



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

LAIANE FERNANDA DE MELO BEZERRA

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DENGUE E LEPTOSPIROSE EM PACIENTES
COM SÍNDROME FEBRIL AGUDA.

FORTALEZA
2012

LAIANE FERNANDA DE MELO BEZERRA

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DENGUE E LEPTOSPIROSE EM PACIENTES
COM SÍNDROME FEBRIL AGUDA.

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

Orientador (a): Prof.^a Dra. Danielle Malta Lima
Co-orientador: Prof.^o Dr. Jeová Keny Baima Colares

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- B469d Bezerra, Laiane Fernanda de Melo.
Diagnóstico laboratorial de dengue e leptospirose em pacientes com síndrome febril aguda / Laiane
Fernanda de Melo Bezerra. – 2012.
117 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento
de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profa. Dra. Danielle Malta Lima.
Coorientação: Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares.
1. Dengue. 2. Diagnóstico Diferencial. 3. Leptospirose. I. Título.

CDD 616.075

LAIANE FERNANDA DE MELO BEZERRA

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DENGUE E LEPTOSPIROSE EM PACIENTES
COM SÍNDROME FEBRIL AGUDA.

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

Aprovada em: 31/01/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Danielle Malta Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC
Universidade de Fortaleza-UNIFOR

Prof^º. Dr Roberto da Justa
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Maria Jânia Teixeira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dr^a Fernanda Montenegro de Caravilho Araújo
Laboratório Central de saúde Pública do Ceará

*A palavra “impossível” deveria não
existir no mundo daqueles que
sonham...*

Aos meus pais e ao meu marido.

AGRADECIMENTOS

Toda essa realização sem Deus não teria sido possível, através Dele pude concretizar um sonho que jamais acharia possível! Obrigada Senhor por guiar meus passos em toda essa jornada!

Em especial minha querida orientadora, que sempre esteve comigo, não somente para me orientar diante desta pesquisa, mas que através de sua paciência, carinho, companherismo e amizade mostrou a verdadeira orientação para a vida.

Ao Curso de Pós-Graduação em Patologia pela oportunidade.

À Coordenação do Mestrado em Patologia/UFC por toda ajuda prestada em meio às dificuldades durante o meu percurso.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, principalmente ao professor Francisco Vagnaldo, pela sapiência e por sempre se dispor a nos ajudar.

Ao Setor de Parasitologia da UFC por ter me recebido maravilhosamente bem. Na verdade, ele foi minha segunda casa e aqui pude fazer parte de uma verdadeira família com as outras pessoas que aqui trabalham e estudam! À professora Jânia que me acolheu diretamente desde os meus primeiros dias juntamente com à professora Margarida, professora Zirlane, professor Josias e minha querida amiga Juliana, que serviram de exemplo e referência, me ensinado a amar cada dia a pesquisa.

Ao laboratório de Biologia Molecular da Unifor que permitiu que uma parte dos meus experimentos pudessem ser realizados. À professora Luciana Bertolini e ao professor Marcelo Bertolini, aos meus queridos amigos que me ajudaram e que me receberam de braços abertos: Carol, Igor, Débora, Raquel, Conceição, Kaio, Neto, Cristiano e todos os outros que estavam sempre por perto principalmente incentivando.

Às minhas queridas amigas Raissa Matos, Dyana Alves, Nayara Oliveira, Claudênia Praciano e Luana Skeff, que estavam disponíveis abandonando os finais de semana para estarem trabalhando comigo e que apesar disto, estavam sempre de bom humor, trazendo uma harmonia e alegria para o nosso trabalho. Ao meu ilustríssimo amigo Alan Rodrigo, que além de fazer companhia, me ensinou boa parte do que eu sei hoje sobre biologia molecular.

À minha querida amiga de mestrado, Almira, que me auxiliou em toda parte clínica.

Finalmente, eu quero agradecer à toda minha maravilhosa família que nunca permitiu que eu desistisse dos meus sonhos, pelo apoio, por acreditarem que eu sou capaz e pelos conselhos. Aos meus pais por servirem de exemplo, as minhas queridas irmãs, cunhadinhos e sobrinhos por servirem sempre de suporte, impedindo que eu não desistisse dos meus sonhos. Ao meu

marido pela paciência, pelo seu amor e por todos os dias não me deixar abater pelas dificuldades.

À FUNCAP/CNPQ pelo apoio financeiro.

Enfim, quero agradecer a todas as pessoas que fizeram parte do meu cotidiano durante este período, à todas as amizades que construí e que com certeza serão para levadas comigo pelo resto da minha vida!

“Tudo que acreditamos torna-se real, basta querer e lutar”.

RESUMO

Dentre as arboviroses, a dengue apresenta-se como a mais importante, constituindo um grave problema de saúde pública a nível mundial. As regiões tropicais e subtropicais são as mais afetadas, ocorrendo aproximadamente 100 milhões de infecções por ano. Os principais sintomas que caracterizam a infecção são febre, cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, prostração e exantema. No entanto, outras infecções apresentam sintomas bastante semelhantes com a dengue, como a leptospirose. Ambas, dengue e leptospirose, podem causar surtos durante as estações chuvosas, visto que é o melhor período para a disseminação do mosquito *Aedes aegypti* e a contaminação de áreas alagadas pela bactéria *Leptospira* sp.. Dessa forma, este estudo teve como objetivo empregar diferentes métodos para o diagnóstico laboratorial de dengue e leptospirose em pacientes com síndrome febril. Oitenta e seis amostras de 86 pacientes com suspeita de dengue foram analisadas por meio do teste imunocromatográfico NS1, ELISA-NS1, teste imunocromatográfico de captura de IgM e IgG, ELISA-IgM, ELISA-IgG e RT-PCR. Dentre os 86 pacientes avaliados, 48 (55,8%) foram positivos para pelo menos um dos testes diagnósticos realizados. Após testados para dengue, 68 pacientes foram avaliados pelo teste imunocromatográfico de captura de IgM e pelo teste de ELISA-IgM, ambos para identificação de anticorpos anti-*Leptospira*. Cinco (7,35%) foram positivos para esta infecção. É de grande importância pesquisar outras causas infecciosas, como a leptospirose, que também é uma doença febril, em pacientes com suspeita clínica de dengue, pois o controle das doenças mais prevalentes só se torna possível quando conhecemos os agentes infecciosos responsáveis por elas. Portanto, faz-se necessário o uso de diagnósticos específicos para cada infecção, permitindo com que os programas de controle epidemiológicos sejam realizados.

Palavras-chave: dengue, diagnóstico diferencial e leptospirose

ABSTRACT

Among the arboviruses, dengue is the most important, constituting a serious public health problem worldwide. The tropical and subtropical regions are most affected, occurring approximately 100 million infections per year. The main symptoms that characterize the infection are fever, headache, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, prostration and rash. However, other infections have very similar symptoms to dengue, such as leptospirosis. Both dengue and leptospirosis, can cause outbreaks during the rainy seasons, since it is the best period for the dissemination of *Aedes aegypti* and contamination of wetlands by *Leptospira sp.*. This study aimed to employ different methods for the laboratory diagnosis of dengue and leptospirosis in patients with febrile syndrome. Eighty-six samples of 86 patients suspected of being infected with dengue were analyzed by NS1 immunoassay, NS1-ELISA, immunoassay IgM and IgG capture, IgM-ELISA, ELISA-IgG and RT-PCR. Among the 86 patients evaluated, 48 (55.8%) were positive for at least one of diagnostic tests. After tested for dengue, 68 patients were evaluated by immunoassay IgM capture and by ELISA-IgM, both for identification of *anti-Leptospira*. Five (7.3%) were positive for this infection. It is very important to search for other infectious causes, such as leptospirosis, which is also a febrile illness, in patients with clinical suspicion of dengue, since the control of diseases prevalent only becomes possible when we know the infectious agents responsible for them. Therefore, it is necessary to use specific diagnoses for each infection, allowing epidemiological control programs can be carried out.

Keywords: dengue, leptospirosis and differential diagnosis

LISTA DE ABREVIATURAS

DC - Dengue Clássico

DCC - Dengue com complicações

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DENV-1 - vírus dengue sorotipo 1

DENV-2 - vírus dengue sorotipo 2

DENV-3 - vírus dengue sorotipo 3

DENV- 4 - vírus dengue sorotipo 4

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)

FC- Fixação de Complemento

FHD- Febre hemorrágica da dengue

IFI- Imunofluorescência Indireta

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IH - Teste de inibição da hemaglutinação

IL- Interleucina

MAC-ELISA - *IgM capture enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA para detecção de anticorpos IgM)

MAT - Microaglutinação

NS1- Proteína não estrutural 1 do vírus dengue

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - *Polimerase chain reaction* (Reação em cadeia da Polimerase)

qPCR - PCR em tempo real

RNA- Ácido Ribonucléico

RT-PCR - *Reverse transcriptase – polimerase chain reaction* (PCR precedido de transcrição reversa)

SCD - Síndrome do Choque por Dengue

TN- Teste de Neutralização

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 Áreas de risco pela infecção do vírus dengue em 2010.....	13
FIGURA 2 Gráfico de distribuição da incidência dos casos de dengue no Estado do Ceará desde a sua primeira epidemia.....	15
FIGURA 3 Estrutura genômica do vírus dengue. Proteínas estruturais: C, M e E; Proteínas não-estruturais: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e NS5.....	16
FIGURA 4 Gráfico representativo do comportamento dos anticorpos em uma infecção primária e em uma infecção secundária por dengue e métodos de diagnósticos que podem ser usados para detectar infecção.....	23
FIGURA 5 Gráfico com o número de casos confirmados de leptospirose no Brasil por região entre 1997 e 2009.....	27
FIGURA 6 Gráfico representando o número de casos confirmados de leptospirose no Ceará de 2008 a 2010.....	29
FIGURA 7 Fotomicrografia <i>Leptospira</i> sp., demonstrando a sua forma helicoidal.....	30
FIGURA 8 Fluxograma dos diagnósticos realizados nos pacientes com síndrome febril aguda atendidos no ambulatório e pacientes hospitalizados acolhidos nos hospitais HSJ e HMNSC.....	38
FIGURA 9 Fluxograma dos pacientes incluídos e excluídos no estudo.....	45
FIGURA 10 Gráfico de distribuição mensal dos pacientes recrutados e dos pacientes positivos para dengue.....	46
FIGURA 11 Gráfico de distribuição percentual da idade dos pacientes positivos para dengue.....	47
FIGURA 12 Teste imunocromatográfico NS1 Ag STRIP.....	48

FIGURA 13 Gráfico dos pacientes de ambulatório positivos para dengue através dos testes NS1 imunocromatográfico, ELISA NS1 e RT-PCR em comparação com o tempo após o início de sintomas.....	49
FIGURA 14 Teste imunocromatográfico dengue duo-IgM e IgG.....	50
FIGURA 15 Placa do teste imunoenzimático (ELISA).....	51
FIGURA 16 Gráfico de pacientes de ambulatório positivos para dengue através da detecção do anticorpo anti-dengue IgM através do teste ELISA em comparação com o tempo após o início de sintomas.....	51
FIGURA 17 Gráfico de pacientes positivos para dengue atendidos no ambulatório e apresentando uma possível infecção primária ou infecção secundária.....	52
FIGURA 18 Gráfico dos pacientes hospitalizados positivos para dengue através da detecção da NS1 pelo teste imunocromatográfico, ELISA-NS1 e do RNA viral em comparação com o tempo após o início de sintomas.....	53
FIGURA 19 Identificação dos produtos de RT-PCR.....	53
FIGURA 20 Gráfico dos pacientes hospitalizados positivos para dengue através da detecção de IgM pelo teste imunoenzimático ELISA.....	55
FIGURA 21 Gráfico dos pacientes positivos para dengue que estavam hospitalizados e que tinham uma possível infecção primária ou infecção secundária.....	55
FIGURA 22 Gráfico de distribuição mensal dos pacientes recrutados e positivos para dengue e para leptospirose.....	56
FIGURA 23 Gráfico dos pacientes positivos para leptospirose através da detecção de IgM anti-leptospirose em comparação com o tempo após o início de sintomas.....	57

FIGURA 24 Gráfico ilustrativo com os sinais e sintomas similares aos pacientes positivos para dengue e para leptospirose.....58

FIGURA 25 Gráfico ilustrativo com outros sinais e sintomas similares encontrados nos pacientes positivos para dengue e para leptospirose..... 58

LISTAS DE TABELAS

1. Oligonucleotídeos utilizados para detecção dos sorotipos de Dengue. Lanciotti <i>et al</i> ,1992.....	41
2. Testes diagnósticos realizados e os respectivos pacientes positivos para cada um dos testes.....	46
3. Diagnósticos de dengue e distribuição por sexo dos pacientes.....	47
4. Número de pacientes de ambulatório positivos para o teste imunocromatográfico IgM e IgG.....	49
5. Número de pacientes hospitalizados positivos para o teste imunocromatográfico IgM e IgG.....	55
6. Correlação entre a positividade dos testes, dias de sintomas e características epidemiológicas dos pacientes. (*) Pacientes internados.....	56
7. Paciente que apresentou resultados positivos em testes para identificação de dengue e leptospirose.....	59

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	12
1.1 Dengue	12
1.1.1 Aspectos epidemiológicos.....	12
1.1.2 O vírus dengue.....	15
1.1.3 Vetores.....	17
1.1.4 Manifestações clínicas e achados laboratoriais.....	18
1.1.5 Patogênese da dengue.....	20
1.1.5 Diagnóstico da infecção por dengue.....	21
1.1.6 Diagnóstico diferencial da dengue.....	25
1.2 Leptospirose	26
1.2.1 Epidemiologia da leptospirose.....	26
1.2.2 Agente causador da leptospirose e reservatórios.....	29
1.2.3 Transmissão da leptospirose.....	30
1.2.4. Manifestações clínicas da leptospirose.....	31
1.2.5 Diagnóstico da leptospirose.....	33
2.0 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos gerais.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3.0 METODOLOGIA	36
3.1 Delineamento do estudo.....	36
3.2 População do estudo.....	36
3.3 Definição de caso de dengue.....	36
3.4 Coleta do material.....	37
3.5 Processamento das amostras.....	37
3.5.1 Teste Imunocromatográfico NS1 Ag STRIP.....	39
3.5.2 ELISA NS1.....	39
3.5.3 Extração do RNA viral.....	40
3.5.4 Detecção molecular do vírus dengue.....	40
3.5.5 Teste Imunocromatográfico DENGUE DUO TEST BIOEASY.....	41
3.5.6 ELISA dengue IgM.....	42
3.5.7 ELISA dengue IgG.....	42
3.5.8 Teste Imunocromatográfico LEPTOSPIROSE IgG/IgM TEST BIO.....	43

3.5.9 ELISA Leptospira IgM.....	43
4.0 RESULTADOS.....	45
4.1 Aspectos epidemiológicos dos pacientes recrutados.....	45
4.2 Pacientes de ambulatório.....	48
4.3 Pacientes hospitalizados.....	52
4.4 Pacientes testados para leptospirose.....	55
5.0 DISCUSSÃO.....	60
6.0 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
APÊNDICES.....	103
A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	104
B- APÊNDICE B – FICHA DE AVALIAÇÃO INICIAL E SUBSEQUENTE.....	105
ANEXOS.....	107
A- PARACER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HSJ.....	108
B- NÚMERO DE PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HSJ.....	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

1.1.1 Aspectos epidemiológicos

A dengue é considerada a mais importante arbovirose em termos de morbidade e mortalidade, com um aumento na frequência e na intensidade das epidemias, especialmente das formas mais graves, a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD). Estima-se que 50 milhões de infecções ocorrem anualmente e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos. Dentro desta estimativa, cerca de 500.000 casos evoluem para FHD, atingindo principalmente crianças e acredita-se que ocorram 20.000 óbitos por ano (GUBLER, 2002; GUZMAN; KOURI, 2003; WHO, 2009).

