente, a única técnica disponível foi a detecção de IgM anti-*Leptospira* por ELISA. Sabe-se que os anticorpos IgM anti-*Leptospira* podem permanecer circulantes durante anos após a exposição inicial, dificultando a diferenciação entre infecções prévias e recentes ou mesmo levando a um resultado falso-positivo (MCBRIDE *et al.*, 2005). Em segundo lugar, as amostras disponibilizadas não eram pareadas, impedindo a realização do teste de aglutinação microscópica (MAT), que é o padrão-ouro.

Por outro lado, o teste ELISA para detecção de leptospirose utilizado nesse estudo (IgM-ELISA, PanBio<sup>®</sup>) tem sensibilidade apropriada (LIBRATY *et al.*, 2007), o que diminui a probabilidade de falsos negativos, em contraposição com o isolamento e cultura de *Leptospira* sp., que requer técnicas laboratoriais e equipamentos especiais, além de possuir baixa sensibilidade (cerca de 30%) e, por vezes, longos períodos de incubação, uma vez que algumas cepas de *Leptospira* possuem baixas taxas de crescimento (WHO, 2003; FONSECA *et al.*, 2006; ADLER & MOCTEZUMA, 2010); e com o MAT, que também tem baixa sensibilidade no início da doença (29.0–48.7%), além de ser uma técnica complexa e que demanda manutenção de culturas vivas e amostras pareadas (SMITS *et al.*, 2000; LEVETT & BRANCH, 2002; BAJANI *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2006; ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Mesmo assim, pelo fato de que os kits de ELISA comercializados utilizam Ags derivados de cepas não-patogênicas, geralmente, a MAT tem maior sensibilidade, pois o

ELISA não abrange a detecção de todos os sorovares patogênicos, podendo levar, assim, à ocorrência de resultados falso-negativos (CHALAYON *et al.*, 2011).

O diagnóstico preciso e precoce é imprescindível para a conduta clínica, uma vez que o tratamento apropriado dos pacientes acometidos por dengue ou leptospirose difere substancialmente, e também para que se tomem medidas de vigilância epidemiológica e controle. No caso da leptospirose, por exemplo, a antibiótico-terapia confere melhor resultado, tanto na gravidade, quanto na duração da doença, quando administrada precocemente no curso da infecção (KATZ *et al.*, 2001; ELLIS *et al.*, 2008). Mas, para isso, é fundamental a escolha de um bom método diagnóstico, uma vez que um resultado negativo, seja ele verdadeiro ou falso, pode implicar no impedimento da instituição de um tratamento potencialmente eficiente (SUPUTTAMONGKOL *et al.*, 2010).

Estes achados sugerem que houve subnotificação da leptospirose no Ceará no ano de 2008, devido à inespecificidade dos sintomas, e também alertam para a necessidade de se considerar a real possibilidade de que quadros de leptospirose podem ser confundidos com dengue, sobretudo em períodos epidêmicos desta e em pacientes apresentando quadro febril e diagnóstico laboratorial de dengue negativo.

As hantavirose são zoonoses de roedores que ocorrem em quase todo o mundo. Na síndrome cardio-pulmonar associada ao hantavírus (SCPH), forma da doença em humanos existente nas Américas (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997), apenas após incubação de 9 a 33 dias, é que se manifestam os sintomas inespecíficos, que constituem principalmente febre, mialgia, astenias, náuseas e cefaléia (FIGUEIREDO *et al.*, 2001).

No Brasil, o primeiro caso de hantavirose foi registrado em 1993. Desde então, diversos outros têm sido confirmados em todas as regiões do país. Embora o número de casos de hantavirose seja pequeno em relação a outras doenças zoonóticas, é importante considerar a possível subestimação da ocorrência dessa patologia, uma vez que acomete principalmente habitantes de regiões pouco urbanizadas, com difícil acesso aos serviços de saúde. Outra razão é diagnóstico deficiente, devido à inespecificidade dos sintomas e à rápida evolução clínica (KÖRTING *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura a FHSR, ocorre apenas no Velho Mundo e a SCPH, nas Américas (JONSSON & FIGUEIREDO & VAPALAHTI, 2010). Entretanto no Brasil, houve um relato da presença de casos similares clinicamente a FHSR, descritos em Natal-RN, tendo sido a confirmação do diagnóstico obtida através de imunohistoquímica aplicada a tecidos retirados durante necropsia (FERREIRA *et al.*, 2003). Em Recife, no ano de 1990, foi realizada uma pesquisa que demonstrou evidência sorológica de infecção pelo sorotipo Seoul

em 8 indivíduos com suspeita de leptospirose, a qual foi posteriormente confirmada em 1 paciente pelo teste de neutralização com redução em placa (HINRICHSEN *et al.*, 1993; CLEMENT *et al.*, 1999). Assim, é importante observar que, se realmente for confirmada a existência desse tipo de hantavirose no Novo Mundo, a implementação de diagnóstico diferencial de hantavirose para dengue e leptospirose se torna ainda mais crucial, uma vez que existe grande semelhança de sintomas entre essas patologias.

O diagnóstico inequívoco permite a adoção de medidas específicas que contribuem para reduzir a gravidade das infecções. Nesse estudo dos 72 pacientes avaliados para hantavirus, apenas um deles (1/72; 1,39%) apresentou positividade para a presença de anticorpos IgM (presentes na fase aguda) específicos contra hantavírus no soro, e outros dois (2/72; 2,78%) mostraram a presença de anticorpos IgG contra o vírus. A presença dos anticorpos IgM, que surgem precocemente, já no início dos sintomas, ou a quadruplicação dos títulos de IgG em amostras de soro pareadas confirmam a suspeita clínica (JENISON *et al.*, 1995). O soro do paciente com positividade no IgM apresentou títulos de 1:100 e os outros dois, positivos no IgG, mostraram títulos de 1:100 e 1:400. Esses dados corroboram com um trabalho de Campos e cols. (2003), cujos títulos máximos de anticorpos foram encontrados na diluição de 1:400.

Assim como no presente estudo, outra pesquisa realizada na Indonésia por Suharti e cols. (2009) demonstrou que 58/118 (49,16%) dos pacientes suspeitos foram confirmados sorologicamente como dengue, porém nos outros 60/118 pacientes (50,84%), foi encontrada evidência sorológica de outra infecção recente como: hantavírus (5/60; 8,33%), vírus da rubéola (3/60; 5%) e *Leptospira* (2/60; 3,33%), dentre outros. Dessa forma, enfatiza-se o fato de que com base apenas em critérios clínicos não é fácil diagnosticar a dengue, sendo necessária a realização de testes laboratoriais específicos para diferenciá-la de outras doenças febris.

De acordo com a literatura, essa enfermidade não é específica de nenhum grupo étnico (ELKHOURY, 2005), atinge pessoas de todas as faixas etárias e é de progressão rápida (PETERS & KHAN, 2002; LEDNICKY, 2003). Dentre os 3 pacientes com positividade para hantavírus, 2 eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino, não houve faixa etária predominante e os pacientes estavam no 1º, 4º e 10º dia do início dos sintomas, no momento da coleta de sangue.

Quanto aos resultados da técnica de RT-PCR, utilizada para identificação de RNA viral em casos suspeitos, nos primeiros 7 a 10 dias de doença, verificou-se que os 72 pacientes foram negativos para amplificação do genoma do vírus. Sendo importante observar que

diferenças significativas entre os vírus isolados de cada região ou país, comprometem a sensibilidade da técnica e dificultam seu uso rotineiro no diagnóstico das hantavirose (TERAJIMA *et al.*,1999).

Um estudo realizado na Índia, por Chandy e cols. (2005) mostrou que, dos 152 pacientes com sintomas de doenças febris, 23 (15,13%, 23/152) foram positivos sorologicamente para hantavirus. O nível de IgM nesses foi significativamente maior do que o observado nos indivíduos do grupo controle. Porém neste tipo de teste, os indivíduos podem apresentar altos níveis de IgM para hantavírus e se tratar apenas de falso positivo, devido à reação cruzada com outros vírus ou infecções assintomáticas. Assim, se faz necessário combinar técnicas moleculares com a sorologia, para confirmar os seus resultados. Este foi um dos motivos pelos quais foram realizadas 3 técnicas para a detecção de hantavirose neste trabalho: IgM-ELISA, IgG-ELISA e o RT-PCR.

Uma vez que não existem vacinas e/ou terapias antivirais específicas contra a dengue e a hantavirose, a única forma de se reduzir a mortalidade por ambas as infecções é o diagnóstico laboratorial rápido e preciso. Vale ressaltar que o reconhecimento precoce baseando-se nos sinais e sintomas iniciais, não é fácil de ser realizado e pode ser confundido com outras doenças endêmicas nas mesmas áreas, tais como a leptospirose (PETERS,1998.)