As regiões mais atingidas são aquelas em que o vetor responsável pela transmissão da doença, a fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) prevalece. Cerca de 100 países que se localizam entre as regiões tropicais e subtropicais, tais como, África do Sul, Américas, Oriente do Mediterrâneo, Sudeste da Ásia e Oeste do Pacífico, são afetados pelo vírus dengue (Figura 1) (SAN MARTÍN *et al.*, 2010; WHITEHORN; FARRAR, 2010).

Nas Américas, a dengue representa um fenômeno recorrente. Durante as duas últimas décadas em todas as áreas tropicais da América Central e da América do Sul, assim como no Caribe têm se percebido uma incidência maior nos casos de dengue clássica (DC) e FHD, visto que 3 milhões de casos foram notificados no período de 2001 a 2005 nas Américas (GUZMÁN; ISTÚRIZ, 2010; SHEPARD *et al.*, 2011). No século XXI, o Brasil tornou-se o país com o maior número de casos de dengue, ocupando o quinto lugar no ranking internacional de países que registraram a doença (DA-ROCHA; TAUIL, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2005; GUZMÁN; ISTÚRIZ, 2010). Atualmente no Brasil, co-circulam os quatro sorotipos do vírus dengue, o que, segundo a hipótese de Halstead, representa um grande risco à população devido a infecções sequenciais (HALSTED, 1988; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

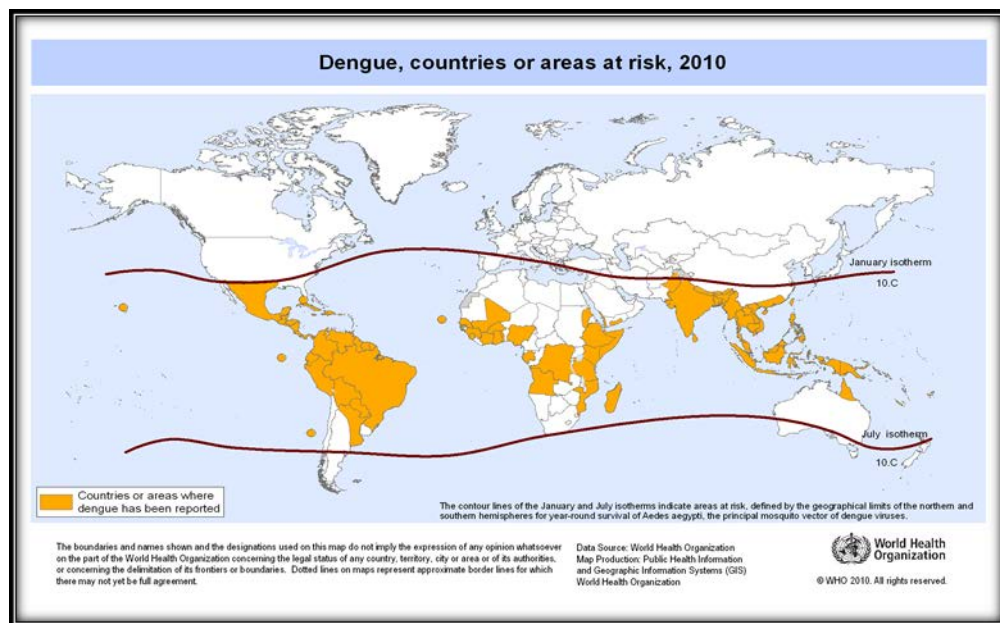


Figura 1. Áreas de risco pela infecção do vírus dengue em 2010.
Fonte: WHO, 2010

As primeiras evidências do ciclo de transmissão da doença foram descritas por Bancroft em 1906, entretanto, a primeira descrição da dengue foi realizada por Benjamin Rush em 1780, durante um surto ocorrido na Filadélfia, EUA. Outras epidemias ocorreram no século XIX em Zanzibar, Calcutá, Grécia e Japão, entre outros países (GUBLER, 1997).

No Brasil, as primeiras referências datam do século XIX. Devido à existência da febre amarela, a dengue pode ter passado despercebida, visto que, a febre amarela também é uma arbovirose transmitida ao homem pelo *Aedes aegypti*. Devido às campanhas realizadas por Emílio Ribas e Oswaldo Cruz, entre 1903 e 1923, no combate ao transmissor da febre amarela, a incidência do mosquito diminuiu, permitindo desta maneira, a redução dos casos de dengue (FONSECA; FIGUEIREDO, 2005). O primeiro surto de dengue com identificação dos sorotipos descrito no país ocorreu nos anos 80, em Boa Vista no Estado de Roraima, sendo que os sorotipos isolados foram o sorotipo 1 (DENV-1) e o sorotipo 4 (DENV-4). No entanto, medidas de controle permitiram que a doença cessasse durante esta década (PAHO, 1989; MALAVIGE *et al.*, 2004).

A dengue reapareceu na região Sudeste no biênio 86/87, sendo os primeiros casos descritos na cidade de Nova Iguaçu, próximo ao Rio de Janeiro. Esta epidemia foi causada pelo sorotipo DENV-1, onde durante este período aproximadamente 60% dos casos notificados de dengue nas Américas ocorreram no Brasil. A partir do Rio de Janeiro, o DENV-1 espalhou-se pelo Nordeste, atingindo primeiramente os estados de Alagoas, Pernambuco, Bahia e Ceará, sendo foi isolado também no Mato Grosso do Sul. Após esta

primeira epidemia, uma segunda surgiu novamente na década de 90, atingindo o Rio de Janeiro, Tocantins, São Paulo, Minas Gerais e Ceará, mas desta vez, pela circulação do vírus dengue- 2 (DENV-2). Neste surto foi observada uma explosão de casos com as formas mais graves da doença (FHD/SCD), sendo incerto o número de óbitos (FIGUEIREDO *et al.*, 1992; NOGUEIRA *et al.*, 1993; FONSECA; FIGUEIREDO, 2005).

A primeira epidemia de dengue ocorrida com identificação de sorotipo no estado do Ceará foi em 1987, mas logo foi superada pelo surto ocorrido em 1994, sendo este caracterizado como um surto explosivo com 27.000 casos notificados em três meses, apenas na cidade de Fortaleza, e dentre estes, 26 casos foram de FHD. Esta epidemia esteve ligada às condições sanitárias que facilitaram a dispersão do mosquito, ligadas ao alto índice pluviométrico, altas taxas de densidade populacional do vetor e a introdução do DENV-2 que permitiram com que muitas pessoas fossem infectadas. Dentre as mais importantes epidemias que ocorreram no estado do Ceará destacam-se as epidemias que ocorreram nos anos de 2001 e 2008, devido à elevada incidência de casos hemorrágicos da doença, e a epidemia de 1994 que apresentou o maior número de casos confirmados. No ano de 2010, 155 municípios do Ceará apresentaram infestação pelo *A. aegypti* e 125 tiveram transmissão comprovada de dengue, demonstrando um aumento no número de casos quando comparado com o ano anterior. A letalidade de FHD ocorreu em 6 pessoas e a dengue com complicações (DCC) atingiu 15 pessoas. Esta situação pode ser explicada pela provável re-circulação do sorotipo DENV-1. Em 2011, o Ceará vivenciou sua maior epidemia de dengue, sendo que 55.007 casos foram confirmados e a incidência foi acima de duzentos casos por 100.000 habitantes. Este elevado número de pessoas infectadas está diretamente relacionado à dinâmica de circulação do DENV-1, no qual foi confirmado através do isolamento viral realizado no LACEN (Figura 2) (VASCONCELOS *et al.*, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 1998; CEARÁ, 2011a). Alguns estudos demonstraram mudança no padrão de idade entre as pessoas infectadas pelo vírus no Ceará, acometendo principalmente as crianças (CAVALCANTI *et al.*, 2011).

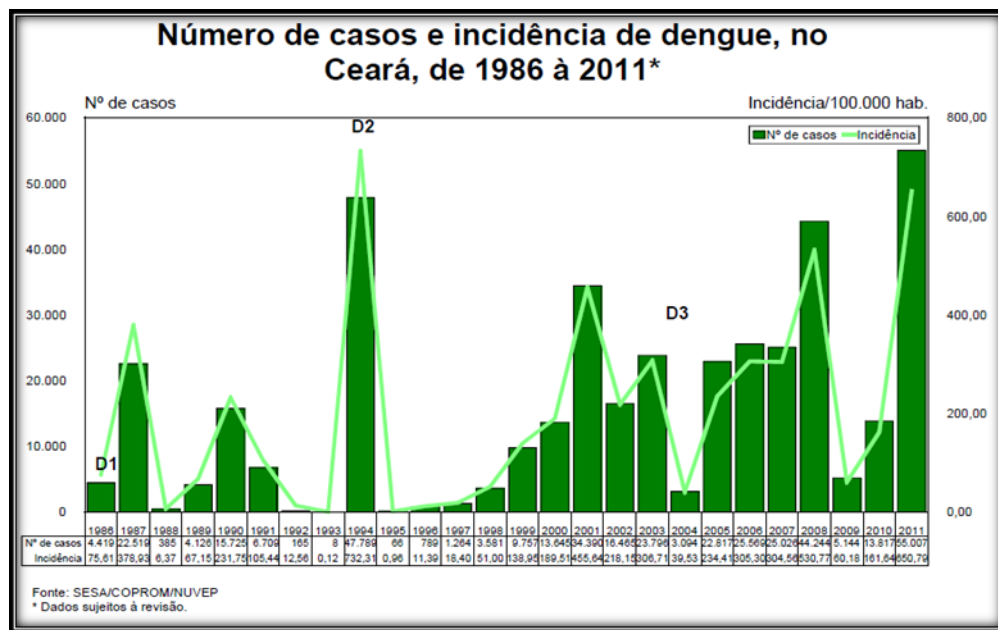


Figura 2. Gráfico de distribuição da incidência dos casos de dengue no Estado do Ceará desde a sua primeira epidemia, em 1986.

Fonte: SESA/COPROM/NUVEP

1.1.2 Vírus dengue

O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e possui quatro distintos sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4), com propriedades antigênicas distintas, causando as diferentes formas da doença, sendo a FHD, SCD e a DCC as mais preocupantes e que podem levar o paciente ao óbito. A infecção causada por qualquer um dos sorotipos permite que o indivíduo adquira imunidade permanente, mas não confere imunidade contra os demais sorotipos, entretanto, imunidade cruzada em curto prazo contra os outros sorotipos já foram notificadas. Pessoas que vivem em áreas endêmicas podem ser infectadas por mais de um dos sorotipos DENV no decorrer de suas vidas e também podem ocorrer infecções simultâneas por dois sorotipos (ARAÚJO *et al.*, 2006; GARDELLA-GARCIA *et al.*, 2008; GUZMAN; ISTÚRIZ, 2010; ZOU *et al.*, 2011).

O genoma viral é formado por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, apresentando comprimento aproximadamente de 11 kilobases (Kb) e peso molecular aproximado de $3,3 \times 10^6$ daltons. O vírus dengue possui forma icosaédrica, envelopado, esférico e possui cerca de 50nm de diâmetro (HENCHAL; PUTNAK, 1990; LODEIRO *et al.*, 2009; ZOU *et al.*, 2011).

O virion maduro contém proteínas estruturais [capsídeo (C), membrana (M) que é expressa como um precursor glicosilado prM) e envelope (E)] e proteínas não estruturais

(NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5), sendo que as primeiras apresentam como função formar os componentes do vírus e as últimas estão ligadas diretamente com a replicação viral (Figura 3) (PERERA; KUHN, 2008).

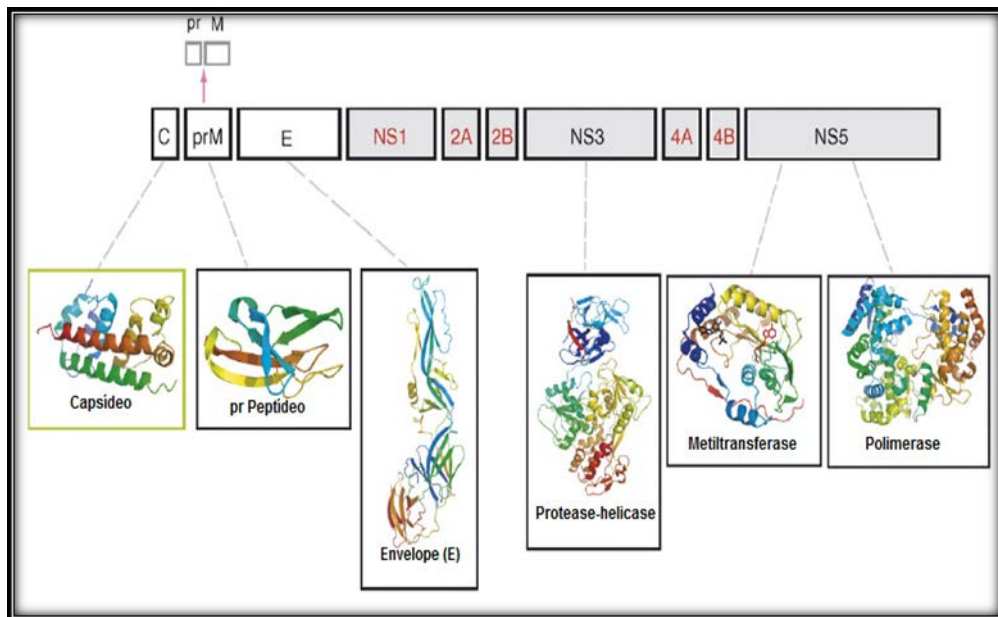


Figura 3. Estrutura genômica do vírus dengue. Proteínas estruturais: C, M e E; proteínas não-estruturais: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e NS5. Fonte: Perera & Kuhn, 2008 (Adaptado).

A proteína C é o primeiro polipeptídeo viral a ser produzido e atua provavelmente de forma cooperativa quanto à ligação específica ao RNA genômico, permitindo a formação do nucleocapsídeo (HENCHAL; PUTNAK 1990; SAMSA *et al.*, 2009).

A glicoproteína E é responsável pela geração de potentes imunógenos que atuam na proteção contra a doença, pois induzem a resposta imune. Outra importante função é a de fornecer contato entre o vírus e a célula do hospedeiro, permitindo a junção dos mesmos (HENCHAL; PUTNAK, 1990; VALDÉZ *et al.*, 2000; PERERA; KUHN, 2008).

Dentre as proteínas estruturais, a prM (pré-membrana) funciona como precursora para a formação da glicoproteína M. A clivagem da proteína prM funciona como um pré-requisito para aquisição de infectividade, ou seja, esta proteína faz parte dos virions imaturos e a partir de sua clivagem por uma protease celular na rede trans Golgi, faz-se crucial na morfogênese do vírus, tendo como resultado a liberação de virions maduros (JUNJHON *et al.*, 2010).