A realização da pesquisa por hantavirus evidenciou, pela primeira vez, essa infecção em humanos no Ceará, em 3/72 pacientes. A presença de anticorpos IgG contra hantavirus no soro dos pacientes FSP e JGPJ sugere que eles foram previamente ou recentemente infectados por hantavirus, entretanto, esse resultado não permite determinar se o hantavirus foi o agente causador da síndrome febril apresentada por esses pacientes. Sendo assim, o paciente FSP permaneceu com etiologia desconhecida, enquanto que o paciente JGPJ foi positivo para dengue no IgM-ELISA, indicando que o flavivírus foi o causador do quadro clínico deste. Já o paciente DMDM estava provavelmente infectado por hantavirus pois apresentou anticorpos IgM, o que sugere infecção recente ou atual pelo referido vírus. Vale ressaltar que este paciente havia sido outrora classificado no SINAN como caso de dengue, pelo critério clínico-epidemiológico.

O paciente DMDM, IgM positivo, se tratava de uma criança de 10 anos de idade e apresentou dor de cabeça, prostração, adinofagia, redução na contagem de plaquetas (< 150.000/mm<sup>3</sup>) e não apresentou manifestações hemorrágicas (ver tabela 10). Portanto, em relação a esse paciente, baseado nas informações clínicas e laboratoriais disponíveis, não há nenhuma informação que possa estar relacionada a uma síndrome pulmonar.

Os dados encontrados no presente trabalho evidenciam que, durante surtos de dengue, outras infecções, especialmente síndromes febris, como a hantavirose, são confundidas como dengue. Assim, supõe-se que as infecções por hantavírus estão sendo confundidas com dengue ou mesmo outras infecções no Ceará. De fato, este é o primeiro relato desta virose no Estado. Esses dados complementam e corroboram com os dados de Chioratto e cols. (2010), que encontraram anticorpos contra o vírus em roedores reservatórios com o vírus, na Serra de Ibiapaba, sugerindo que a população humana estava em risco de contrair a doença, que é potencialmente grave e letal.

Este estudo sustenta ainda a hipótese de que casos moderados ou atípicos de hantavirose podem estar ocorrendo na região e que o hantavirus que circula no Estado pode ser o Anatajuba, o qual foi associado a infecções humanas no Estado vizinho, Maranhão. É urgente a necessidade de ampliar a vigilância epidemiológica no Ceará a fim de detectar e avaliar a real prevalência da hantavirose no Estado para que medidas preventivas possam ser tomadas, antes que casos graves da doença acometam a população. Mais estudos são necessários com o intuito de contribuir para um maior conhecimento da prevalência das infecções humanas, da apresentação clínica, do vírus e dos reservatórios de maior importância epidemiológica, além de suas relações entre si.

O comportamento das doenças infecciosas que se apresentam como uma síndrome febril aguda, no que diz respeito à incidência, apresentação clínica, recursos diagnósticos, opções terapêuticas, letalidade e medidas de controle, pode variar significativamente conforme a etiologia. A ocorrência de duas ou mais infecções simultâneas não é rara, e a apresentação clínica destes quadros pode ser bastante desafiadora, da mesma forma que as possibilidades terapêuticas e a evolução do paciente co-infectado podem ser bastante complexas, conforme relatado em diversos trabalhos (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2003; KOTHARI *et al.*, 2006).

A alta sensibilidade e especificidade nos testes de diagnóstico utilizados para detecção de infecção precocemente são necessários. A utilização destes testes pode resultar em diagnóstico mais preciso das SFI (LEELARASAMEE *et al.*, 2004).

Ao final do estudo, mesmo após a realização dos testes específicos para dengue, leptospirose e hantavírus, 40/82 pacientes permaneceram negativos, sem diagnóstico etiológico definido e foram classificados como SFI. É importante destacar que estes pacientes podem ter sido acometidos ou por outros agentes patogênicos não estudados nesta pesquisa, que também ocasionam quadro clínico inespecífico semelhante ao de dengue, ou pelos mesmos agentes estudados neste trabalho. Os primeiros podem não ter sido detectados pela

não utilização de técnicas diagnósticas específicas para os mesmos, e os últimos, por não ter sido possível realizar as técnicas adequadas ou a combinação correta delas.

O diagnóstico específico de uma dada patologia representa um notório desafio aos profissionais de saúde das regiões tropicais, uma vez que diversas doenças infecciosas podem apresentar quadro clínico semelhante. O retardo no diagnóstico etiológico comumente leva ao uso empírico de medicação diante da suspeita clínica, principalmente nos casos mais graves.

Urge a necessidade de se ampliar os sistemas de controle e vigilância de síndromes febris, uma vez que a presença de outros patógenos potencialmente fatais, como é o caso do hantavírus, pode estar sendo ignorada, bem como a problemática de se diferenciar casos de leptospirose pode estar sendo negligenciada no Estado do Ceará. Os dados do presente estudo mostram que, na epidemia de dengue de 2008 ocorrida no Ceará, os casos de dengue podem ter sido superestimados, não obstante ao número de casos de outras síndromes febris, que podem ser ocasionadas por patógenos ainda não estudados no Estado. O presente trabalho também reforça a necessidade de se pesquisar por esses agentes para diagnosticar a causa de infecções de etiologia desconhecida, tão comumente denominadas como “viroses”, cujo desconhecimento implica em medidas de tratamento inespecíficas e em limitadas ou inexistentes medidas de controle e vigilância epidemiológica.

## 6.0 CONCLUSÕES

Em relação ao quadro clínico dengue-símile dos pacientes estudados neste estudo, é possível sugerir que:

- O isolamento viral possui baixa sensibilidade no Estado, não sendo adequado o seu uso de forma desconexa aos outros testes para o diagnóstico de dengue;
- Os pacientes dengue positivos estavam infectados pelos sorotipos DENV-2 e DENV-3;
- Na epidemia de 2008, a dengue foi confundida com outras patologias, especialmente, quando a mesma foi confirmada com base apenas nos critérios clínico-epidemiológicos;
- Alguns casos de leptospirose e dengue foram confundidos na mesma epidemia, devido as suas semelhanças clínicas e sazonais;
- Em 2008, houve circulação de hantavírus em seres humanos, no Ceará;
- Outros vírus, especialmente, outros arbovírus podem estar circulando no Ceará, porém, por ainda não terem sido estudados, pensa-se não serem prevalentes no Estado e, assim, podem ser causadores de SFIs e/ou estarem sendo confundidos com dengue;
- Pesquisas mais detalhadas sobre os reservatórios, soroprevalência, ciclo, sazonalidade e manifestações clínicas de hantavírus devem ser realizadas no Ceará, além de estudos sobre o próprio vírus, como, por exemplo, estudos que identifiquem a linhagem do vírus presente no Estado;
- Mais investigações de vigilância de síndromes febris precisam ser realizados visto que estudos como este são extremamente importantes para se conhecer as reais prevalências dessas patologias e seu impacto na população cearense.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELA-RIDDER, B.; SIKKEMA, R.; HARTSKEERL, R.A.. Estimating the burden of human leptospirosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Xxx, xxx–xxx, 2010.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P.. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet Microbiol**,140, 287–296, 2010.

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

ALVAREZ, M.; GUZMAN, M.G.; ROSARIO, D.; VAZQUEZ, S.; PELEGRINO, J.L.; SARIOL, C.. Secuenciación directa a partir de un producto de PCR de una muestra de suero de La epidemia de FHD de 1981. **Rev Cub Med Trop**, 48:53—5, 1996.

ANGEL, B.; JOSHI, V.. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. **J Vector Borne Dis**, 45:56-59, 2008.

ANGEL, B.; SHARMA, K.; JOSHI, V.. Association of ovarian proteins with transovarial transmission of dengue viruses by *Aedes* mosquitoes in Rajasthan, India. **Indian J Med Res**, 128:320-323, 2008.

ARAÚJO, F.M.C.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G.; RAMALHO, I.L.C.; RORIZ, M.L.F.S.; MELO, M.E.L.; COELHO, I.C.B.. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101(8): 925-928, 2006.

ASHFORD, D.A.; KAISER, R.M.; SPIEGEL, R.A.; PERKINS, B.A.; WEYANT, R.S.; BRAGG, S.L.; PLIKAYTIS, B.; JARQUIN, C.; REYES, J.O.L.; AMADOR, J.J.. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. **Am J Trop Med Hyg**, 63: 249-54, 2000.

BAJANI, M.D.; ASHFORD, D.A.; BRAGG, S.L.; WOODS, C.W.; AYE, T.; SPIEGEL, R.A.; PLIKAYTIS, B.D.; PERKINS, B.A.; PHELAN, M.; LEVETT, P.N.; WEYANT, R.S.. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol**, 41(2):803-9, 2003.