Sete proteínas não-estruturais foram identificadas, e, apesar de poucas possuírem sua função definida, sabe-se que estas proteínas são fundamentais no processo de replicação viral (ZOU *et al.*, 2011). A NS1 é uma glicoproteína com peso de 45 kDa, está relacionada no

processo de replicação viral, bem como a defesa viral através da inibição de ativação do complemento. Esta proteína é detectada na superfície celular e também é secretada para o meio extracelular. Além destas características, a proteína NS1 tem sido encontrada em amostras de soro de pacientes infectados pelo vírus dengue, tanto na infecção primária como secundária, sugerindo uma maior participação desta glicoproteína na patogênese do vírus e demonstrando seu possível uso como marcador de infecção pelo vírus dengue (HENCHAL; PUTNAK, 1990; YOUNG *et al.*, 2000; PERERA; KUHN, 2008; WANG; SEKARAN, 2010).

A NS2 é dividida em duas porções: NS2A (~ 22 kDa) e NS2B (~ 14 kDa,) sendo que a última possui atividade proteolítica. A proteína NS3 possui um peso molecular de 70 kDa tem atividade enzimática de nucleosídeo trifosfatase, protease e helicase, sendo conhecida como uma proteína trifuncional. Entretanto, a atividade de protease depende fortemente entre a interação NS3-NS2B (HENCHAL; PUTNAK 1990; PERERA; KUHN, 2008; SALAEMAE *et al.*, 2010).

A glicoproteína NS4 é hidrofóbica e possui duas porções: NS4A e NS4B. Estas porções são proteínas integrais da membrana, sendo que a primeira induz importantes alterações no vírus durante a replicação e a segunda está envolvida na assistência da replicação do RNA viral através da interação entre NS4B-NS3 (LEITMEYER *et al.*, 1999; UMAREDDY *et al.*, 2006).

Entre as proteínas não-estruturais, a NS5 possui o maior peso com 100 kDa, sendo a maior e a mais conservada dentre as demais. Dentre todas as proteínas, a NS3 e NS5 estão sendo alvo de estudos antivirais, pelo fato de serem as mais conservadas e de possuírem atividades vitais para o desenvolvimento do vírus (BOLLATI *et al.*, 2010; ZOU *et al.*, 2011).

1.1.3 Vetores

A dengue é transmitida pela fêmea do mosquito do gênero *Aedes*, principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (*A. albopictus*). Os mosquitos se contaminam quando se alimentam de sangue de uma pessoa infectada durante o período de viremia e em seguida transferem os vírus ao homem susceptível. A contaminação dos mosquitos pode ocorrer também através da transmissão transovariana, no qual o *Aedes spp.* pode transmitir o vírus diretamente para a prole. Após o repasto sanguíneo, o mosquito está apto a infectar novos indivíduos, transmitindo o vírus depois de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. (ARUNACHALAM, 2008; GUZMAN & ISTÚRIZ, 2010).

O mosquito *A. albopictus* é um potencial transmissor da doença principalmente na Ásia e a presença do mesmo foi reportada no Brasil pela primeira vez em 1953 (FORATINNI, 1986). Apesar do seu contínuo crescimento no país, ainda não foi encontrada nenhuma relação deste mosquito com a transmissão da doença, entretanto, esta possibilidade não pode ser descartada, visto que este mosquito encontra-se bem adaptado, tanto no ambiente urbano como no ambiente rural (MARTINS, 2006; 2010). Os estados que já notificaram a presença do *A. albopictus* são: Amapá, Roraima, Acre, Tocantins, Piauí, Sergipe e Ceará (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2010; MARTINS, 2010).

1.1.4 Manifestações clínicas e achados laboratoriais

As formas clínicas da dengue podem variar desde a forma assintomática, como DC, FHD, SCD e DCC, sendo estas últimas às formas mais graves. Após o período de incubação (4 a 8 dias), a enfermidade inicia-se de forma abrupta, passando por três fases: febril (fase aguda da doença), crítica (ocorre durante a desfevecência, ocorrendo um aumento da permeabilidade capilar) e recuperação. Os sintomas mais característicos da doença são: febre, cefaléia e “rash” cutâneo (WHO, 2009; OPS, 2010).

A febre do dengue é caracterizada por ser a forma clássica da doença em que o paciente apresenta pelo menos dois dos seguintes sintomas acompanhado por febre: cefaleia, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia, prostração e exantema. Esta forma clínica é uma doença aguda e auto-limitante, que dura aproximadamente 4 ou 5 dias. Outros sintomas também podem ser observados como: linfadenomegalias, exantema generalizado, prova do laço positiva, petéquias e outras manifestações hemorrágicas, como por exemplo, epistaxe e sangramento gastrointestinal. A fase de convalescência geralmente ocorre de forma espontânea, mas pode ser prolongada e acompanhada por astenia pronunciada e depressão (NOISAKRAN; PERNG, 2008; OPS, 2010; JAHAN, 2011).

Entre os exames inespecíficos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da dengue, o hemograma completo e a bioquímica são os testes principais realizados. Através do hemograma, observa-se uma neutropenia com linfocitose atípica e trombocitopenia, enquanto, na bioquímica as alterações enzimáticas hepáticas apresentam-se elevadas, sendo que em alguns pacientes o acometimento hepático pode ser fatal (GUBLER, 1998; SENEVIRATNE *et al.*, 2006; BRASIL, 2010). Mesmo sendo uma doença que não apresenta complicações, a DC é responsável por perdas econômicas, visto que acomete parte da população economicamente ativa. Estudos mostram que a dengue tem o mesmo impacto e a mesma

magnitude que outras doenças infecciosas como tuberculose, malária, hepatite e meningite (GUBLER, 2002).

A FHD geralmente ocorre em infecções secundárias, mas pode ocorrer em infecções primárias, especialmente em lactantes. Na maioria das vezes, inicia-se com o aumento repentino da febre que dura cerca de 2 a 7 dias, apresentando outros sintomas idênticos ao da DC, sendo indistinguíveis no início da enfermidade. Entretanto, alguns sinais hemorrágicos podem ser evidenciados, como a prova do laço positiva, petéquias, gengivorragias, epistaxe, equimoses, hematêmese entre outros. O grande diferencial entre a FHD e a DC são o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de líquidos para o interstício (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997; SINGHI *et al.*, 2007; BADIYOPADHYAY *et al.*, 2006; WHO, 2009).

É importante destacar a necessidade de um diagnóstico preciso e precoce, pois quando a intervenção clínica não é adequada, alguns pacientes que apresentam FHD podem sofrer um colapso circulatório, caracterizando a SCD (HEMUNGKORN *et al.*, 2007).

Alguns sinais indicam uma possível evolução para as formas mais graves, estes são conhecidos como sinais de alarme. Geralmente estes sinais são: dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, hipotensão, hepatomegalia, hemorragias importantes como a hematêmese e/ou melena, sonolência e irritabilidade, diminuição da diurese, aumento do hematócrito, queda abrupta de plaquetas, desconforto respiratório e diminuição da temperatura corpórea (WHO, 2009; BRASIL, 2010). A FHD, ainda, pode apresentar-se de diferentes formas e segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) a mesma é dividida em quatro distintos graus de acordo com a gravidade dos sintomas: I, II, III e IV; sendo I e II moderado e III e IV grave. (GUZMAN; KOURI, 2003; WHO, 2009; BRASIL, 2010).

A dengue também pode apresenta-se de maneira distinta às formas descritas anteriormente, esta forma é conhecida como DCC. A DCC é todo caso grave, mas que não se enquadra nos critérios da OMS de FHD, e quando a classificação de dengue clássica é insatisfatória. Os sinais e sintomas mais frequentes da DCC são: alterações no sistema nervoso, disfunção cardiorrespiratória, insuficiência hepática, plaquetopenia, hemorragia digestiva, derrame cavitário, leucometria global igual ou inferior a $1000/m^3$ e óbito (BRASIL, 2010).

Apesar de muito se conhecer sobre a fisiopatologia e tratamento das formas graves da dengue, ainda se faz necessário que sejam implantadas uma rede estruturada de serviços de

saúde que seja capaz de proporcionar um atendimento destes pacientes, reduzindo a mortalidade. No entanto, sem um tratamento adequado e sem diagnóstico precoce, o óbito causado pela FHD pode exceder até 20% (TEIXEIRA, 2005; DANTÉS; WILLOQUET, 2009).

1.1.5 Patogênese da dengue

Apesar dos grandes avanços nas pesquisas a respeito do diagnóstico, prevenção e tratamento, ainda pouco se sabe o que leva um paciente a apresentar a forma mais grave da doença. Várias hipóteses foram propostas no intuito de esclarecer a patogênese da dengue, apesar de que nenhuma, isoladamente, é capaz de explicar totalmente os mecanismos envolvidos (HEMUNGKORN *et al.*, 2007).

A hipótese mais aceita foi proposta por Halstead em 1988, que refere-se a um fenômeno da resposta imunológica exacerbada dependente de anticorpos. Nesta hipótese, acredita-se que anticorpos existentes em um paciente que já teve contato com um dos quatro sorotipos da dengue, não seriam capazes de neutralizar o sorotipo que está causando uma infecção atual. Estes anticorpos se ligariam a outros epítomos do sorotipo responsável pela infecção presente comuns a outros sorotipos, sem causar a neutralização, formando assim, complexos-vírus anticorpos. Depois de formado, este complexo seria capaz de se ligar às células fagocíticas humanas intermediadas pelos receptores de imunoglobulinas (Fcγ), e como consequência infectariam estas células com uma maior eficiência (HALSTEAD, 1988; KURANE, 2007; LEI *et al.*, 2008).

Outra teoria de grande importância para explicar a FHD foi proposta por Rosen em 1977. Nesta teoria, foi enfatizado que as diferentes formas de infecção pelo vírus dengue estariam diretamente relacionadas com a virulência de cada cepa, devido a variações genéticas das mesmas. Estas podem ser explicadas através de diversas mutações genéticas de replicações em hospedeiros que vivem em regiões de hiperendemicidade e no qual co-circulam os quatro sorotipos do vírus dengue (WATTS *et al.*, 1999; GIBBONS; VAUGHN, 2002; MARTINA *et al.*, 2009).

Mesmo com o surgimento de diferentes teorias apontando para uma única consequência, outra hipótese foi apresentada, indicando que muitos fatores podem contribuir para a FHD, esta teoria é conhecida como teoria integral da multicasualidade. Esta teoria inclui diversos fatores que podem influenciar em maior ou menor grau para a gravidade da doença, são eles: fatores relacionados à epidemiologia (imunidade dos indivíduos em uma

determinada comunidade, intervalo de tempo entre as infecções por diferentes sorotipos), ao indivíduo (sexo, raça, idade, predisposição genética, presença/ausência de anticorpos por infecções anteriores) e ao vírus (sorotipos, virulência e mutações genômicas) (GUZMAN; KOURI, 2003).

1.1.6 Diagnóstico da infecção por dengue

Devido ao fato da febre do dengue, nas suas formas indiferenciada e clássica ser semelhante a diversas outras infecções, se faz necessário à utilização de testes diagnósticos que sejam específicos para dengue para a confirmação dos casos suspeitos. Existem diferentes testes que são capazes de diagnosticar esta doença, entre eles, podemos citar as técnicas de isolamento viral, detecção de anticorpos séricos específicos, detecção de antígenos e RNA viral no plasma, soro e em tecidos (GUBLER, 1998).

O isolamento viral é uma das técnicas mais específicas no qual possibilita a identificação do sorotipo do vírus dengue. Esta técnica pode ser realizada a partir de amostra clínica do paciente (soro, plasma, etc.) e é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da infecção. O período de viremia é curto, sendo observado normalmente entre o segundo e o quarto dia antes do aparecimento dos sintomas, podendo perdurar entre o primeiro até o quinto dia de sintomas. No entanto, para a realização do isolamento viral é necessário que as amostras biológicas colhidas do paciente sejam coletadas entre os primeiros dias de sintomas da doença (GUZMÁN; KOURÍ, 2004; SHU; HUANG, 2004).

Existem quatro métodos diferentes de isolamento viral, inoculação intracerebral em camundongos neonatos, cultura de células de mamíferos, inoculação intratorácica em mosquitos adultos e o uso de cultura de células de mosquitos (GUBLER, 1998). Entretanto, alguns modelos como inoculação intracerebral em camundongos neonatos e inoculação intratorácica em mosquitos adultos não são utilizados para pesquisa, visto que ambos são trabalhosos e necessitam de muitos recursos para serem realizados. O sistema de isolamento viral de escolha na rotina em laboratório é através do uso de cultura de células de mosquitos, como as células do *A. albopictus* (C6/36), as células de *Toxohynchites amboinenses* (TRA-284), ou *A. pseudoscutellaris* (AP-61). A identificação da infecção do vírus dengue no isolamento viral é realizada através de imunofluorescência indireta com anticorpos específicos monoclonais ou policlonais (GUZMÁN; KOURÍ, 1996; GUZMÁN *et al.*, 2010).

Os testes sorológicos, como o ELISA-IgM e ELISA-IgG, são os mais utilizados na rotina laboratorial, devido a sua facilidade e rapidez de realização quando comparados com os diagnósticos de isolamento viral e os métodos moleculares. Apesar das suas vantagens de

rapidez e facilidade, estes testes apresentam baixa especificidade, podendo apresentar reações cruzadas com outros flavivírus que co-circulam com o vírus dengue (GUZMÁN; KOURI, 1996; GUZMÁN *et al.*, 2010). Outros testes sorológicos podem ser escolhidos de acordo com as condições do laboratório, como o teste de fixação de complemento (FC), teste de neutralização (TN), teste de inibição da hemaglutinação (IH) (GUBLER, 1998). Entretanto, as técnicas de FC e TN, atualmente não são utilizadas na rotina devido a complexidade para sua realização e a necessidade de requerer técnicos bem treinados, apesar de que o teste de neutralização é o mais sensível e específico dentre os testes sorológicos para dengue (GUBLER, 1998). O TN está sendo utilizado atualmente na pesquisa e em estudos para a produção de vacina contra a infecção por dengue (GUZMÁN *et al.*, 2010).

Dois padrões de resposta imunológica podem ser observados em uma infecção por dengue e devem ser levados em consideração durante a realização dos testes sorológicos: a resposta primária e a resposta secundária. A primeira ocorre em pacientes que nunca tiveram contato com o vírus dengue ou com algum flavivírus e a segunda se refere a pacientes que tiveram contato prévio com os flavivírus. Quando um paciente apresenta uma resposta primária, os anticorpos IgM são detectados entre o quarto e sexto dia de sintoma, enquanto a IgG é detectada a partir do 12º dia de doença. Numa infecção secundária, o comportamento destes anticorpos surge de forma diferenciada, sendo que o IgM passa a ser detectado um pouco mais cedo, mas em pequenas quantidades, e o anticorpo IgG é encontrado precocemente e em níveis mais altos (Figura 4) (SCHILLING *et al.*, 2004; SA-NGASANG *et al.*, 2006; WHO, 2009).

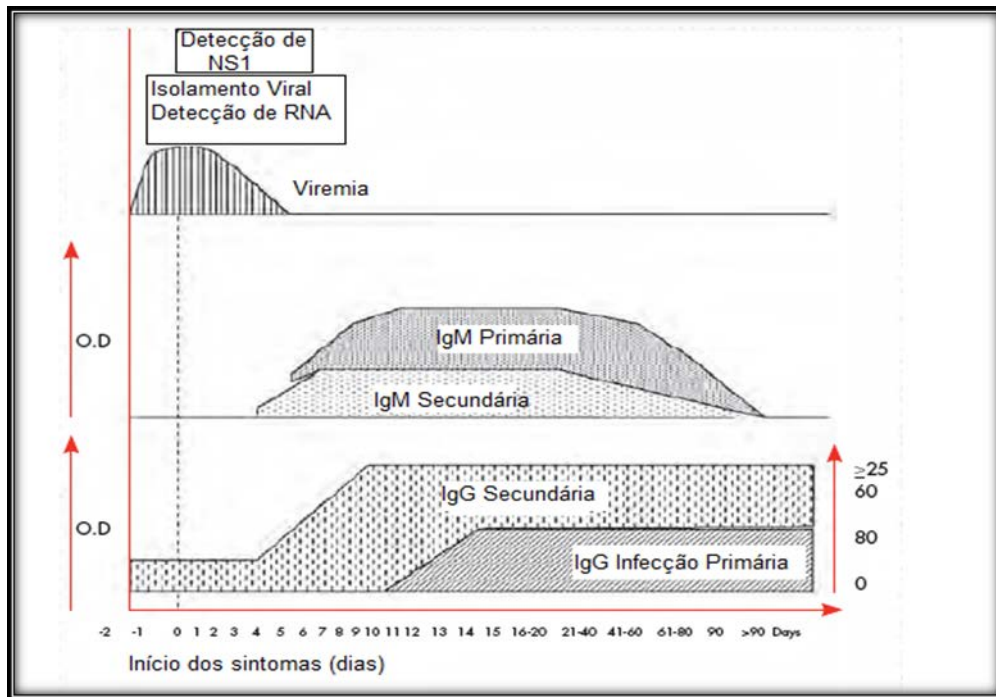


Figura 4. Gráfico representativo do comportamento dos anticorpos em uma infecção primária e em uma infecção secundária por dengue e métodos de diagnósticos que podem ser usados para detectar a infecção nestas fases.
Fonte: WHO, 2009 (Adaptado).

O teste de IH foi amplamente utilizado para a identificação da infecção por dengue. Esta técnica apresenta uma boa sensibilidade e tem como característica a capacidade de detecção de anticorpos por vários anos (48 anos ou mais), permitindo que seja utilizada em estudos soropidemiológicos e para diferenciar infecção primária de infecção secundária. O teste de IH apresenta algumas limitações, como por exemplo, a necessidade de coletas de amostras de soro pareadas e a baixa especificidade, além de não poder identificar o sorotipo responsável pela infecção (DE PAULA; FONSECA, 2004; TELES *et al.*, 2005; WHO, 2009).

Atualmente, os métodos sorológicos mais utilizados na rotina laboratorial são os testes imunoenzimáticos (ELISA). Esta técnica além de possuir uma boa sensibilidade, permite a detecção de anticorpos do tipo IgM e IgG, e a detecção de antígenos NS1 (POERSCH *et al.*, 2005; SAMUEL; TYAGI, 2006). A detecção de IgM por ELISA (MAC-ELISA) tornou-se a mais importante ferramenta utilizada para a confirmação da infecção recente por dengue. Esta técnica não precisa de coleta de amostras de soro pareadas e apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, quando utilizada a partir do quinto dia de sintoma da doença. Além de amostras de soro, outros tipos de amostras, como saliva, líquido e sangue em filtro de papel, podem ser utilizadas. Além destas vantagens, este método é um

teste que possui uma rápida e fácil execução. O teste MAC-ELISA, como os outros testes sorológicos, não identifica o sorotipo infectante (DE PAULA; FONSECA, 2004; WHO, 2009; GUZMÁN *et al.*, 2010).

Devido à existência de vários sorotipos causando infecções sequenciais e FHD/SDC é necessário distinguir uma infecção primária de uma infecção secundária, sendo isto possível através da detecção ou não de IgG. Esta técnica é simples e de fácil realização, podendo ser utilizada para a detecção da infecção em um grande número de amostras, entretanto este teste possui a mesma capacidade de reações cruzadas que o IH, devido a baixa especificidade (GUBLER, 1998; SHU; HUANG, 2004).

Ultimamente, os testes de detecção do ácido nucléico viral estão sendo bastante utilizados no diagnóstico e na pesquisa, devido a alta sensibilidade e especificidade. A técnica RT-PCR é uma ferramenta que está revolucionando os testes laboratoriais, devido sua simplicidade e rapidez (SANTOS *et al.*, 2008; SAXENA *et al.*, 2008). Este teste, além de permitir identificar a infecção pelo vírus dengue, o mesmo consegue detectar o sorotipo infectante e devido a esta característica torna-se uma ferramenta que pode ser utilizada em investigações epidemiológicas e no planejamento de estratégias no controle contra o vírus. No entanto, apresenta algumas desvantagens, como a facilidade de contaminação, o alto custo e a baixa reprodutibilidade (DE PAULA; FONSECA, 2004; GUZMÁN; KOURI, 2004).

O RNA viral do vírus dengue pode ser detectado por RT-PCR a partir de uma amostra clínica ou de tecido humano, sendo que esta amostra não precisa ser necessariamente grande, visto que uma das características desta técnica é justamente a produção de diversas cópias do ácido nucléico. A combinação de duas ações - a transcrição do RNA viral para cDNA e a subsequente produção de várias cópias desta molécula - e utilização de oligonucleotídeos específicos permitem que a reação de PCR seja muito eficaz (LAI *et al.*, 2007; YONG *et al.*, 2007). Atualmente existe outro tipo de RT-PCR conhecido como RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). Esta técnica, além de identificar uma possível infecção, consegue quantificar a carga viral. Através do uso de sondas fluorogênicas TaqMan ou do uso da molécula SYBR Green, esta técnica ainda é mais rápida que o RT-PCR tradicional, pois dispensa a necessidade da realização do gel de agarose para a visualização da amplificação (SAMUEL; TYAGI, 2006; GURUKUMAR *et al.*, 2009; WHO, 2009; GUZMÁN *et al.*, 2010).

O RT-PCR multiplex desenvolvido por Lanciotti *et al.* (1992), também tem sido muito utilizado nas pesquisas, visto que, a principal característica deste teste é que em uma única reação pode ser determinado os quatros sorotipos. Infelizmente, esses testes ainda são

pouco utilizados na rotina laboratorial devido ao alto custo (GUBLER, 1998; LAI *et al.*, 2007; WHO, 2009).

A utilização do diagnóstico para detecção da glicoproteína NS1 tem sido muito utilizada em estudos para detecção da infecção por dengue, pois a mesma serve como um importante imunógeno em infecções por este vírus (TEIXEIRA; BARRETO, 2009; WANG; SEKARAN, 2010). A NS1 é encontrada no soro humano logo no início dos sintomas, tornando-se assim uma importante ferramenta no diagnóstico. Atualmente, existem muitos kits de ELISA para detecção de NS1, mas eles só detectam a infecção no início dos sintomas, enquanto a PCR, embora seja capaz de identificar a infecção também no início da infecção, é uma técnica que utiliza reagentes muito caros (ALCON *et al.*, 2002; BESSOFF *et al.*, 2010; CASTRO-JORGE, 2010; LIMA *et al.*, 2011).

A detecção da NS1 é realizada através do teste de ELISA e vários kits para identificar esta proteína já foram produzidos. A utilização do anticorpo monoclonal MAb específico para NS1 é responsável por diferenciar o vírus dengue dos demais *Flavivirus* (HU *et al.*, 2011). Além do ELISA, testes imunocromatográficos para detecção de NS1 estão sendo utilizados como forma de triagem entre pacientes dengue-símiles (NGA *et al.*, 2007; CHATERJI *et al.*, 2011).

Mesmo possuindo um considerável número de técnicas para a identificação da infecção para dengue, o ideal seria a combinação dos mesmos para aumentar a eficácia do diagnóstico da doença (GUBLER, 1998; GURUKUMAR *et al.*, 2009; TEIXEIRA; BARRETO, 2009; GUZMÁN *et al.*, 2010).

1.1.7 Diagnóstico diferencial da dengue

A dengue apresenta um amplo espectro clínico, sendo muito difícil, em alguns casos, distingui-la de outras infecções, utilizando somente os critérios clínico-epidemiológicos, portanto, faz-se necessário o uso de técnicas laboratoriais específicas. Devido a este fato, o Ministério da Saúde recomenda a realização do diagnóstico diferencial para as seguintes infecções: influenza, sarampo, rubéola, citomegalovírus, hepatites virais, hantavirose, febre amarela, oropouche, leptospirose, malária, dentre outras, dependendo da situação epidemiológica da região (BRASIL, 2007).

A leptospirose, assim como a dengue, ocorre durante as estações chuvosas e é uma infecção que atinge milhares de pessoas em todo o mundo. Devido a grande semelhança na sintomatologia, muitos estudos têm demonstrado a confusão do diagnóstico entre a dengue e a

leptospirose e vice-versa, o que constitui um grande problema para o tratamento do paciente (SOUZA *et al.*, 2007; BROWN *et al.*, 2010).

1.2 Leptospirose

1.2.1 Epidemiologia da leptospirose

A leptospirose é umas das principais zoonoses mais difundidas no mundo, atingindo principalmente os países localizados nas regiões tropicais e subtropicais. No entanto, os países tropicais mais atingidos são os países em desenvolvimento, devido à exposição humana aos reservatórios da doença. Tem sido observado aumento na notificação nos últimos anos em diversas regiões do mundo: Nicarágua, Sudeste da Ásia, Estados Unidos, Malásia e Brasil. Esta enfermidade também tem como característica a sazonalidade, visto que, seu pico de incidência é durante as estações chuvosas. Entretanto, o intenso e desordenado crescimento urbano criou ambientes físicos e sociais extremamente insalubres, devido à inexistência de saneamento básico, a população fica exposta a situações de risco, aumentando as chances de infecção por diversos agentes, entre eles a *Leptospira* sp. (KO *et al.*, 1999; LEVETT, 2001; PAPPAS *et al.*, 2008).

Descrita pela primeira vez pelo alemão Adolf Weil em 1886, a leptospirose é uma doença na qual os seus sintomas podem variar de acordo com o sorovar, estado imunológico do hospedeiro e idade. Pode se apresentar como uma leve infecção ou como uma grave infecção, com insuficiência renal, insuficiência pulmonar ou insuficiência hepática, levando o paciente ao óbito (BHARTI *et al.*, 2003; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; WHO, 2011).

No Brasil, a leptospirose é uma zoonose endêmica de notificação compulsória que atinge principalmente as pessoas que vivem em regiões sem as condições mínimas de saneamento, sendo que a manutenção do agente no meio é favorecida pela vasta população de roedores e pelo clima tropical úmido (CASTRO *et al.*, 2011). Os primeiros surtos nas regiões brasileiras foram na década de 80 e atingiram principalmente as regiões Norte e Nordeste. Atualmente, esta doença é mais prevalente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste (Figura 5), tendo os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Recife, Salvador e Rio Grande do Sul com o maior número de casos confirmados, no entanto, os dados obtidos pela vigilância sanitária do Brasil são precários, tornando-os assim, não muito confiáveis (KO *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2007; BRASIL, 2011).

Estudos epidemiológicos sobre a leptospirose no Brasil têm demonstrado que a doença ocorre principalmente após os períodos chuvosos. Surtos da doença têm sido descritos

em grandes centros urbanos e também em áreas rurais no Brasil, portanto, é necessário que ocorra uma melhoria nas condições sanitárias e nos programas de controle e vigilância (KO *et al.*, 1999; PAPPAS *et al.*, 2008; ABELA-RIDDER *et al.*, 2010; BRASIL, 2011b). Em um estudo de distribuição espacial da leptospirose no Rio de Janeiro, entre os anos de 1996-1999, observou-se a ocorrência de uma grande epidemia com 1.792 casos da doença logo após o município ter sido assolado por fortes chuvas no mês de fevereiro de 1996 (TASSINARI *et al.*, 2004).

Os diagnósticos utilizados não são específicos e esta enfermidade possui sintomas muito semelhantes a outras doenças. Apesar de ocorrer em áreas rurais, a leptospirose está cada vez mais se tornando uma doença comum das regiões urbanas

A OMS considera que a incidência do agravo em regiões tropicais varia de 10 a 100 casos/100.000 habitantes, entretanto no Brasil, a incidência média do agravo é de apenas 1,9 casos a cada 100.000 habitantes, o que caracteriza o país abaixo da média (BRASIL, 2011).

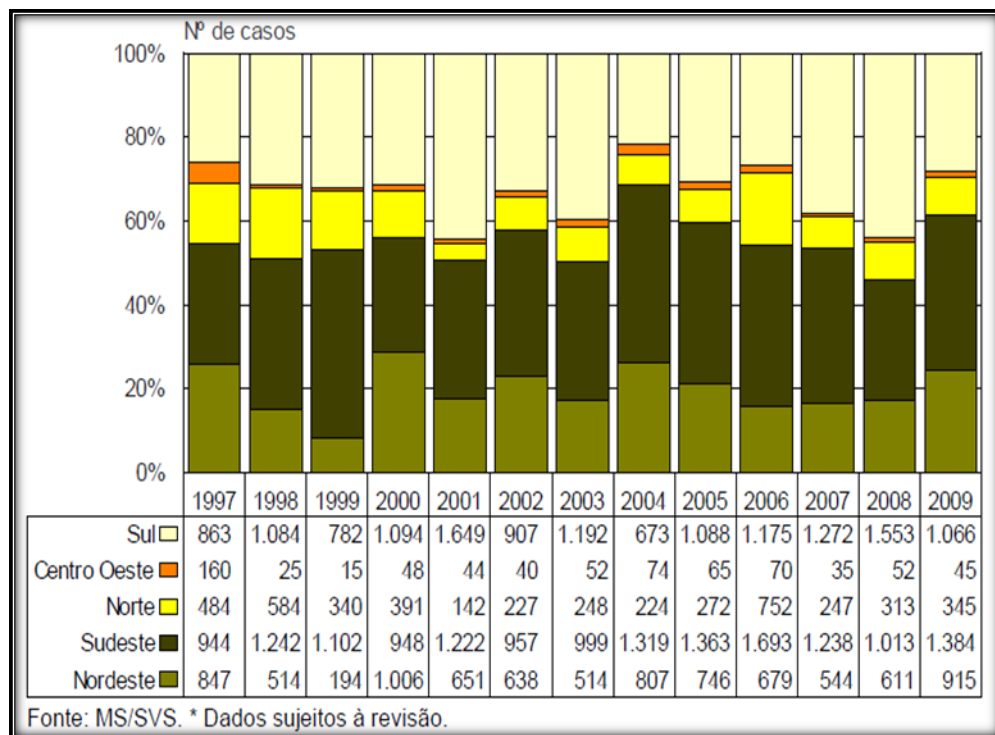


Figura 5. Gráfico com o número de casos confirmados de leptospirose no Brasil por região entre 1997 e 2009.

Fonte: MS/SVS

Os primeiros casos de leptospirose no Estado do Ceará foram descritos pela primeira vez em um inquérito sorológico ocorrido no Vale do Cariri em 1963 por Castro e Corrêa,

apresentando uma positividade de 1,59% para o sorovar *Icterohaemorrhagiae* (LIMA; SANTA ROSA *apud* CASTRO; CORRÊA, 1974).