BESSOFF, K.; PHOUTRIDES, E.; DELOREY, M.; ACOSTA, L.N.; HUNSPERGER, E.. Utility of a commercial nonstructural protein 1 antigen capture kit as a dengue vírus diagnostic tool. **Clin Vaccine Immunol**,17:949–953, 2010.

BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M.; PERU-UNITED STATES\_LEPTOSPIROSIS CONSORTIUM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, 3: 757–771, 2003.

BLACKSELL, S.D.; MAMMEN JR. M.P.; THONGPASEUTH, S.; GIBBONS, R.V.; JARMAN, R.G.; JENJAROEN, K.; NISALAK, A.; PHETSOUVANH, R.; NEWTON, P.N.; DAY, N.P.. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 60:43–49, 2008.

BOUNLU, K.; INSISIENGMAY, S.; VANTHANOUVONG, K.; SAYKHAM; WIDJAJA, S.; IINUMA, K.; MATSUBAYASHI, K.; LARAS, K.; PUTRI, M.P.; ENDY, T.P.; VAUGHN, D.W.; RAENGSAKULRACH, B.; HYAMS, K.C.; HAYDEN, M.; SCHEFFEL, C.; CORWIN, A.L.. Acute jaundice in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. **Clin Infect Dis**, 27: 717-721, 1998.

BRASIL. FUNASA. Notificação de casos de leptospirose através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (Sinan). **Boletim epidemiológico eletrônico leptospirose**. Ano 02, nº 2, 8-10, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. [http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21922](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21922). Acesso em 08/12/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA N.º 2.472, DE 31 DE AGOSTO DE 2010. Dispõe sobre a Lista de Doenças de Notificação Compulsória. **Diário Oficial da União**, 1º de setembro, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde: Casos e óbitos de hantavirose no Brasil de 1993 a 2009. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1558](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1558). Acesso em 11.11.2010.

BRASIL. SVS/MS. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 6ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

\_\_\_\_\_. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

\_\_\_\_\_. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico** – Adulto e Criança – 3. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 28 p, 2007.

\_\_\_\_\_. **Dengue : diagnóstico e manejo clínico: criança** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília – 1ª ed.: Ministério da Saúde, 2011.

\_\_\_\_\_. Investigação de surto de leptospirose em Várzea Alegre-CE, 2008. Boletim epidemiológico eletrônico leptospirose. Ano 8, no 20, 2008.

\_\_\_\_\_. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. **Boletim eletrônico epidemiológico**. Ano 10, nº2, 15-16, 2010.

\_\_\_\_\_. **Guia de vigilância epidemiológica**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 7. ed. – Brasília, 2009.

BROWN, M.G.; VICKERS, I.E.; SALAS, R.A.; SMIKLE, M.F.. **Trop Doct**, 40 (2):92-4, 2010.

BRUCE, M.G.; SANDERS, E.J.; LEAKE, J.A.D.; ZAIDEL, O.; BRAGG, S.L.; AYE, T.; SHUTT, K.A.; DESEDA, C.C.; RIGAU-PEREZ, J.G.; TAPPERO, J.W.; PERKINS, B.A.; SPIEGEL, R.A.; ASHFORD, D.A.. Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. **Acta Tropica** 96: 36-46, 2005.

CAMPOS, G.M.; SOUSA, R.L.M.; BADRA, S.J.; PANE, C.; GOMES, U.A.; FIGUEIREDO, L.T.M. Serological survey of hantavirus in Jardimópolis county, **Brazil J Med Virol**, 71: 417-422, 2003.

CAMPOS, G.M.; BORGES, A.A.; BADRA, S.J.; FIGUEIREDO, G.G.; SOUZA, R.L.M.; MORELI, M.L.; FIGUEIREDO, L.T.M.. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus: aspectos clínicos de uma doença emergente no sudeste brasileiro. **Rev Soc Bras Med Trop** 42(3):282-289, 2009.

CASTRO-JORGE, L.A.; MACHADO, P.R.L. ; FÁVERO, C.A.; BORGES, M.C.; PASSOS, L.M.R.; OLIVEIRA, R.M.; FONSECA, B.A.L.. Clinical Evaluation of the NS1 Antigen-Capture ELISA for Early Diagnosis of Dengue Virus Infection in Brazil. **J Med Virol** 82:1400–1405, 2010.

CEARÁ. Secretaria da Saúde do Estado. **Informe Semanal Dengue 2010**. Semana Epidemiológica 01 a 26. Fortaleza, 2010.

\_\_\_\_\_. Secretaria da Saúde do Estado. **Informe Semanal Dengue 2011**. Atualizado em 25/02/2011. Fortaleza, 2011.

CHAIYARATANA, W.; CHUANSUMRIT, A.; PONGTHANAPISITH, V.; TANGNARARATCHAKIT, K.; LERTWONGRATH, S.; YOKSAN, S. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 64:83–84, 2009.

CHAKRAVARTI, A.; GUR, R.; BERRY, N.; MATHUR, M.D.. Evaluation of three commercially available kits for serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 36:273-274, 2000.

CHALAYON, P.; CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P.; KALAMBAHETI, T.. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 105, 289–297, 2011.

CHANDY, S.; MITRA, S.; SATHISH, N.; VIJAYAKUMAR, T.S.; ABRAHAM, O.C.; JESUDASON, M.V.; ABRAHAM, P.; YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J.; SRIDHARAN, G.. A pilot study for serological evidence of hantavirus infection in human population in south India. **Indian J Med Res**, 122: 211-5, 2005.

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

CHAMBERS, T.J.; TSAI, T.F.; PERVIKOV, Y.; MONATH, T.P. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting. **Vaccine**, 15,1494-1502, 1997.

CHEN, W.J.; HWANG, K.P.; FANG, A.H. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 22(4):659-63, 1991.

CHILDS, J.E.; KSIASEK, T.G.; SPIROPOULOU, C.F.; KREBS, J.W.; MORZUNOV, S.; MAUPIN, G.O. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. **J Infect Dis**, 169, 1271-1280, 1994.

CHIORATTO, G.T.S.; COSTA, E.C.V.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, A.M.P. Soroprevalência da infecção por hantavírus em roedores do estado do Ceará, Brasil. **Rev Patol Trop**, 39 (1): 1-6, 2010.

CHUANSUMRIT, A.; CHAIYARATANA, W.; PONGTHANAPISITH, V.; TANGNARARATCHAKIT, K.; LERTWONGRATH, S.; YOKSAN, S. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. **Pediatr Infect Dis J**, 27:43–48, 2008.

CINCO, M.; BALANZIN, D.; BANFI, E.. Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis in Italy. **Eur J Epidemiol**, 8:677–682, 1992.

CLEMENT, J.; NEILD, G.; HINRICHSEN, S.L.; CRESCENTE, J.A.; RANST, M.V.. Urban leptospirosis versus urban hantavirus infection in Brazil. **Lancet**, 354:2003-2004, 1999.

COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PURSELL, A.R.. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Appl Microbiol**, 25:976–980, 1973.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R.. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil Rio de Janeiro. **Fundação Oswaldo Cruz**; 1994.

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

CROOKS AJ, LEE JM, EASTERBROOK LM, TIMOFEEV AV, STEPHENSON JR. The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. **J Gen Virol**, 75:3453-60, 1994.

CUNHA, R.V.; MIAGOSTOVICH, M.P.; PETROLA, Z.; ARAÚJO, E.S.M.; CORTEZ, D.; POMBO, V.; SOUZA, R.V.; NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMAYR, H.G.. Retrospective

study on dengue in Fortaleza, state of Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93:155-159, 1998.

CUZZUBBO, A.J.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; SOLOMON, T.; KALAYANAROOJ, S.; AASKOV, J.; Dung, N.M.; Devine, P.L.. Comparison of PanBio dengue Duo IgM and IgG Capture ELISA and Venture Technologies Dengue IgM and IgG Dot Blot. **J Clin Virol**, 16:135—44, 2000.

DAHER E.F.; LIMA, R.S.A; SILVA-JÚNIOR, G.B.; SILVA, E.C.; KARBAGE, N.N.N.; KATAOKA, R.S.; CARVALHO-JÚNIOR, P.C.; MAGALHÃES, M.M.; MOTA, R.M.S.; LIBÓRIO, A.B.. Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. **Braz J Infect Dis**,14(1):3-10, 2010.

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

DAS, D.; MONGKOLAUNGKON, S.; SURESH, M.R.. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. **Prot Expres Purif**, 66(1):66-72, 2009.

DUSSART, P.; LABEAU, B.; LAGATHU, G.; LOUIS, P.; NUNES, M.R.T.; RODRIGUES, S.G.; STORCK-HERRMANN, C.; CESAIRE, R.; MORVAN,J.; FLAMAND, M.; BARIL, L.. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. **Clin Vacc Immunol**,1185–1189, 2006.