Apesar de a doença ter sido descrita em 1963, os casos de leptospirose no Estado do Ceará começaram a ser notificados a partir de 1995, sendo o ano com o maior número de pessoas infectadas pela doença. Destacam-se também os anos de 2003 e 2004, nos quais as incidências foram superiores a 1/100.000 hab. (CEARÁ, 2011b). Em 2008, ocorreu um surto de leptospirose na cidade de Várzea Alegre, no qual 59 casos tinham sido notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Destes, 30 casos haviam sido confirmados laboratorialmente através do teste de ELISA-IgM. Neste mesmo ano, 192 casos suspeitos foram notificados em todo estado e no ano seguinte, 2009, duzentos e seis casos foram notificados, sendo que 85 foram confirmados e destes, 29 casos pertenciam à cidade de Fortaleza. Em 2009, também foi registrado um surto de leptospirose na cidade de Pacoti (BRASIL, 2008; 2010). Em 2010, foram notificados 71 casos, sendo 29 confirmados em treze municípios e com a ocorrência de 7 óbitos. Como nos demais estados do país, a doença se manifesta com um maior destaque no primeiro semestre de cada ano (Figura 6). No Ceará, a população masculina é a mais acometida com 85,8% dos casos e a faixa etária mais atingida é entre os pacientes de 20 a 49 anos (CEARÁ, 2011b).

No Brasil, durante o período de 1985 a 1997, foram notificados 35.403 casos de leptospirose, sendo 3.821 óbitos (BRASIL, 1998). Neste mesmo período, também foram notificados os primeiros casos da forma mais grave da doença no Ceará. Um estudo retrospectivo, realizado no período entre 1985 a 1998, com pacientes hospitalizados e contaminados com a forma mais grave da leptospirose, a insuficiência renal aguda, revelou que dentre os 142 pacientes avaliados, 78% eram do sexo masculino. Este, ainda relatou o acometimento de trabalhadores que atuam em diversas áreas: trabalhador da construção civil (22%); doméstica (17%); agricultor (13%); comerciante, estudante, aposentado (6%); entregador (2%), sugerindo desta forma, que a doença acomete principalmente pessoas com baixo nível sócio-econômico (DAHER *et al.*, 2005).

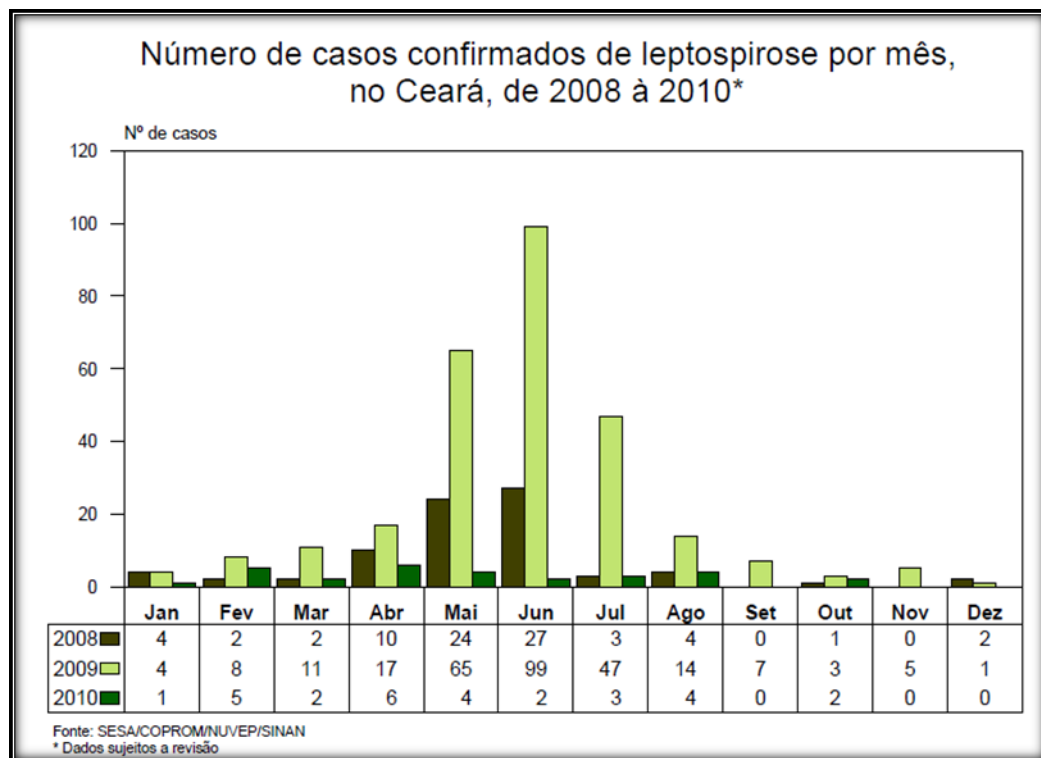


Figura 6. Gráfico representando o número de casos confirmados de leptospirose no Ceará de 2008 a 2010.

Fonte: SESA/COPROM/NUVEP/SINAN.

1.2.2 Agente causador da leptospirose e reservatórios

A leptospirose é uma zoonose negligenciada e tem como seu agente causador bactérias que pertencem ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae*, tendo a *L. interrogans* como principal agente etiológico, apesar de se conhecerem mais de sete espécies patogênicas. Estas podem infectar desde animais selvagens, animais domésticos ao homem (LEVETT, 2001; ZUNINO; PIZARRO, 2007).

A *Leptospira* sp., identificada pela primeira vez em 1907 por Stimson, é uma bactéria helicoidal obrigatoriamente aeróbica, de crescimento lento em meio de cultura, possuindo cerca de 0,1µm a 6-20µm de comprimento e tem como unidade taxonômica o sorovar (sorotipo), sendo que qualquer sorovar pode atingir o homem causando diversos sintomas. Esta bactéria possui uma dupla membrana e parede celular de peptidoglicano (Figura 7) (BINDER; MERMEL, 1998; LEVETT, 2001; VIJAYACHARI *et al.*, 2008). Geralmente, as espécies de *Leptospira* sp. podem ser encontradas em ambientes úmidos e em reservatórios de água (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

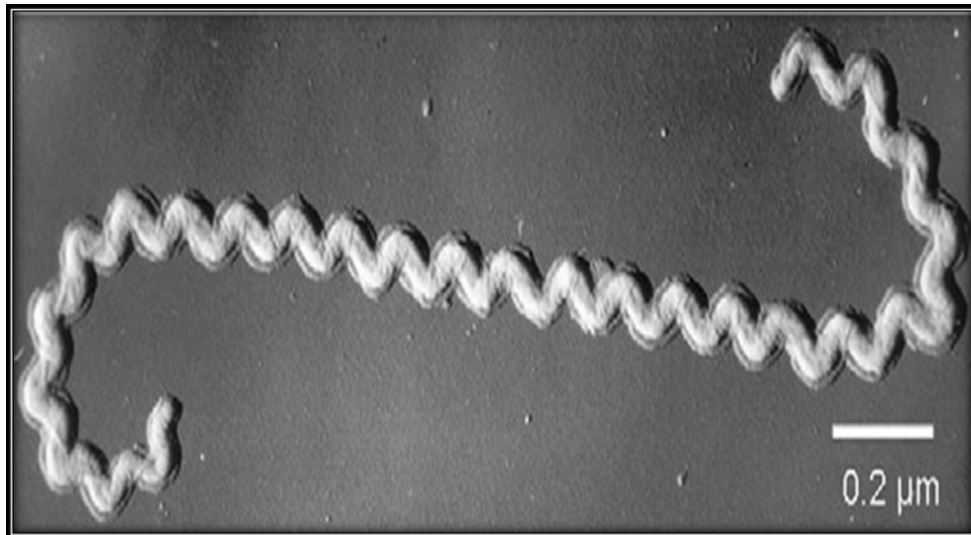


Figura 7. Fotomicrografia *Leptospirasp.*, demonstrando a sua forma helicoidal.

Fonte: Adler & Moctezuma, 2010.

As espiroquetas têm como reservatório os animais sinantrópicos, principalmente os roedores das espécies *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato preto) e *Mus musculus* (camundongo). Existem outros reservatórios de grande importância na transmissão da doença, são eles: caninos, suínos, bovinos, equinos, ovinos e caprinos (WHO, 2011b).

1.2.3 Transmissão da leptospirose

A transmissão da leptospirose pode ser direta ou indireta, sendo a transmissão direta intra-específica provavelmente a mais relevante, enquanto a transmissão indireta é mais importante em infecções acidentais. A infecção direta humana ocorre quando há o contato entre água ou solo contaminados com a urina dos mamíferos infectados. Após a contaminação nos mamíferos, as espiroquetas patogênicas colonizam principalmente as porções proximais dos túbulos renais de cada um dos seus reservatórios. As regiões que servem de porta de entrada para as leptospiras em seres humanos são principalmente as mucosas e a pele. A leptospira tem um grande período de incubação que varia de 2 a 20 dias (BHARTI *et al.*, 2003; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; COELHO; MASSAD, 2011).

São vários os fatores de risco para contaminação por leptospirose, entre eles, a ocupação em áreas sem qualquer tipo de saneamento básico, moradias precárias próximas a córregos ou esgotos a céu aberto, pessoas que trabalham em serviços de saneamento ambiental ou que trabalham em zonas rurais em contato com pontos de alagamento, contato

com a urina de roedores ou outros mamíferos contaminados com leptospiras e viagem aos locais com focos da doença (SARKAR *et al.*, 2002; SLACK, 2010; BRASIL, 2011).

Devido à existência de diversos sorovares, os seres humanos podem ser infectados por mais de uma vez, apresentando anticorpos-específicos apenas para aquele sorovar de infecções anteriores (LEVETT, 2001; SLACK, 2010).

1.2.4 Manifestações clínicas da leptospirose e achados laboratoriais.

O período de incubação até o aparecimento dos primeiros sintomas é, em média, de 15 dias. Os sintomas da leptospirose são variáveis, ou seja, podem apresentar-se desde quadros oligossintomáticos leves a quadros mais graves (Síndrome de Weil), na maioria deles fulminante. Estes quadros mais graves também são variáveis, o paciente pode apresentar disfunção hepática ou insuficiência renal, hipotensão grave ou síndrome pulmonar aguda (LEVETT, 2001; BARTHI *et al.*, 2003).

A sintomatologia da leptospirose é dividida em duas fases: fase precoce ou anictérica e fase tardia. Na primeira fase, os sintomas são bastante semelhantes a outras viroses, iniciando com uma febre abrupta, cefaléia, mialgia, principalmente na área da panturrilha, anorexia, náuseas e vômitos, podendo também ocorrer diarreia, artralgia, hiperemia, fotofobia, dor ocular e tosse, dificultando desta forma o seu diagnóstico (DAHER *et al.*, 1999). Hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia, apesar de serem sintomas incomuns, também podem ser identificados (ZUNINO *et al.*, 2007). Estes sintomas podem durar cerca de uma semana e, posteriormente, caso não tratado, 5% a 10% dos pacientes infectados podem evoluir para as formas mais graves, pois podem ocorrer múltiplas infecções, causando danos nos órgãos, incluindo fígado, rins e lesões pulmonares (DOUDIER *et al.*, 2009). Devido à similaridade de sintomas, é nesta fase que o diagnóstico diferencial deve ser utilizado. Segundo o Ministério da Saúde, a leptospirose faz diagnóstico diferencial com dengue, influenza, malária, doença de Chagas aguda, toxoplasmose, febre tifóide, entre outras.

A fase tardia ocorre após a primeira semana da doença (pode surgir mais cedo), e observam-se os sintomas mais graves. O sinal mais comum desta fase é a icterícia que geralmente apresenta uma tonalidade alaranjada, surgindo entre o 3º e o 7º dia da doença. A icterícia também é vista como um preditor ruim de prognóstico, visto que este sintoma apresenta uma associação com a síndrome de Weil (BAL, 2005; BRASIL, 2011).

No Brasil, a síndrome pulmonar e a insuficiência renal estão correlacionadas à alta mortalidade. A síndrome pulmonar apresenta-se como tosse seca, dispnéia, expectoração hemoptóica, e ocasionalmente, dor torácica e cianose. Além do sangramento pulmonar, os fenômenos hemorrágicos podem ocorrer na pele como petéquias e equimoses. Para a detecção desta síndrome é necessária a realização de uma radiografia de tórax (KO *et al.*, 1999; BUDIONO *et al.*, 2009; BRASIL, 2011).

O envolvimento renal na leptospirose é caracterizado por nefrite intersticial aguda e que pode estar associada à necrose tubular aguda. A lesão renal é definida como um declínio abrupto da função renal, o que resulta na incapacidade de excretar resíduos metabólicos e manter um fluido adequado e equilíbrio eletrolítico (HILTON, 2006). Diversos fatores de risco podem fazer com o que os pacientes evoluam ao óbito, dentre eles, os mais importantes são a oligúria, hipotensão, acidose metabólica, sepse, infecção pelo HIV (DAHER *et al.*, 2008).

Outras manifestações podem ser apresentadas como miocardite, pancreatite, delírio, alucinações e sinais de irritação meníngea, também podem acometer o paciente. Manifestações neurológicas também têm sido descritas, apesar de não se saber o mecanismo da neuroleptospirose. Os sintomas típicos da neuroleptospirose incluem dor de cabeça, vômitos e sinais de irritação meníngea. Manifestações oculares também vêm sendo muito descritas na literatura, em que os pacientes geralmente apresentam congestão conjuntival sem exsudação de caráter autolimitado (BHARTI *et al.*, 2003; MATHEW *et al.*, 2006).

A fase de convalescença pode durar cerca de 1 a 2 meses e durante este período alguns sintomas como febre, cefaléia, mialgia e mal-estar ainda estão muito presentes. A icterícia pode durar ainda por várias semanas, mas some lentamente (BRASIL, 2011).

Devido a diversos sintomas comuns a outras doenças, o diagnóstico da leptospirose é muito difícil, necessitando de pesquisas para novas ferramentas de diagnósticos, pois a identificação da doença no início evita que o paciente evolua para o quadro mais grave da doença. Os achados laboratoriais da leptospirose também são comuns a outras doenças, observando-se alterações como: trombocitopenia, leucocitose, elevação das bilirrubinas totais, aumento da uréia e creatinina, neutrofilia, entre outros (DAHER *et al.*, 2010a; BRASIL, 2011; WHO, 2011c).

1.2.5 Diagnóstico da leptospirose

O diagnóstico do paciente baseia-se no quadro clínico e epidemiológico, sendo confirmado posteriormente por testes laboratoriais, entretanto, o diagnóstico clínico pode ser bastante dificultoso devido à similaridade de sintomas com outras infecções (BRASIL, 2011). O método de escolha de diagnóstico depende em que estágio da infecção o paciente se encontra, ou seja, caso o mesmo esteja no início da infecção podem ser utilizados os testes para detecção da *Leptospira* sp. através da cultura ou testes moleculares. O teste de microaglutinação (MAT) é realizado na fase aguda e na fase tardia. Os testes de detecção de anticorpos são realizados apenas na fase tardia (BRASIL, 2011; DAHER *et al.*, 2010a).