EDELMAN R. Dengue and dengue vaccines. **J Infect Dis**, 191:650–653, 2005

EL JALII, I.M.; BAHAMAN, A.R.. A review of human leptospirosis in Malaysia. **Trop Biomed**, 21(2):113-9, 2004.

ELKHOURY, M. R.. Aspectos epidemiológicos da infecção e patogenicidade por hantavirus no Brasil. **Boletim Epidemiológico Eletrônico**. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. 5(3): 1-5, 2005. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/svs>>, acessado em 10/042011.

ELLIS, T.; IMRIE, A.; KATZ, A.R.; EFFLER, P.V.. Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001-2002. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 8 (4), 541-547, 2008

FALCONAR, A.K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol** 142:897–916, 1997.

FARR, R.W.. Leptospirosis. **Clin Infect Dis**, 21: 1–6, 1995.

FERNANDEZ, R.; VAZQUEZ, S.. Serological diagnosis of dengue by an ELISA Inhibition Method (EIM). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 85:347—51, 1990.

FERREIRA, M.S.. Hantavíroses. **Rev Soc Bras Med Trop**, 36 (1): 81-96, 2003.

FIGUEIREDO, L.T.M. Os Arbovirus do Brasil. Anais da Segunda Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeis, Sessão III- Virologia, São Paulo, 16 de agosto de 1994, p. 45-58, 1994.

FIGUEIREDO, R.; NAVECA, F.; BASTOS, M.; MELO, M.; VIANA, S.; MOURÃO, M.; COSTA, C.; FARIAS, I. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 14:667-669, 2008.

FIGUEIREDO, L.T.M.; MORELI, M.L.; BORGES, A.A.; FIGUEIREDO, G.G.; BADRA, S.J. BISORDI, I.; SUZUKI, A.; CAPRIA, S.; PADULA, P.. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Araraquara Virus Recombinant Nucleocapsid Protein. **Am J Trop Med Hyg**, 81(2), p. 273–276, 2009.

FIGUEIREDO, G.G.; BORGES, A.A.; CAMPOS, G.M.; MACHADO, A.M.; SAGGIORO, F.P.; SABINO-JÚNIOR, G.S.; BADRA, S.J.; ORTIZ, A.A.A; FIGUEIREDO, L.T.M.. Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 43(4):348-354, jul-ago, 2010.

FIOCRUZ. Agência Nacional de Notícias. **Fiocruz e Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro lançam ação de controle do *Aedes aegypti* neste sábado**. Publicado em 25/03/2011.

Disponível em:

[http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from\\_info\\_index=31&infoid=3878&sid=9](http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from_info_index=31&infoid=3878&sid=9). Acesso em 10/05/2011.

FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J.; REY, F.A.; DEUBEL, V.. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **J Virol**, 73: 6104-6110, 1999.

FLANNERY, B.; PEREIRA, M.M.; VELLOSO, L.F.; CARVALHO, C.C.; CODES, L.G.; ORRICO, G.S.; DOURADO, C.M.; RILEY, L.W.; REIS, M.G.; KO, A.I.. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. **Am J Trop Med Hyg**, 65(5):657-63, 2001.

FONSECA, C.A.; TEIXEIRA, M.M.G.; ROMERO, E.C.; TENGAN, F.M.; SILVA, M.V.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **J Infect**, 52, 15–22, 2006.

FONSECA, B.; FIGUEIREDO, L.. Dengue. In **Tratado de Infectologia** 4th edition. Edited by: Focaccia R. São Paulo: Atheneu,397-410, 2008.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **BMJ**, 324, 1563-1565, 2002.

GRAZIANO, K.L.; TEMPEST, B.. Hantavirus pulmonary syndrome: a zebra worth knowing. **Am Fam Phys**, 6:1015-1020, 2002

GUBLER, D. J.. Serologic diagnosis of dengue/dengue haemorrhagic fever. **Dengue Bull**, 20:20–23, 1996.

GUBLER, D. J.. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clin Microbiol Rev**, 11 (3): 480–496, 1998.

GUBLER, D.J.; MELTZER, M.. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Adv Virus Res**, 53:35-70, 1999.

GUBLER, D.J.. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol**, 10(2): 100-103, 2002.

GUZMÁN, M.G; KOURI, G.. Advances in dengue diagnosis. **Clin Diag Immun**, 3: 621–27, 1996.

\_\_\_\_\_. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis**, 2, 33-42, 2002.

\_\_\_\_\_. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J Clin Virol**, 27, 1-13, 2003.

\_\_\_\_\_. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis**, 8: 69–80, 2004.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, 239, 476-481, 1988.

\_\_\_\_\_. Dengue. **Lancet**, 370:1644–52, 2007.

HANG, V.T.; NGUYET, N.M.; TRUNG, D.T.; TRICOU, V.; YOKSAN, S.; DUNG, N.M.; VAN-NGOC, T.; HIEN, T.T.; FARRAR, J.; WILLS, B.. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **PLoS Negl Trop Dis**, 3:e360, 2009.

HEATH, C.W.; ALEXANDER, A.D.; GALTON, M.M.. Leptospirosis in the United States: analysis of 483 cases in man, 1949–1961. **N Engl J Med**, 273: 1–15, 1965.

HENCHAL, E. A. & PUTNAK, R.. The dengue viruses. **Clin Microbiol Rev**, 3, 376-396, 1990.

HINRICHSEN, S.M.L.; ANDRADE, A.M.; CLEMENT, J.; LEIRS, H.; MCKENNA, P.; MATTHYS, P.; NEILD, G.. Evidence of hantaviral infection in Brazilian patients from Recife with suspected leptospirosis. **Lancet**, 341:50, 1993.

HU, D; DI, B.; DING, X.; WANG, Y.; CHEN, Y.; PAN, Y.; WEN, K.; WANG, M.; CHE, X.. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. **Virology**, 8:47, 2011.

HUANG, K.J; YANG, Y.C.; LIN, Y.S.; HUANG, J.H.; LIU, H.S.; YEH, T.M.; CHEN, S.H.; LIU, C.C.; LEI, H.Y.. The Dual-Specific Binding of Dengue Virus and Target Cells for the Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **J Immunol**, 176, 2825-2832, 2006.

HUNG, S.L.; LEE, P.L.; CHEN, H.W.; CHEN, L.K.; KAO, C.L.; KING, C.C. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. **Virology**, 257(1), 156-167, 1999.

INNIS, B.L.; NISALAK, A.; NIMMANNITYA, S.; KUSALERDCHARIYA, S.; CHONGSWASDI, V.; SUNTAYAKORN, S.; PUTTISRI, P.; HOKE, C.H.. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **Am J Trop Med Hyg**, 40(4):418-27, 1989.



ISMAIL, T.F.; WASFY, M.; PIMENTEL, G.; ABDEL-FADEEL, M.; ABDEL-MAKSOU, M.; HATEM, M.E.; ABDEL-RAHMAN, B.; HAJJEH, R.. Human leptospirosis among acute febrile illness and hepatitis patients in Egypt. **Am J Trop Med Hyg**, 73: 74, 2005.

JENISON, S.; HJELLE, B.; SIMPSON, S.; HALLIN, G.; FEDDERSEN, R.; KOSTER, F.. Hantavirus pulmonary syndrome: clinical, diagnostic and virologic aspects. **Semin Resp Infect**, 10:259-269, 1995.

JOHNSON, A.M.; SOUZA, L.T.M.; FERREIRA, I.B.; PEREIRA, L.E.; KSIAZEK, T.G.; ROLLIN, P.E.; PETERS, C.J.; NICHOL, S.T.. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **J Med Virol**, 59: 527-535, 1999.

JONSSON, C.B.; FIGUEIREDO, L.T.M.; VAPALAHTI, O.. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. **Clin Microb Rev**, 23, 412–441, 2010.

JOSHI, V.; MOURYA, D.; SHARMA, R.. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Am J Trop Med Hyg**, 67:158-161, 2002.

KALAYANAROOJ, S.; VAUGHN, D.W.; NIMMANNITYA, S.; GREEN, S.; SUNTAYAKORN, S.; KUNENTRASAI, N.; VIRAMITRACHAI, W.; RATANACHUEKE, S.; KIATPOLPOJ, S.; INNIS, B.L.; ROTHMAN, A.L.; NISALAK, A.; ENNIS, F.A.. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. **J Infect Dis**, 176(2):313-21, 1997.

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 Microbiol Immunol Infect**, 38:5-16, 2005.

KARANDE, S.; GANDHI, D.; KULKARNI, M.; BHARADWAJ, R.; POL, S.; THAKARE, J.; DE A.J. Concurrent outbreak of leptospirosis and dengue in Mumbai, India, 2002. **Trop Pediatr**, 51(3):174-81, 2005.

KATZ, A.R.; ANSDELL, V.E.; EFFLER, P.V.; MIDDLETON, C.R.; SASAKI, D.M.. Assessment of the clinical presentations and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974–1988. **Clin Infect Dis**, 33(11):1834-1841, 2001.

KHAN, A.S.; KHABBAZ, R.F.; ARMSTRONG, L.R.; HOLMAN, R.C.; BAUER, S.P.; GRABER, J.; STRINE, T.; MILLER, G.; REEF, S.; TAPPERO, J.; ROLLIN, P.E.; NICHOL,

S.T.; ZAKI, S.R.; BRYAN, R.T.; CHAPMAN, L.E.; PETERS, C.J.; KSIAZEK, T.G. Hantavirus pulmonary syndrome: the first 100 us cases. **J Infect Dis**, 173:1297-1303, 1996.

KUNO, G.; GOMEZ, I.; GUBLER, D.J. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. **J Virol Methods**, 33, 101–113, 1991.

KO, A.; REIS, M.G.; DOURADO, C.M.R.; JOHNSON, J.R.W.; RILEY, L.W.. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, 354: 820-825, 1999.

KÖRTING, K.S.; FLACH, J.; HONSCHA, G.; MARTINEZ, A.M.B.. Hantavirose: patologia e registro no brasil. **Vittalle**, 20(1): 39-50, 2008.

KOTHARI, V.M.; KARNAD, D.R.; BICHILE, L.S.. Tropical infections in the ICU. **J Assoc Physicians India**, 54:291-8, 2006.

KUMARASAMY, V.; CHUA, S.K.; HASSAN, Z.; WAHAB, A.H.A.; CHEM, Y.K.; MOHAMAD, M.; CHUA, K.B.. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. **Singapore Med J**, 48 (7), 669, 2007.

KUNO, G.; GUBLER, D.J.; VELEZ, M.; OLIVER, A.. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines of dengue viruses. **Bull World Health Organ**, 63: 279–86, 1985.

LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V.. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, 30(3): 545-551, 1992.

LAPPHRA, K.; SANGCHARASWICHAI, A.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; TIENGRIM, S.; PIRIYAKARNSAKUL, W.; CHAKORN, T.; YOKSAN, S.; WATTANAMONGKOLSIL, L.; THAMLIKITKUL, V.. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 60:387–391, 2008.

LAROCQUE, R.C.; BREIMAN, R.F.; ARI, M.D.; MOREY, R.E.; JANAN, F.A.; HAYES, J.M.; HOSSAIN, M.A.; BROOKS, W.A.; LEVETT, P.N.. Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. **Emerg Infect Dis**, 11: 766–769, 2005.

LEDNICKY, J.A.; Hantaviruses: a short review. **Arch Pathol Lab Med**, 127, 30-35, 2003.

LEELARASAMEE, A.; CHUPAPRAWAN, C.; CHENCHITTIKUL, M.; UDOMPANTHURAT, S.. Etiologies of acute undifferentiated febrile illness in Thailand. **J Med Assoc Thai**, 87(5):464-72, 2004.

LEVETT, P.N.; BRANCH, S.L.; EDWARDS, C.N.. Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados. **Am J Trop Med Hyg**, 62(1):112-4, 2000.

LEVETT, P.N.. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, 14 (2):296–326, 2001.

LEVETT, P.N.; BRANCH, S.L.; WHITTINGTON, C.U.; EDWARDS, C.N.; PAXTON, H.. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, 8:349–351, 2001.

LEVETT, P.N.; BRANCH, S.L.. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. **Am J Trop Med Hyg**, 66(6):745-8, 2002.

LIBRATY, D.H.; YOUNG, P.R.; PICKERING, D.; ENDY, T.P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L.. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, 186(8):1165-8, 2002.

LIBRATY, D.H.; MYINT, K.S.; MURRAY, C.K.; GIBBONS, R.V.; MAMMEN, M.P.; ENDY, T.P.; LI, W.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; KALAYANAROOJ, S.; HOSPENTHAL, D.R.; GREEN, S.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A.. A comparative study of leptospirosis and dengue in Thai children. **PLoS Negl Trop Dis**, 26;1(3):e111, 2007.

LINDOSO, J.A.L.; LINDOSO, A.A.B.P.. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, 51(5):247-253, 2009.

MACHADO, J.P.; OLIVEIRA, R.M.; SOUZA-SANTOS, R. Análise espacial da ocorrência de dengue e condições de vida na cidade de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Pública**, 25 (5), 1025-1034, 2009.

MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; YOUNG, P.R.. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, 220:232-40, 1996.

MAGALHÃES, G.B.; ZANELLA, M.E.; SALES, M.C.L.. A ocorrência de chuvas e a incidência de leptospirose em Fortaleza-CE. **Hygeia**, 5(9):77 – 87, 2009.

MARTINS,V.E.P.; ALENCAR, C.H.M.; FACÓ, P.E.G.; DUTRA, R.F.; ALVES, C.R.; PONTES, R.J.S.; GUEDES, M.I.F.. Distribuição espacial e características dos criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. **Rev Soc Bras Med Trop**, 43 (1), 73-77, 2010.

MARTINS, V.E.P.; MARTINS, M.G.; ARAÚJO, J.M.P; SILVA, L.O.R.; MONTEIRO, H.A.O.; CASTRO, F.C.; VASCONCELOS, P.F.C.; GUEDES, M.I.F.. Primeiro registro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Estado do Ceará, Brasil. **Rev Saúde Pública**, 40(4):737-9, 2006.

MCBRIDE,W.J.H; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microb Infection**, 2, 1041–1050, 2000.

MCBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I.. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, 18:376–386, 2005.

MCBRIDE, W.J.. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 64:31–36, 2009.

MENAKA, D.; HAPUGODA; BATRA, G.; ABEYEWICKREME, W.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N.. Single Antigen Detects both Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Elicited by All Four Dengue Virus Serotypes. **Clin Vac Immunol**, 1505–1514, 2007.

MENDES, W.S.; SILVA, A.A.M.; NEIVA, R.F.; COSTA, N.M.; ASSIS, M.S.; VIDIGAL, P.M.O.; LEITE, M.G.L.; ROSA, E.S.T.; MEDEIROS, D.B.; SIMITH, D.B.; VASCONCELOS, P.F.C.. Serologic Survey of Hantavirus Infection, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, 16:890-891, 2010.

MIAGOSTOVICH, M.P.; NOGUEIRA, R.M.R.; SANTOS, F.B.; SCHATZMAYR, H.G.; ARAUJO, E.S.M.; VORNDAM, V.. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **J Clin Virol**, 14: 183–189, 1999.

MOHAMMED, H.; LINNEN, J.M; MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; TOMASHEK, K.; FOSTER, G.; BROULIK, A.S.; PETERSEN, L.; STRAMER, S.L.. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. **Transfusion**, 48, 1348-1354, 2008.

MOHAREB, E.W.; VYNOGRAD, N.; FAYEZ, C.; EARHART, K.. Leptospirosis in West Ukraine. **Am J Trop Med Hyg**, 73: 53–54, 2005.

MONATH, T.P.; HEINZ, F.X.. Flaviviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEYD, P.M.... **Field Virology**. 3<sup>rd</sup>.ed. Philadelphia: Raven, v.1, p.961-1034, 1996.

MOORE, C.G.; MITCHELL, C.J.. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. **Emerg Infect Dis**, 3:329-34, 1997.

MORAES, G.H.; DUARTE, E.C.. Análise da concordância dos dados de mortalidade por dengue em dois sistemas nacionais de informação em saúde, Brasil, 2000-2005. **Cad Saúde Pública**, 25(11): 2354-2364, 2009.

MORELI, M.L.; SOUSA, R.L.; FIGUEIREDO, L.T.M. Detection of brazilian hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of n gene in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99:633-638, 2004.

MOTA, J.; ACOSTA, M.; ARGOTTE, R.; FIGUEROA, R.; MENDEZ, A.; RAMOS, C. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. **Vaccine**, 23(26), 3469-76, 2005.

MURDOCH, D.R.; WOODS, C.W.; ZIMMERMAN, M.D.; DULL, P.M.; BELBASE, R.H.; KEENAN, A.J.; SCOTT, R.M.; BASNYAT, B.; ARCHIBALD, L.K.; RELLER, L.B.. The etiology of febrile illness in adults presenting to Patan hospital in Kathmandu, Nepal. **Am J Trop Med Hyg**, 70(6):670-5, 2004.

NAJIOULLAH, F.; COMBET, E.; PATUREL, L.; MARTIAL, J.; KOULMANN, L.; THOMAS, L.; HATCHUEL, Y.; CABIÉ, A.; CESAIRE, R.. Prospective evaluation of nonstructural 1 enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic tests to detect dengue virus in patients with acute febrile illness. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 69, 172–178, 2011.