Recentemente, para detecção do antígeno, tem-se utilizada a detecção do mesmo na urina através do dot blot ELISA (dot-ELISA), que usa o anticorpo monoclonal contra a 35-kDa (componente da leptospirose patogênica). É válido ressaltar, que este teste é utilizado para detectar o antígeno em pacientes que foram testados para detecção de IgM e que foram negativos (TOYOKAWA *et al.*, 2011). Entre os testes sorológicos, o teste ELISA-IgM é muito utilizado, mas infelizmente este teste, assim como os outros testes sorológicos, só permite a identificação da infecção a partir do 5º dia de sintomas (HONARMAND *et al.*, 2010). Apesar da sua facilidade de realização e baixo custo, o ELISA-IgM pode apresentar resultados falso-positivos. Atualmente, existem testes rápidos para detecção de anticorpos contra *Leptospira* sp., permitindo uma maior rapidez e facilidade para realização dos mesmos (BLACKSELL *et al.*, 2006b).

Na rotina laboratorial, geralmente o teste de escolha é o MAT. Este teste apresenta uma boa sensibilidade, entretanto, muitas vezes para a sua realização é necessário coletas de amostras de soro pareadas, atrasando desta forma o diagnóstico, além de ser uma técnica demorada. Ainda assim, o MAT permanece útil porque é o melhor teste para fornecer informações epidemiológicas, pois pode informar os sorovares da leptospirose em uma determinada população. Para uma melhor especificidade seria ideal utilizar a combinação do MAT com o ELISA-IgM, pois desta forma apresentaria um melhor resultado (LEVETT; WHITTINGTON, 1998; SHEKATKAR *et al.*, 2010; BRASIL, 2010).

O isolamento de *Leptospira* sp. também pode ser utilizado para detecção da infecção. Esta técnica tem como vantagem o fato de poder ser realizada na fase precoce da doença, é uma técnica específica e além de confirmar a infecção, a mesma ainda pode informar o tipo de sorovar que está acometendo o paciente. Contudo, esta ferramenta não é utilizada na rotina, pois é de alto custo, requer muito tempo para confirmar o resultado (cerca de 1 mês), uma vez

que resultado vai depender do crescimento da cultura e tem baixa sensibilidade (AHMAD *et al.*, 2005).

Muitos testes moleculares como dot-blot e hibridização *in situ* têm sido desenvolvidos com o intuito de confirmar a infecção na fase inicial, apesar de que entre eles a técnica da PCR consegue ser ainda mais sensível e mais rápida de ser realizada (AHMAD *et al.*, 2005). Vários protocolos de PCR têm sido propostos para aumentar a eficácia do teste (PEREZ; GOARANT, 2010; THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011) e diferentes amostras como, sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e amostras de tecido podem ser utilizadas para o isolamento do material genético. Recentemente, a PCR em tempo real tem sido introduzida nos laboratórios como uma ferramenta mais rápida e mais eficiente (TOYOKAWA *et al.*, 2011).

Apesar de existir uma quantidade considerável de testes de diagnóstico para leptospirose e dengue, o diagnóstico clínico ainda é muito confuso, pois os sintomas destas infecções são muito semelhantes, principalmente na fase inicial. A definição etiológica de casos de pacientes com síndrome febril aguda é fundamental para uma conduta clínica adequada e controle epidemiológico. Deste modo, este estudo visa auxiliar no diagnóstico de pacientes com síndrome febril aguda, através da detecção do vírus dengue e leptospirose nesses pacientes. Os testes laboratoriais para dengue e leptospirose são essenciais para a elucidação clínica e para as ações de vigilância epidemiológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o emprego de diferentes métodos para o diagnóstico laboratorial de dengue e leptospirose em pacientes com suspeita de dengue no Estado do Ceará.

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar a proteína NS1 através de ensaios de imunocromatografia e imunenzimáticos para o vírus dengue;
2. Realizar a sorotipagem do vírus dengue pela técnica RT-PCR;
3. Realizar ensaios imunocromatográficos de sorologia para dengue (IgM e IgG);
4. Realizar ensaios de ELISA para detecção de IgM e IgG anti-dengue;
5. Realizar ensaios imunocromatográficos de sorologia para leptospirose (IgM);
6. Detectar anticorpos IgM anti-Leptospira através do ELISA.

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal descritivo de etiologia febril em pacientes com síndrome febril aguda.

3.2 População de estudo

Os pacientes foram recrutados no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) e no Hospital Distrital Nossa Senhora da Conceição (HDNSC) durante o período de fevereiro a dezembro de 2010. Este estudo foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São José (nº do processo 064/2009) (ANEXO A e B). Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) e responderam a um questionário (APÊNDICE B).

Os pacientes que foram incluídos nesse estudo tinham que possuir os seguintes critérios:

- **Critérios de inclusão:** homens ou mulheres, com idade igual ou acima de 18 anos, apresentando quadro febril, associado à pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia e exantema e que estavam entre o 1º ao 5º dia de sintoma da doença.

Os pacientes que estavam hospitalizados e com suspeita clínica para dengue foram incluídos no estudo com mais de 5 dias de sintomas da doença.

- **Critérios de exclusão:** mulheres grávidas, pacientes menores de 18 anos e que apresentavam quadro febril a mais de 5 dias, mesmo com a presença dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia e exantema e pacientes que apresentaram qualquer contra-indicação para coleta de amostra de sangue.

3.3 Definição de caso de dengue

Com o intuito de criar um parâmetro de comparação entre as diferentes técnicas em estudo, foi utilizado o conceito de definição de caso de dengue adotado pelo Ministério da Saúde. Caso confirmado de dengue clássica é aquele em que o paciente apresenta uma doença febril aguda com duração máxima de 7 dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, prostração, exantema e confirmado laboratorialmente através de isolamento do vírus ou da sorologia positiva, consideradas padrão ouro pelo Ministério da Saúde. Caso confirmado de FHD: caso confirmado

laboratorialmente e com todos os critérios presentes a seguir: febre ou história de febre recente de sete dias, trombocitopenia ($50.000/\text{mm}^3$ ou menos), tendências hemorrágicas, evidenciadas por um ou mais dos seguintes sinais: prova do laço positiva, petéquias, equimoses, púrpuras, sangramentos de mucosas do trato gastrointestinal e outros, extravasamento de plasma devido ao aumento de permeabilidade capilar, manifestado por hematócrito apresentando aumento de 20% sobre o basal na admissão, queda do hematócrito em 20%, após o tratamento adequado, presença de derrame pleural, ascite e hipoproteïnemia. O caso de DCC é todo caso grave e que não apresenta critérios para ser classificada como FHD, e, possui um elevado grau de risco insatisfatório para ser designado como DC. A apresentação de pelo menos um dos seguintes sinais clínicos é suficiente para a confirmação de DCC, como 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 $\leq 1.000/\text{mm}^3$.

3.4 Coleta do material

As amostras de sangue de cada paciente foram coletadas em tubo sem anticoagulante e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina – UFC. Foram coletados 10 ml de sangue periférico de cada indivíduo, utilizando-se tubos vacutainer. Esta coleta foi realizada em dois momentos, sendo a primeira realizada entre 1º ao 5º dia de febre com o objetivo de detecção do vírus dengue e a segunda coleta realizada entre 3º ao 7º dia de sintomas, objetivando-se a análise de anticorpos contra o vírus dengue. Após serem empregadas as técnicas de diagnóstico para dengue, testes para detecção de anti-leptospira foram realizados nas amostras coletadas entre o 3º ao 7º dia de sintomas.

3.5 Processamento das amostras

As amostras foram processadas assim que chegaram ao laboratório. O sangue foi submetido à uma centrifugação de 1.500 xg por 5 minutos, para a obtenção do soro. As amostras de soro foram estocadas a -70°C e posteriormente submetidas aos testes de diagnósticos.

O processamento das amostras foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, (primeira coleta: 1º ao 5º dia de sintomas) os soros dos pacientes suspeitos de dengue foram testados para a detecção da proteína NS1 através do ensaio de imunocromatografia e de ELISA, sorotipagem do vírus através da RT-PCR e detecção de anticorpos da classe IgG pelo

teste imunoenzimático. As amostras de soro dos mesmos pacientes coletadas a partir do 3º dia da doença (2º coleta), foram testadas para detecção de IgM e IgG anti-dengue através de ensaios imunocromatográficos, detecção de IgM pelo teste de ELISA. Após a realização do diagnóstico de dengue, todas as amostras coletadas no segundo momento, foram testadas para detecção de IgM anti-leptospirose (Figura 8).

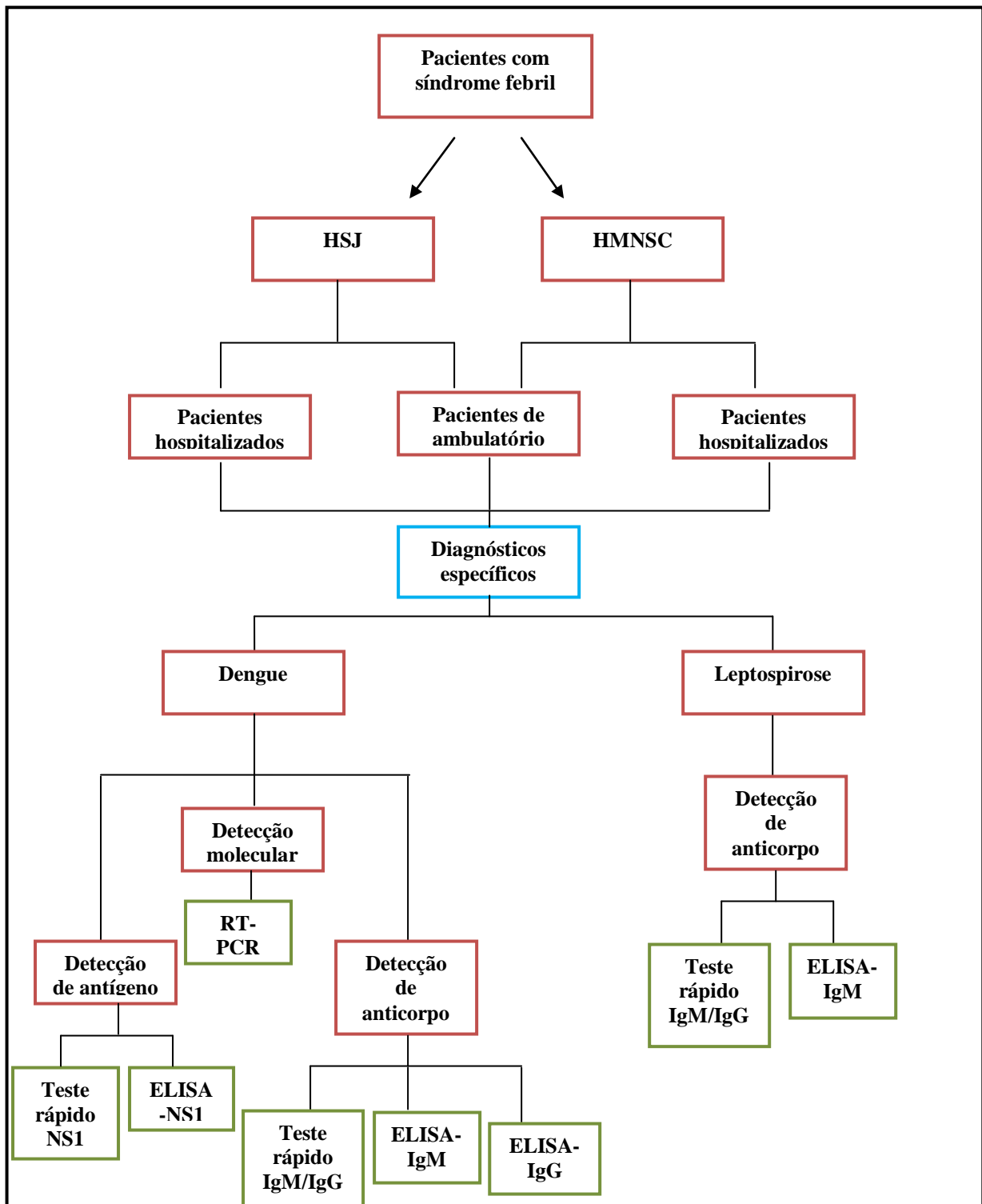


Figura 8. Fluxograma dos diagnósticos realizados nos pacientes com síndrome febril aguda, atendidos no ambulatório e pacientes hospitalizados acolhidos nos hospitais HSJ e HMNSC.

3.5.1 Teste imunocromatográfico NS1 Ag STRIP

O teste dengue NS1 Ag STRIP (Bio-Rad Laboratories, França) permite a detecção qualitativa da proteína NS1 do vírus dengue no soro ou no plasma humano. É um teste descartável, que utiliza a imunocromatografia de fluxo lateral. Este teste foi realizado segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, 50 µl do soro do paciente foram depositados em um tubo de vidro utilizando o conta-gotas fornecido pelo teste, e em seguida, foi adicionado ao soro 1 (uma) gota de tampão de migração e em seguida a fita era colocada no tubo na posição vertical. A fita permanecia no tubo durante 15 minutos e após o término do tempo, o resultado foi interpretado.

3.5.2 ELISA NS1

Este diagnóstico foi realizado utilizando um kit comercializado pela Bioeasy (Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 50 µL de diluente de amostra (salina tamponada fosfata, BSA e estabilizadores) foram depositados em cada cavidade da microplaca. Em seguida, 50 µL de controle negativo, controle positivo e amostra de soro dos pacientes foram adicionados à placa. Depois de homogeneizado, a placa foi incubada por 60 minutos. Em seguida, 25 mL da solução de lavagem foram diluídas em 475 mL de água destilada. Após o período de incubação, as cavidades da placa foram lavadas cinco vezes com 350 µL da solução de lavagem diluída. Após a lavagem, a enzima do conjugado foi diluída na proporção 1/101 com o diluente conjugado, ou seja, utilizou-se 0,1 mL da enzima conjugada mais 10 mL do diluente conjugado (salina tamponada fosfatada, BSA e estabilizadores) e foram adicionados 100 µL desta reação nas cavidades da placa, e, em seguida, a placa foi incubada durante 60 minutos. Após a incubação, a placa foi lavada como já descrito. Seguindo a lavagem, 5 mL do substrato TMB A (acetato de sódio, peróxido de hidrogênio e gentamicina) foi adicionado a 5mL do substrato TMB B (tetrametilbenzidina com ácido clorídrico) e posteriormente, 100 µL desta reação foram adicionados à placa e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, formando uma coloração azulada. Após a incubação foram adicionados 100 µL da solução de parada nos poços e a cor azul mudou para amarelo. A absorbância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm e filtro de referência de 620 nm. O cut-off foi calculado de acordo com a absorbância média dos controles negativos adicionando-se 0,300. As amostras com valores menores que o cut-off foram consideradas não reagente para Ag NS1 dengue, enquanto amostras com valores iguais ou maiores que o cut-off foram consideradas reagentes.

3.5.3 Extração do RNA viral

A extração do material genético foi realizada através da utilização do Kit QIAamp[®] Viral RNA (QIAGEN[®], Califórnia, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O QIAamp[®] Viral RNA proporciona o isolamento de moléculas de RNA viral com mais de 200 nucleotídeos de extensão, utilizando uma membrana sílica-gel de alta afinidade. Primeiramente, 140 µl de soro de cada paciente foram adicionados a 560 µl do tampão AVL, permitindo desta forma a lise da membrana das células. Em seguida, esta solução foi homogeneizada no vórtex durante 15 segundos e posteriormente incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esta etapa de lise, foram adicionados 560 µl de etanol absoluto e homogeneizado no vórtex durante 15 segundos. Em seguida, esse material foi transferido para a coluna sílica-gel de alta afinidade para RNA e submetida a uma centrifugação de 6.000 xg por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e foram realizadas duas lavagens seguidas da coluna com 500 µl das soluções AW1 e AW2, respectivamente, sendo centrifugados a 6.000 xg durante 1 minuto e 20.000 xg por 3 minutos. Após esta etapa de lavagem o RNA que ficou ligado na membrana sílica-gel foi eluído da coluna através da adição de 60 µl da solução tampão AVE por meio de uma centrifugação de 6.000 xg por 2 minutos. Após o término desta etapa, o RNA extraído foi utilizado para a realização das reações de RT-PCR.

3.5.4 Detecção molecular do vírus dengue

A identificação da infecção viral a partir do método molecular foi realizada através do Kit QIAGEN[®] OneStep RT-PCR (QIAGEN[®], Califórnia, USA) que contém enzimas Omniscrypt e Sensiscrypt que permitem a transcrição reversa, e a HotStarTaq- que é responsável pela amplificação do material genético. Para a identificação do vírus foi utilizada a metodologia adaptada de Lanciotti *et al* (1992), no qual é uma técnica de RT-PCR multiplex que permite a detecção dos quatro sorotipos do vírus. Para realização desta reação foram utilizados cinco oligonucleotídeos, sendo um oligonucleotídeo 5' destinado a detecção de uma região do capsídeo presente em todos os quatro sorotipos e quatro oligonucleotídeos 3' complementar às sequências específicas de cada sorotipo. Devido a utilização destes oligonucleotídeos a distinção dos sorotipos foi observada em consequência dos diferentes fragmentos produzidos durante a reação (Tabela 1).

Tabela1. Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos sorotipos de dengue (Lanciotti *et al.*,1992).

Oligonucleotídeos	Sequência	Tamanho do fragmento esperado
D1	5' TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG 3'	
TS1	5' CGTCTCAGTGATCCGGGGG 3'	482 (D1 e TS1)
TS2	5' CGCCACAAGGGCCATGAACAG 3'	119 (D1 e TS2)
TS3	5' TAACATCATCATGAGACAGAGC 3'	290 (D1 e TS3)
TS4	5' CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA 3'	392 (D1 e TS4)

A reação de RT-PCR foi realizada com um volume final de 25 µL, sendo 4 µl da solução tampão One-Step RT-PCR (Tris·Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12.5 mM MgCl₂, DTT; pH 8.7), 0,8 µl de dNTPs (10mM), 0,5 µl de cada oligonucleotídeo (20 pmol), 0,25µl da mistura de enzimas (QIAGEN One-Step RT-PCR Enzyme Mix), 5µl (2 µg) do RNA extraído do soro e água destilada para completar o volume final da reação.

A amplificação foi realizada através de 50°C por 30 minutos e 95°C por 15 minutos para que ocorresse a transcrição reversa, seguida por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Para extensão, a etapa final da reação foi de 72°C por 10 minutos.

Para a visualização dos fragmentos, foram utilizados 10 µl do produto da reação de RT-PCR, 3µl do tampão de corrida e 2 µl do corante Gel RedTM foram submetidos à eletroforese horizontal (60V/1 hora) em gel de agarose (SIGMA, St. Louis, EUA). Em seguida o gel foi visualizado à luz ultravioleta e analisado através do equipamento FluorChem FC2[®] (Alpha Innotech, San Leandro, EUA).

3.5.5 Teste imunocromatográfico dengue duo test bioeasy

O teste dengue duo test bioeasy é um imunoenensaio qualitativo que permite a detecção simultânea do antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG de dengue em amostras de soro, plasma ou sangue total humano. O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Bioeasy, Brasil). Resumidamente, foi coletado o soro de cada paciente a partir do

3º dia de sintoma da doença (2º coleta). Desse soro, foi retirado 10µl e aplicado no dispositivo do teste com o auxílio de uma micropipeta, e em seguida, foram adicionadas 4 gotas (cerca de 90 a 120µl) de tampão diluente. Após 20 minutos o resultado foi interpretado.

3.5.6 ELISA dengue IgM

Esta técnica foi realizada utilizando uma placa de teste comercializada pela Bioeasy (Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os soros, os controles positivos e controles negativos foram diluídos na proporção de 1/100 em diluente. Cem microlitros dos controles e das amostras dos pacientes foram adicionadas nas cavidades da placa e esta foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos. Após a incubação, a placa foi lavada 5 vezes com a solução de lavagem e em seguida, foram adicionados 100 µL da solução (anti-dengue HRP + antígeno diluído) e esta, permaneceu incubada por 60 minutos. Posterior à incubação, os poços foram lavados novamente seguido da adição de 100 µL do substrato TMB e incubados por 10 minutos, formando uma coloração azulada. Após a incubação, foram adicionados 100 µL da solução de parada nos poços. A absorbância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm e filtro de referência de 620 nm. O cut-off foi calculado de acordo com a absorbância média dos controles negativos adicionando-se 0,300. As amostras com valores menores que o cut-off foram consideradas não reagente para IgM anti-dengue, enquanto amostras com valores iguais ou maiores que o cut-off foram consideradas reagentes.

3.5.7 ELISA dengue IgG

O ELISA dengue IgG (Bioeasy, Brasil) foi realizado para determinar a presença de anticorpos IgG anti-dengue em pacientes com suspeita clínica da doença. Em resumo, os soros, os controles positivos e os controles negativos foram diluídos na proporção de 1/100 em diluente. Cem microlitros dos controles positivos e das amostras dos pacientes foram adicionadas nas cavidades da placa e esta foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos. Após a incubação, as cavidades foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem e em seguida, foram adicionados 100 µL da solução (anti-dengue HRP + antígeno dengue diluído) e esta permaneceu incubada por 60 minutos. Em seguida, os poços foram lavados e foram adicionados 100 µL do substrato TMB e incubados por 10 minutos para a formação da cor azul. Após a incubação, foram adicionados 100 µL da solução de parada nos poços. A absorbância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm e filtro de referência de 620 nm.

Os valores do cut-off foram calculados da mesma A absorbância foi lida à um comprimento de onda de 450 nm e filtro de referência de 620 nm. Os valores do cut-off foram calculados da mesma forma descrita para ELISA IgM.

3.5.8 Teste imunocromatográfico leptospirose IgG/IgM test Bioeasy

O teste leptospirose IgG/IgM test bioeasy é um teste imunocromatográfico de fase sólida para a detecção qualitativa de anticorpos da classe IgG e IgM de *L. interrogans* no soro ou no plasma humano. Para a realização deste procedimento foram seguidas as recomendações do fabricante. Em resumo, 5µl de soro foram adicionados ao dispositivo e em seguida 4 gotas do tampão diluente foram adicionadas. O resultado foi interpretado após 20 minutos.

3.5.9 ELISA leptospira IgM

A reação foi realizada utilizando uma placa de teste comercializada pela PanBio[®] (Austrália) para a detecção qualitativa de anticorpos da classe IgM para *Leptospira* em soro humano. Resumidamente, as amostras de soro, calibradores, controles positivos e negativos foram diluídos em uma concentração de 1/100. Em cada poço, foram aplicados 100µL de soros, dos controles e dos calibradores diluídos e foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período, os respectivos poços foram lavados por seis vezes com tampão de lavagem. Posterior a lavagem, foram adicionados 100µL do conjugado HRP anti-humano IgM e este foi incubado por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, ocorreu outra lavagem por seis vezes com o tampão. Após a última lavagem com o tampão, foi adicionado o substrato TMB (tetrametilbenzidina) que demonstra os soros positivos pelo desenvolvimento de uma coloração azulada resultante da ação da peroxidase no substrato. Essa solução foi incubada por mais 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100µL da solução de parada. A leitura da microplaca foi realizada em espectrofotômetro, com um comprimento de onda de 450nm e filtro de referência de 600-650nm. Todas as amostras de soro com um valor índice maior que 1,1 foram consideradas positivas, enquanto as amostras menores que 0,9 foram negativas. Os valores entre 0,9 e 1,1 foram considerados indeterminados. O valor do *cut-off* foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

Valor de *cut-off* = densidade óptica média da triplicata do calibrador X fator de calibração.

$$\text{Valor índice} = \frac{\text{Valor da absorbância da amostra}}{\text{Valor } \textit{cut-off}}$$

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos epidemiológicos dos pacientes recrutados

No período entre fevereiro a dezembro de 2010, 93 pacientes com síndrome febril foram recrutados para a participação do estudo. Entretanto, sete pacientes foram excluídos do estudo, dois pacientes por serem menores de 18 anos, e cinco pacientes, que eram de ambulatório e tinham mais de sete dias de sintomas. As amostras de soro dos 86 pacientes restantes foram encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Dentre estes, 52 pacientes foram recrutados no ambulatório (35 do HSJ e 17 do HMNSC) e 34 pacientes foram provenientes da enfermaria (23 do HSJ e 11 do HMNSC) (Figura 9). Dos 86 pacientes, 48 (55,8%) foram positivos para dengue em pelo menos um dos testes específicos realizados (Tabela 2).

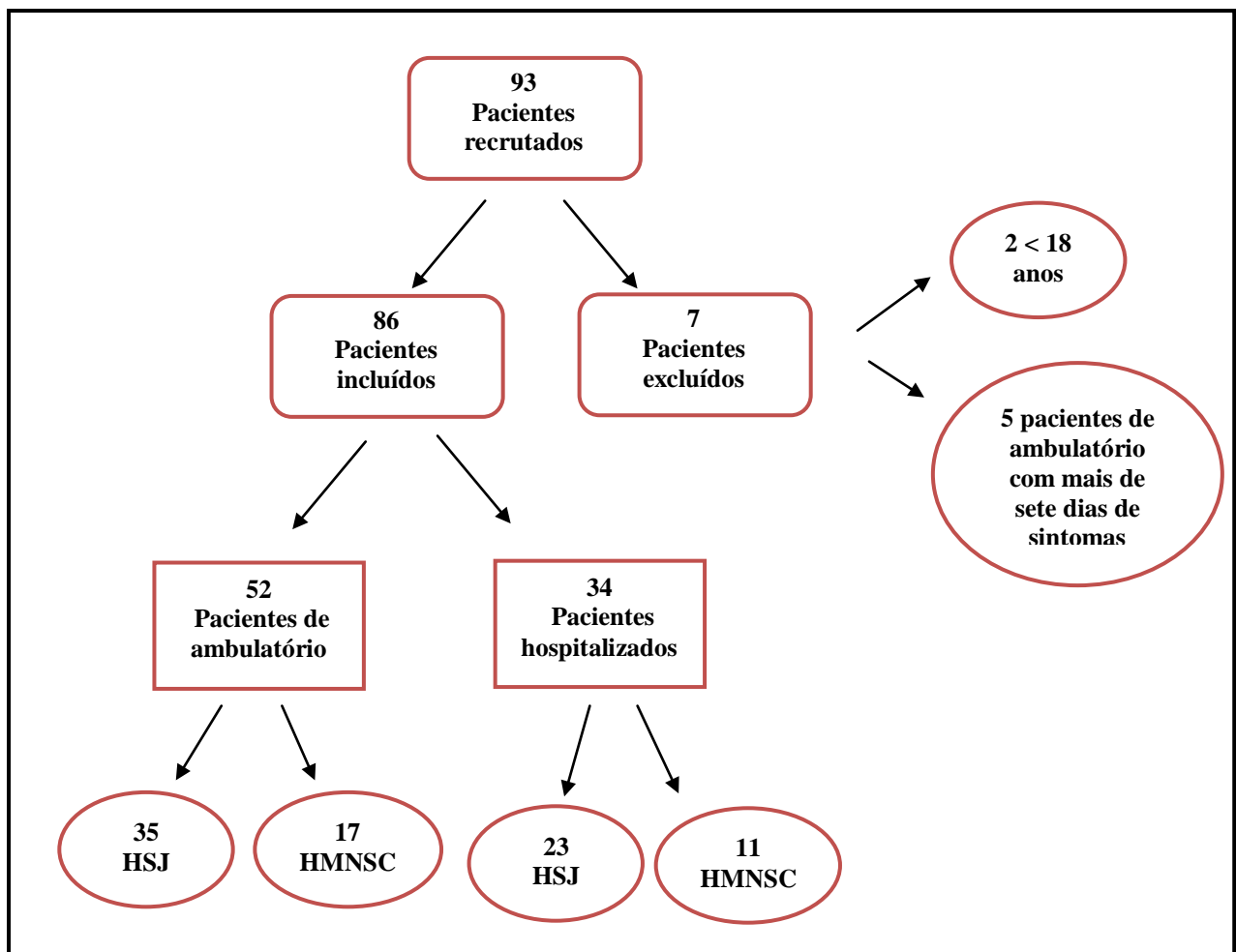


Figura 9. Fluxograma dos pacientes incluídos e excluídos no estudo.

Tabela 2. Testes diagnósticos realizados em 86 pacientes e os respectivos pacientes positivos para cada um dos testes para dengue.

Técnicas empregadas para o diagnóstico de dengue (n=86)	Número de pacientes positivos (n=48)
NS1 imunocromatográfico, ELISA-NS1, ELISA-IgM, teste imunocromatográfico IgM e RT-PCR	4
NS1 imunocromatográfico, ELISA-NS1, ELISA-IgM e teste imunocromatográfico IgM	9
ELISA-NS1, ELISA-IgM e teste imunocromatográfico IgM	4
ELISA-NS1, ELISA-IgM, teste imunocromatográfico IgM e RT-PCR	2
ELISA-IgM, teste imunocromatográfico IgM e RT-PCR	3
ELISA-IgM e teste imunocromatográfico IgM	13
Teste imunocromatográfico IgM e RT-PCR	1
ELISA-NS1 e RT-PCR	1
Somente ELISA-IgM	3
Somente ELISA-NS1	3
Somente RT-PCR	5

Neste estudo foi observado a presença da doença durante todo o ano, com um predomínio nos meses de junho, julho e agosto (Figura 10).

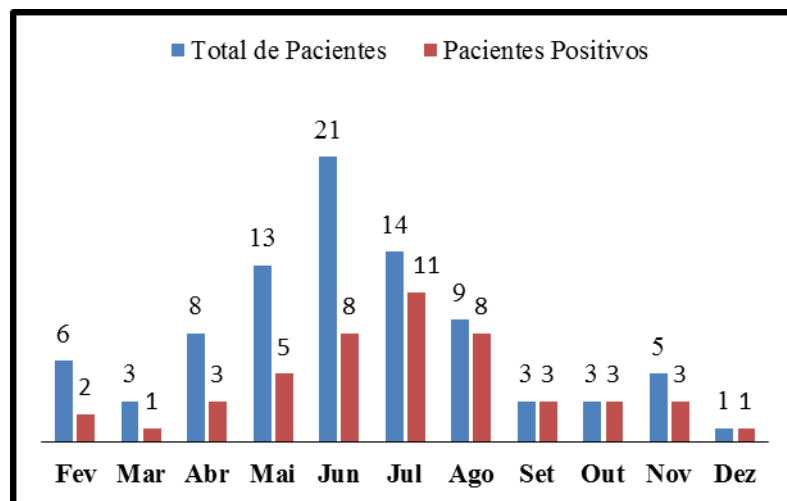


Figura 10. Gráfico de distribuição mensal dos pacientes recrutados e dos pacientes positivos para dengue.