NAWA, M.; TAKASAKI, T.; YAMADA, K.I.; AKATSUKA, T.; KURANE, I. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. **J Virol Methods**, 92: 65–72, 2001.

NICHOL, S.T.; SPIROPOULOU, C.F.; MORZUNOV, S.; ROLLIN, P.E.; KSIAZEK, T.G.; FELDMANN, H.. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. **Science**, 262:914-917, 1993.

NUNES, M.R.; NUNES NETO, J.P.; CASSEB, S.M.; NUNES, K.N.; MARTINS, L.C.; RODRIGUES, S.G.; MATHEUS, S.; DUSSART, P.; CASSEB, L.M.; VASCONCELOS, P.F. Evaluation of an immunoglobulin M-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for rapid diagnosis of dengue infection. **J Virol Methods**, 171(1):13-20, 2011

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS)/OMS. Dengue: Guías de atención para enfermos en la región de las Américas. La Paz, 54p., 2010.

PANCHAREON, C.; THISYAKORN, U.. Neurological manifestations in dengue patients. **Southeast Asian J Trop Public Health**, 32:341-5, 2001.

PETERS, C.J.. HPS in the Americas. In: Scheld, W.M.; CRAIG, W.A.; HUGHES, J.M.. Emerging infections. **ASM Press**, 17-64, 1998.

PETERS, C.J; KHAN, A.S. Hantavirus pulmonary syndrome: the new American hemorrhagic fever. **Clin Infect Dis**, 34(9): 1224-1231, 2002.

PINCELLI, M.P.; BARBAS, C.S.V.; CARVALHO, C.R.R.; OLIVEIRA-JR, A.D.; SOUZA, L.T.M.; FIGUEIREDO, L.T.M.. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus. **J Pneumol**, 29(5):309-24, 2003.

PLANK, R.; DEAN, D..Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes Infect**, 2(10):1265-76, 2000.

PLYUSNIN, A.; VAPALAHTI, O.; VAHERI, A.. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. **J Gen Virol**, 77:2677-2687, 1996.

POERSCH, C. O.; PAVONI, D.P.; QUEIROZ, M.H.;BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; SANTOS, N.D.; KRIEGER, M.A.. Dengue Virus Infections : comparison of methods for diagnosing the acute disease. **J Clin Virol**, 32, 272-277, 2005.

PUTTIKHUNT, C.; PROMMOOL, T.; U-THAINUAL, N.; ONG-AJCHAOWLERD, P.; YOOSOOK, K.; TAWILERT, C.; DUANGCHINDA, T.; JAIRANGSRI, A.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; MALASIT, P.; KASINRERK, W.. The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus. **J Clin Virol**, 50, 314-319, 2011.

QIU, L.W.; DI, B.; WEN, K.; WANG, X.S.; LIANG, W.H.; WANG, Y.D.; PAN, Y.X.; WANG, M.; DING, Y.Q.; CHE, X.Y.. Development of an antigen capture immunoassay based on monoclonal antibodies specific for dengue virus serotype 2 nonstructural protein 1

for early and rapid identification of dengue virus serotype 2 infections. **Clin Vaccine Immunol**, 16:88-95, 2009.

RACE, M.W.; WILLIAMS, M.C.; AGOSTINI, C.F.M.. Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; 73: 18–22, 1979.

RAMOS, E.F. Sobre a transmissão transfusional da febre Dengue. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 30(5):417-422, 2008.

REITSTETTER, R.E.. Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. **FEMS Microbiol Lett**, 264: 31–39, 2006.

RIGAU-PÉREZ, J.G.; CLARK, G.G.; GUBLER, D.J.; REITER, P.; SANDERS, E.J.; VORNDAM, A.V.. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, 352, 971-977, 1998.

RIBEIRO, M.A.; SOUZA, C.C.; ALMEIDA, S.H.P.. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. **J Trop Med Hyg**, 98:452–456, 1995.

RIQUE, J.; SILVA, M.D.P.. Estudo da subnotificação dos casos de Aids em Alagoas (Brasil), 1999-2005. **Ciênc Saúde Coletiva**, 16 (2), 599-603, 2011.

SAGGIORO, F.P.; ROSSI, M.A.; DUARTE, M.I.; MARTIN, C.C.; ALVES, V.A.; MORELI, M.L.; FIGUEIREDO, L.T.M.; MOREIRA, J.E.; BORGES, A.A.; NEDER, L.. Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in hantavirus pulmonary syndrome. **J Infect Dis**, 195:1541-1549, 2007.

SALVADOR. SMS/CIEVS. **Introdução do Sorotipo DENV4 em Salvador/Ba**. Nota técnica nº 01/2011. Publicado em março de 2011. Disponível em: [http://www.saude.salvador.ba.gov.br/arquivos/cosam/viep/VIEP/Nota%20Tecnica\\_Dengue2011.pdf](http://www.saude.salvador.ba.gov.br/arquivos/cosam/viep/VIEP/Nota%20Tecnica_Dengue2011.pdf). Acesso em 10/05/2011.

SANDERS, E.J.; RIGAU-PÉREZ, J.G.; SMITS, H.L.; DESEDA, C.C.; VORNDAM, V.A.; AYE, T.; SPIEGEL, R.A.; WEYANT, R.S.; BRAGG, S.L.. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico. **Am J Trop Med Hyg**, 61: 399-404, 1999.

SAN-MARTÍN, J.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLÓRZANO, J.; BOUCKENOOGHE, A.; DAYAN, G.; GUZMÁN, M.. The epidemiology of dengue in the

americas over the last three decades: a worrisome reality. **Am J Trop Med Hyg**, 82:128-135, 2010.

SANTOS, R.L.C.. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). **Rev Saúde Pública**, 37:671-3, 2003.

SARIOL, C.; PELEGRINO, J.L.; MARTINEZ, A.; ARTEAGA, E.; KOURI, G.; GUZMAN, M.G.. Detection and genetic relationship in seventeen-year old paraffin embedded samples of Cuba. **Am J Trop Med Hyg**, 60:994—1000, 1999.

SATHISH, N.; VIJAYAKUMAR, T.S.; ABRAHAM, P.; SRIDHARAN, G.. Dengue fever: its laboratory diagnosis, with special emphasis on IgM detection. **Dengue Bull**, 27, 2003.

SCHILLING, S.; LUDOLFS, D.; VAN, A.N. L.; SCHMITZ, H.. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. **J Clin Virol**, 31:179–184, 2004.

SCHLESINGER JJ, BRANDRISS MW, PUTNAK JR, WALSH EE. Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. **J Gen Virol**, 71:593-9, 1990..

SCHMALJOHN, C.; HJELLE, B.. A global disease problem. **Emerg Infect Dis**, 3, p.95-104, 1997.

SHU, P.Y.; HUANG, J.H.. Current advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, 11:642–650, 2004.

SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.E.; CAMARGO, D.; BATISTA, L.; VAZ, A.J.; ROMERO, E.C.; BRANDÃO, A.P... Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies. **Am J Trop Med Hyg**, 56:650–655, 1997.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A.. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **J Pediatr (Rio J)**, 83(2 Suppl):S22-35, 2007.

SKABA, D.A.; CARVALHO, M.S.; BARCELLOS, C.; MARTINS, P.C.; TERRON, S.L.. Geoprocessing of health data: treatment of information on addresses. **Cad Saude Publica**, 20(6):1753-6, 2004.

SLACK, A. Leptospirosis. **Aust Fam Phys**, 39:7, 495-498, 2010.



SMITS, H.L.; VAN DER HOORN, M.A.; GORIS, M.G.; GUSSENHOVEN, G.C.; YERSIN, C.; SASAKI, D.M.; TERPSTRA, W.J.; HARTSKEERL, R.A.. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **J Clin Microbiol**, 38(3):1272-5, 2000.

SMITS, H.L.; EAPEN, C.K.; SUGATHAN, S.; KURIAKOSE, M.; GASEM, M.H.; YERSIN, C.; SASAKI, D.; PUJIANTO, B.; VESTERING, M.; ABDOEL, T.H.; GUSSENHOVEN, G.C.. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, 8(1):166-9, 2001.

SUHARTI, C.; VAN GORP, E.C.; DOLMANS, W.M.; GROEN, J.; HADISAPUTRO, S.; DJOKOMOELJANTO, R.J.; D M E, O.A; VAN DER MEER, J.W.. Hantavirus infection during dengue virus infection outbreak in Indonesia. **Acta Med Indones**, 41:75–80, 2009.

SUTTINONT, C; LOSUWANALUK, K; NIWATAYAKUL, K.; HOONTRAKUL, S.; INTARANONGPAI, W.; SILPASAKORN, S.; SUWANCHAROEN, D.; PANLAR, P.; SAISONKORH, W.; ROLAIN, J.M.; RAOULT, D.; SUPUTTAMONGKOL, Y.. Causes of acute, undifferentiated, febrile illness in rural Thailand: results of a prospective observational study. **Ann Trop Med Parasitol**, 100 (4), 363–370, 2006.

SUPUTTAMONGKOL, Y.; PONGTAVORNPINYO, W.; LUBELL, Y.; SUTTINONT, C.; HOONTRAKUL, S.; PHIMDA, K.; LOSUWANALUK, K.; SUWANCHAROEN, D.; SILPASAKORN, S.; CHIERAKUL, W.; DAY, N.. Strategies for Diagnosis and Treatment of Suspected Leptospirosis: A Cost-Benefit Analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, 4(2): e610. doi:10.1371/journal.pntd.0000610, 2010.

TAKAFUJI, E.T.; KIRKPATRICK, J.W.; MILLER, R.N.; KARWACKI, J.J.; KELLEY, P.W.; GRAY, M.R.; MCNEILL, K.M.; TIMBOE, H.L.; KANE, R.E.; SANCHEZ, J.L.. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. **N Engl J Med**, 310: 497–500, 1984.

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

TELES, F.S.R.R.. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review. **Anal Chim Acta**, 687, 28–42, 2011.

TERAJIMA, M.; HENDERSHOT, J.D. 3RD; KARIWA, H.; KOSTER, F.T.; HJELLE, B.; GOADE, D.; DEFRONZO, M.C.; ENNIS, F.A.. High levels of viremia in patients with the hantavirus pulmonary syndrome. **J Infect Dis**, 180:2030-2034, 1999.

TEMPORAO, J.G.; PENNA, G.O.; CARMO, E.H.; COELHO, G.E.; AZEVEDO R.S.S.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C.. Dengue virus serotype 4, roraima state, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 17(5):938-40, 2011.

TOLEDO, A.L.; ESCOSTEGUY, C.C.; MEDRONHO, R.A.; ANDRADE, F.C.. Reliability of the final dengue diagnosis in the epidemic occurring in Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2002. **Cad Saude Publica**, 22(5):933-40, 2006.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; RODRIGUES, S.G. Dengue, 1997. In: CRUZ, A.C.R.; VASCONCELOS, P.F.C.. Arbovírus no Brasil. **Biológico**, 70, 45-46, 2008; 1997.

TRICOU, V.; MINH, N.N.; VAN, T.P.; LEE, S.J.; FARRAR, J.; WILLS, B.; TRAN, H.T.; SIMMONS, C.P.. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. **PLoS Negl Trop Dis**, 10;4(8):e785, 2010.

TURNER, L. H.. Leptospirosis II. Serology. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 62:880–889, 1968.

VAUGN, D.W.; NISALAK, A.; SOLOMON, T.; KALAYANAROOJ, S; DUNG, M.N.; KNEEN, R.. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. **Am J Trop Med Hyg**, 60:693—8, 1999.

VELATHANTHIRIA, G.N.S.; FERNANDO, S.; FERNANDO, R.; MALAVIGEA, G.N.; PEELAWATHHAGEA, M.; JAYARATNEE, S.D.; AASKOVF, J.. Comparison of Serology, Virus Isolation and RT-PCR in the Diagnosis of Dengue Viral Infections in Sri Lanka. **Dengue Bull**, 30; 2006.

VITALE, G.; LA RUSSA, C.; GALIOTO, A.; CHIFARI, N.; MOCCIARO, C.; CARUSO, R.; MICALIZZI, A.; MANSUETO, P.; DI ROSA, S.; MANSUETO, S.. Evaluation of an IgM-ELISA test for the diagnosis of human leptospirosis. **New Microbiol**, 27(2):149-54, 2004.

VORNDAM, A.V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infection. In: GUBLER D.J.; KUNO, G.. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **New York: CAB International**, 1997.

WENG, C.H.; HUANG , T.B. HUANG, C.C.; YEH, C.S.; LEI, H.Y.; LEE, G.B.. A suction-type microfluidic immunosensing chip for rapid detection of the dengue vírus. **Biomed Microdevices**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO, 1997.

WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. Handbook of the World Health Organization. Geneva,: 1-84, 2000.

\_\_\_\_\_. Dengue. Guidelines for treatment, prevention and control- New edition. Geneva: WHO, 2009.

\_\_\_\_\_. Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control, 2003. Disponível em <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.23.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf)> Acessado em: 07/08/2009.

\_\_\_\_\_. Leptospirosis. Disponível em [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/leptospirosis/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/leptospirosis/en/). Acessado em 12/11/2010.

\_\_\_\_\_. Leptospirosis. Disponível em <http://www.who.int/topics/leptospirosis/en/>, acessado em 23/12/2010.

\_\_\_\_\_. Dengue. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/dengue/disease.htm>. Acessado em 10/07/2010.

\_\_\_\_\_. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>>. Acessado em 07/03/2011.

WONGSRICHANALAI, C.; MURRAY, C.K., GRAY, M.; MILLER, R.S.; MCDANIEL, P.; LIAO, W.J.; PICKARD, A.L.; MAGILL, A.J.. Co-infection with malaria and leptospirosis. **Am J Trop Med Hyg**, 68(5):583-5, 2003.

WUTHIEKANUN, V; SIRISUKKARN, N.; DAENG SUPA, P.; SAKARASERANE, P.; SANGKAKAM, A.; CHIERAKUL, W.; SMYTHE, L.D.; SYMONDS, M.L.; DOHNT, M.F.; SLACK, A.T.; DAY, N.P.; PEACOCK, S.J.. Clinical diagnosis and geographic distribution of leptospirosis, Thailand. **Emerg Infect Dis**, 13(1):124-6, 2007.

XU, H.; DI, B.; PAN, Y.X.; QIU, L.W.; WANG, Y.D.; HAO, W.; HE, L.J.; YUEN, K.Y.; CHE, X.Y. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J Clin Microbiol**, 44:2872–2878, 2006.

YAMADA, K.; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; KURANE, I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **J Clin Virol**, 24(3):203-209, 2002.

YOUNG, J.C.; HANSEN, G.R.; GRAVES, T.K.; DEASY, M.P.; HUMPHREYS, J.G.; FRITZ, C.L.; GORHAM, K.L.; KHAN, A.S.; KSIAZEK, T.G.; METZGER, K.B.; PETERS, C.J.. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. **Am J Trop Med Hyg**, 62:714-717, 2000.

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**, 38:1053–1057, 2000.

ZAINAH, S.; WAHAB, A.H.; MARIAM, M.; FAUZIAH, M.K.; KHAIRUL, A.H.; ROSLINA, I.; SAIRULAKHMA, A.; KADIMON, S.S.; JAIS, M.S.; CHUA, K.B. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. **J Virol Methods**, 155:157–160, 2009.

ZHAO, X.; HAY, J.. The evolution of Hantaviruses. **Immunological Investigations**, 26 : 191-197, 1997.

## 9. ANEXO I

Artigo aceito em 05/05/2011 para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

HANTAVIRUS INFECTION IN SUSPECTED DENGUE CASES FROM CEARÁ STATE, BRAZIL.

Danielle Malta Lima, PhD <sup>1,2</sup>, Gilberto Sabino-Santos Jr, Msc <sup>3</sup>, **Augusto César Aragão Oliveira** <sup>2</sup>, Raissa Matos Fontes, Jeová Keny Baima Colares, MD, PhD <sup>1</sup>, Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo, Msc <sup>4</sup>, Luciano Pamplona de Goes Cavalcanti, PhD <sup>5,6</sup>, Benedito Antônio Lopes da Fonseca, MD, PhD <sup>3</sup>, Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, MD, PhD <sup>3</sup>, Margarida Maria de Lima Pompeu, MD, PhD <sup>2</sup>.

1 University of Fortaleza, School of Medicine - UNIFOR, Brazil.

2 Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará-UFC, CE, Brazil.

3 Virology Research Center, School of Medicine of the University of Sao Paulo in Ribeirão Preto City, Brazil.

4 Laboratory of Public Health of the State of Ceará, Brazil.

5 Secretariat of Health of the State of Ceará, Brazil.

6 Department of Public Health, Federal University of Ceará-UFC, CE, Brazil.

Corresponding author: Danielle Malta Lima, PhD

Corresponding author: +55-85-99210084

E-mail: danimalta@uol.com.br (Danielle Malta Lima)

**To the Editor:** Human hantavirus infection generally occurs through inhalation of aerosols containing the virus from feces, urine or saliva from infected rodents <sup>1</sup>. The spectrum of clinical symptoms caused by hantaviruses in humans varies from sub-clinical presentations to severe hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Eurasia, and hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) in the American continent <sup>1</sup>. HCPS is an emerging public health problem in Brazil because of the overlap of urban, agricultural, and cattle-raising areas with ecosystems containing several species of *Sigmodontinae* rodents, which are reservoirs of hantaviruses <sup>2</sup>. From 1993 through October 2010, 1335 cases were reported in Brazil with a case-fatality rate of 39%: 487 in the Southern region of Brazil, 399 in the Southeast, 336 in the Midwest, 82 in the North and 14 in the Northeast. In the latter region, hantavirus infections have been reported in the States of Maranhão, Rio Grande do Norte and Bahia but have not been reported in the northeastern State of Ceará <sup>3</sup>. Five lineages of hantavirus have been associated with most documented HCPS cases in Brazil: the Jucituba virus, the Araraquara virus, the Laguna Negra-like virus, the Castelo dos Sonhos virus, and the Anajatuba virus. HCPS cases, especially some reported in northeastern Brazil, have probably been caused by other unknown hantaviruses <sup>2</sup>.

Despite efforts to control *Aedes aegypti*, a hyper-endemic situation remains, with large outbreaks by three of the four dengue serotypes. Due to these large outbreaks occurred in the Northeast of Brazil, since 1986 the State of Ceará, has begun reporting dengue transmission, with three major outbreaks occurring in 1994, 2001 and 2008 <sup>4</sup>.

Dengue cases in Ceará State have shown a clearly seasonal incidence in the first semester of each year <sup>5</sup>. The same has not been seen for hantavirus infection in the region because there is no study showing it yet. However, in Uberlândia (Mina Gerais State, Brazil) Limongi et al (2007) described seasonality for hantavirus infection in the autumn and winter <sup>6</sup>. This seasonality overlaps with dengue circulation.

During the 2008 dengue outbreak in Ceará State, serum samples from 82 patients presenting with a clinical history of acute fever consistent with dengue were clinically and serologically studied. Serum specimens were assessed for dengue virus antibodies by using a commercial immunoglobulin IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay (PanBio ELISA, Ltd., Brisbane, Australia). Dengue virus genome detection by RT-PCR and virus isolation in clinical samples by inoculation into C6/36 cell monolayers were performed, followed by the detection of infection by indirect immunofluorescence assay using anti-dengue hyperimmune mouse ascitic fluids <sup>7</sup>.

Of the 82 patients in the study, 35 (42, 6%) had dengue infection, of whom 35 (42, 6%) were positive for IgM-ELISA, 4 (4.8%) by RT-PCR, 2 being positive for DENV-2 and 2 for DENV-3. Serological tests for hantavirus were performed in only 72 patients of the 82 because of insufficient sample volume. Among the 10 patients who were not tested for hantavirus, 9 were diagnosed with dengue fever and 1 patient was negative for dengue in all laboratory tests.

In this study a protocol of IgM-ELISA and IgG-ELISA were performed as previously described by Figueiredo et al (2009), using the recombinant N protein of Araraquara hantavirus as antigen (ARAV rN) produced in *E. coli* <sup>8</sup>. Figueiredo et al (2009) ELISA has a high sensitivity (97.2%), specificity (100%), positive predictive value (100%), and negative predictive value (98.1%). Thus, this procedure is suitable for purposes using as hantavirus diagnostic.

The 72 studied patients were initially screened for hantavirus infection at 1:100 dilution, and all positive results were confirmed in a serial dilution (starting at 1:400) test. One (1.4%) had IgM antibodies to hantavirus and two (2.8%) other patients had IgG antibodies to hantavirus. The positives sera have shown antibodies titers of 1:100 and 1:400. This data corroborates with a study conducted by Campos et al (2003), in which demonstrate

similar results related to ours. Campos et al (2003) found maximum antibodies titers of 1:400<sup>9</sup>. Seropositive samples were also tested by a RT-PCR that amplifies part of the small and the medium segment of hantavirus RNA, as previously reported, showing negative results<sup>10</sup>. Data from studied patients and test results are shown in table 1.

All 3 seropositive patients to hantavirus lived in urban areas. The laboratorial profile the platelets counting  $< 150.000/\text{mm}^3$  (66,6%) and hematocrit  $< 50\%$  (100%). One of them, a 10 years old child, had acute febrile illness probably caused by hantavirus based on presence of IgM specific antibodies in serum. This patient had headache, prostration, odynophagia and did not have hemorrhagic manifestations and decreasing on platelets counting ( $< 150,000 / \text{mm}^3$ ), see table 1. Therefore, regarding to this patient, there is no information that could be related to a pulmonary syndrome.

A hantavirus seroepidemiological study conducted in six municipalities of Maranhão State showed a seroprevalence of 4.7% in humans. This data highlights hantavirus circulation in that State. But in that occasion there were no patients with any symptomatology of hantavirus, which can suggest that moderate or asymptomatic cases of hantavirus infection may be occurring in that region. This study reinforces the suspicion that mild or atypical cases are occurring in that region and may be the reason of hantavirus infection<sup>11</sup>.

The presence of IgG antibodies to hantavirus in sera of 2 patients suggest they were previously infected by hantavirus however, not allowing to determine if the virus was the causative agent of the acute febrile illness reported in the present study. One patient (JGPJ) who had IgG antibodies to hantavirus also showed IgM antibodies to dengue. Data from studied patients and test results are shown in table 1.

It is well known that during dengue outbreaks other viral infections are commonly misdiagnosed as dengue. Therefore, cases of hantavirus infection, specially those presenting acute febrile illness, may be confused with dengue. Thus, it is possible that hantavirus



infections have been misdiagnosed and to our knowledge, this is the first evidence of a human infection by hantavirus in the State of Ceará, Brazil. Our data is corroborated by Chioratto et al., 2010, who reported that two *Necromys lasiurus*, a well-known hantavirus rodent reservoir, captured in the hills of Ibiapaba in State of Ceará had hantavirus antibodies, suggesting that the human population of these areas is at risk of contracting a severe and potentially lethal hantavirus infection <sup>12</sup>. Our study supports the suspicion that may be occurring mild or atypical cases of hantavirus infection in the region.

The hantavirus from Ceará could be the Anajatuba virus that was associated to human infections in the neighboring State of Maranhão <sup>11</sup>, and our report shows that it is important to improve epidemiologic surveillance for hantavirus in Ceará. Further studies on hantaviruses are necessary in order to understand the prevalence of human infections, the clinical presentation of the disease, the virus and its natural reservoir in Ceará State.

**Acknowledgements:** This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

## References

1. Jonsson CB, Figueiredo LTM, and Olli Vapalahti O. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: (2) 412-441. DOI: 10.1128/CMR.00062-09.
2. Figueiredo LTM, Moreli ML, Sousa RLM, Borges AA, Figueiredo GG, Machado AM, et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome, Central Plateau, Southeastern, and Southern Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 561-567. DOI: 10.3201/eid1504.080289.
3. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde: Casos e óbitos de hantavirose no Brasil de 1993 a 2009. Brasília, DF: Ministério da Saúde [2010 december 24] [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1558](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1558).

4. Cavalcanti LP, Coelho IC, Vilar DC, Holanda SG, Escóssia KN, Souza-Santos R. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43: 355–358.
5. Governo do Estado de Ceará. Coordenadoria de Promoção e Proteção à Saúde / Núcleo de Vigilância Epidemiológica/SESA/CE. Informe semanal dengue 2011. Datasus [cited 2011 april 11]. <http://www.saude.ce.gov.br/site>.
6. Limongi, J.E. et al. Síndrome cardiopulmonar por hantavírus no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 1998-2005: aspectos clínico-epidemiológicos de 23 casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(3): 295-299.
7. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(3): 545-551.
8. Figueiredo LTM, Moreli ML, Borges AA, Figueiredo GG, Badra SJ et al. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Araraquara Virus Recombinant Nucleocapsid Protein. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81(2):273-6.
9. Campos, G.M.; Sousa, R.L.M.; Badra, S.J.; Pane, C.; Gomes, U.A.; Figueiredo, L.T.M. Serological survey of hantavirus in Jardinópolis county, Brazil *J Med Virol* 2003; 71: 417-422.
10. Moreli ML, De Sousa R L M, Figueiredo LTM. Detection of Brazilian Hantavirus by RT-PCR amplification of N gene with patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *Mem Inst Osw Cruz* 2004; 99: 633-638.
11. Mendes WS, Silva AAM, Neiva RF, Costa NM, Assis MS, Vidigal PMO, Leite MGL, Rosa EST, Medeiros DB, Simith DB, Vasconcelos PFC. Serologic Survey of Hantavirus Infection, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:890-891. DOI: 10.3201/eid1605.090766.

12. Chioratto GTS, Costa E C V, Sobreira M, Almeida A M P. Soroprevalência da infecção por hantavírus em roedores do Estado do Ceará, Brasil, Revista de Patologia Tropical 2010; 39: 1-6.

## 10. ANEXO II