A média de idade entre os pacientes positivos foi de aproximadamente 36 anos. Os pacientes que possuíam entre 18 a 28 anos foram os que mais tiveram a doença confirmada (Figura 11).

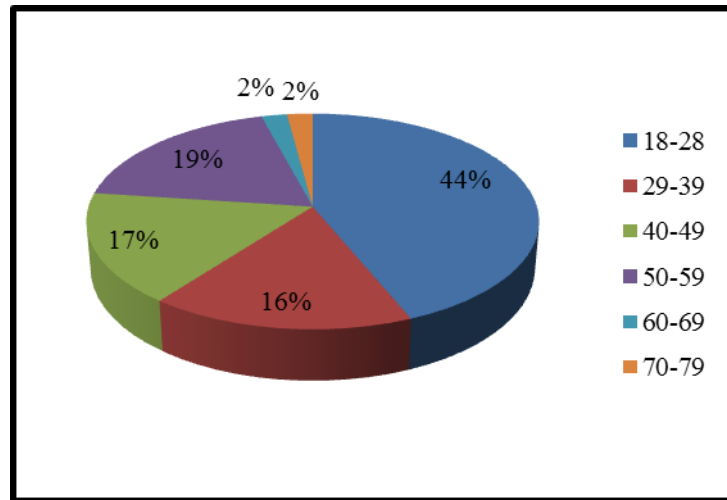


Figura 11. Gráfico de distribuição percentual da idade dos pacientes positivos para dengue

Dentre os pacientes que foram positivos para dengue em pelo menos um dos testes de diagnóstico específico, 48% pertenciam ao sexo masculino e 52% ao sexo feminino (Tabela 3).

Tabela 3. Diagnóstico de dengue e distribuição por sexo dos pacientes.

Gênero	Dengue	Dengue
	positivo	negativo
	N (%)	N(%)
Masculino	23 (48%)	20 (52,6%)
Feminino	25 (52%)	18 (47,4%)
Total	48 (100%)	38 (100%)

4.2 Pacientes de ambulatório

4.2.1 Detecção da glicoproteína NS1 pelo teste imunocromatográfico

Cinquenta e duas amostras de soro referentes a 52 pacientes foram avaliadas para a detecção da glicoproteína NS1 (Figura 12). Dos 52 pacientes, 11 (21,1%) foram positivos. Este teste foi realizado em pacientes que se encontravam entre o 1º ao 5º dia de infecção (Figura 13).

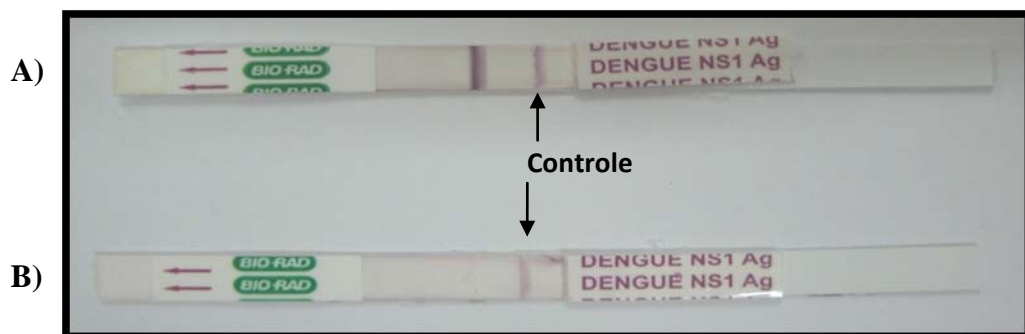


Figura 12. Teste imunocromatográfico NS1 Ag STRIP. A) Teste positivo; B) Teste negativo.

4.2.2 Detecção da glicoproteína NS1 pelo método ELISA

Dentre os 52 pacientes de ambulatório avaliados e que estavam entre o 1º e o 5º dia de infecção, 14 (26,9%) foram positivos através deste teste (Figura 13).

4.2.3 Detecção molecular do vírus dengue

A detecção do RNA viral foi possível em 6 pacientes (10,9%) dentre os 52 pacientes de ambulatório. Para a detecção do material genético do vírus foram utilizadas as amostras de soro coletadas no início da infecção do 1º ao 5º dia de sintomas (Figura 13).

Os sorotipos encontrados entre os pacientes de ambulatórios foram: DENV-1 e DENV-2, sendo o sorotipo dois o mais frequente entre os 5 pacientes positivos pelo RT-PCR, enquanto DENV-1 foi identificado em apenas um paciente (Figura 19).

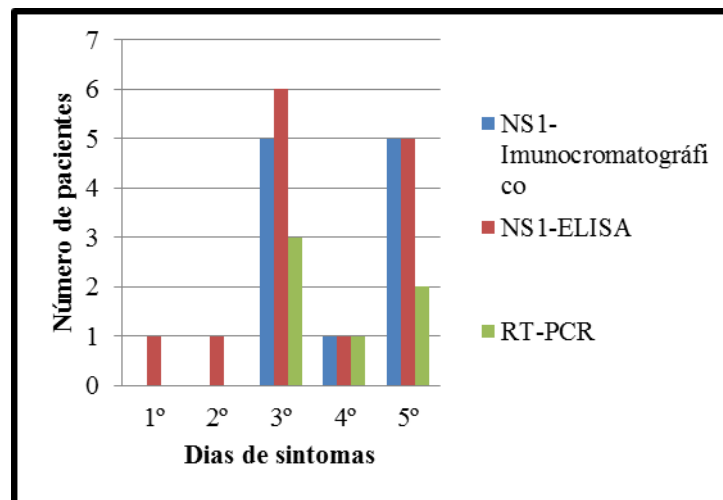


Figura 13. Gráfico dos pacientes de ambulatório positivos para dengue através dos testes NS1 imunocromatográfico, ELISA-NS1 e RT-PCR em comparação com o tempo após o início de

4.2.4 Teste ELISA IgG dengue

O teste de ELISA IgG dengue foi realizado nas amostras coletadas entre 1º ao 5º dia de sintoma. Um paciente não foi avaliado, pois não tinha mais amostra de soro, assim, somente 51 pacientes foram avaliados. Desses, 39 (76,4%) pacientes foram positivos e 12 (23,5%) foram negativos para este teste.

4.2.5 Teste imunocromatográfico dengue duo test bioeasy

As amostras utilizadas para detecção dos anticorpos foram àquelas coletadas a partir do 3º dia de infecção. Dentre os 52 pacientes de ambulatório, 12 não retornaram para a realização da segunda coleta, portanto o teste imunocromatográfico foi realizado em 40 pacientes. Dezenove (47,5%) pacientes foram positivos para IgM através deste teste e encontravam-se entre o 3º e o 11º dia de infecção por dengue. Em relação à detecção de IgG, 17 (42,5%) pacientes tiveram este anticorpo identificado (Tabela 4) (Figura 14).

Tabela 4. Número de pacientes de ambulatório positivos para o teste imunocromatográfico IgM e IgG.

Teste imunocromatográfico dengue duo-IgM e IgG		
Número de pacientes de ambulatório (N=40)	IgM	IgG
	19 (47,5%)	17 (42,5%)

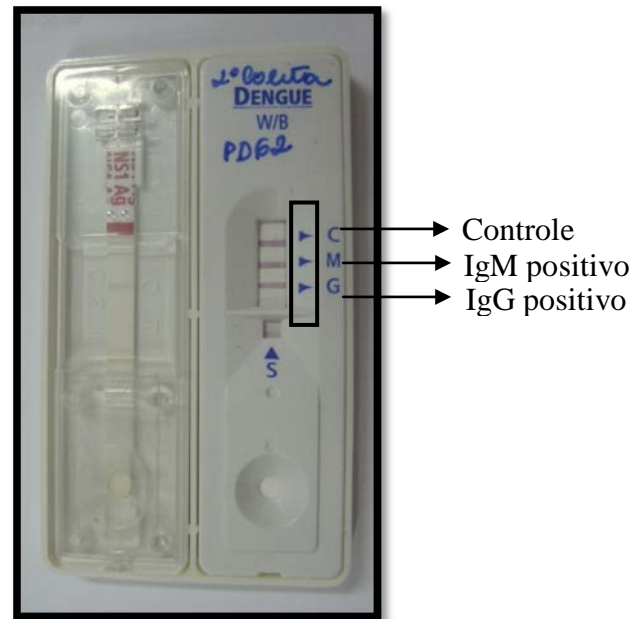


Figura 14. Teste imunocromatográfico dengue duo - IgM e IgG. C (controle), M (IgM) e G (IgG).

4.2.6 Teste ELISA IgM dengue

Dentre os 40 pacientes, 39 pacientes foram avaliados para detecção de IgM pelo teste de ELISA (Figura 15). Uma amostra não foi testada porque não havia mais soro. Dos 39 pacientes, 22 (56,4%) pacientes foram positivos e os mesmos estavam também entre o 3º e o 11º dia de infecção (Figura 16). Seis pacientes foram positivos na detecção de IgM e negativos para detecção de IgG, indicando uma possível infecção primária. Enquanto, 16 foram positivos para IgM e para IgG indicando infecção secundária (Figura 17).

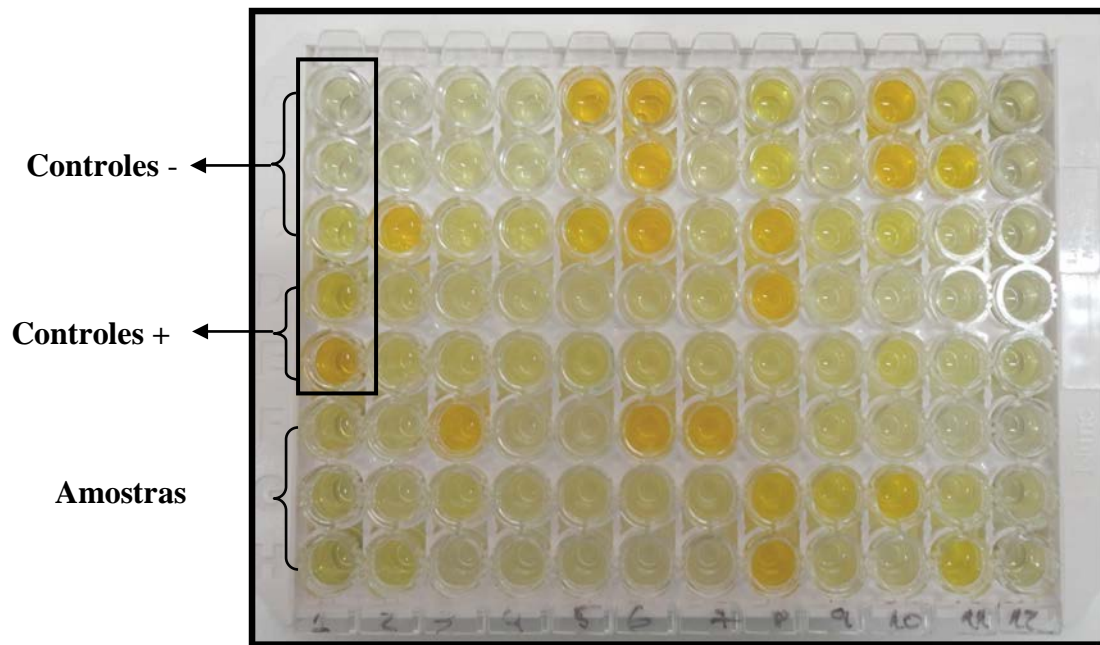


Figura 15. Placa do teste imunoenzimático (ELISA). Kit ELISA dengue IgM Bioeasy®

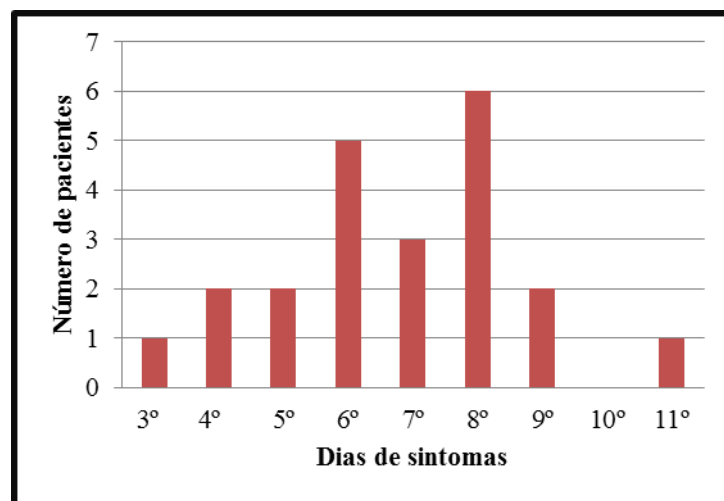


Figura 16. Gráfico de pacientes de ambulatório positivos para dengue através da detecção do anticorpo anti-dengue IgM pelo teste ELISA em comparação com o tempo após o início de sintomas.

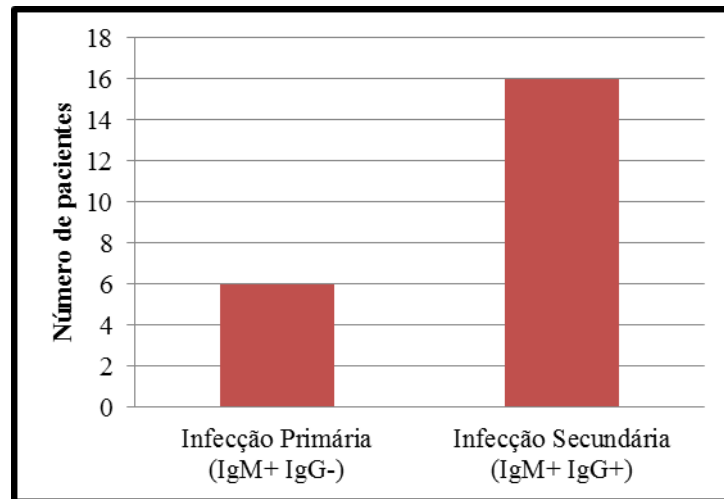


Figura 17. Gráfico de pacientes positivos para dengue atendidos no ambulatório e apresentando uma possível infecção primária ou infecção secundária.

4.3 Pacientes Hospitalizados

4.3.1 Detecção da glicoproteína NS1 pelo teste imunocromatográfico

Trinta e quatro pacientes hospitalizados foram incluídos no estudo. Estes se encontravam entre o 2º ao 10º dia de infecção. Destes, 3 (8,8%) pacientes foram positivos para a presença da glicoproteína NS1 (Figura 18).

4.3.2 Detecção da glicoproteína NS1 pelo método ELISA

Dentre os 34 pacientes hospitalizados, 9 (26,4%) foram positivos pelo ELISA-NS1. Os pacientes positivos encontravam-se entre o 3º e o 7º dia de sintomas (Figura 18).

4.3.3 Detecção molecular do vírus dengue

O diagnóstico através da RT-PCR também foi realizado nos pacientes internados. Dos 34 pacientes hospitalizados, 10 (29,4%) foram positivos (Figura 18). Estes pacientes estavam entre o 2º e o 10º dia de infecção.

Os sorotipos identificados dentre os pacientes hospitalizados foram o DENV-2 e o DENV-3. Em 9 pacientes foram detectados o sorotipo 2, enquanto o sorotipo 3 foi detectado em apenas 1 paciente (Figura 19).

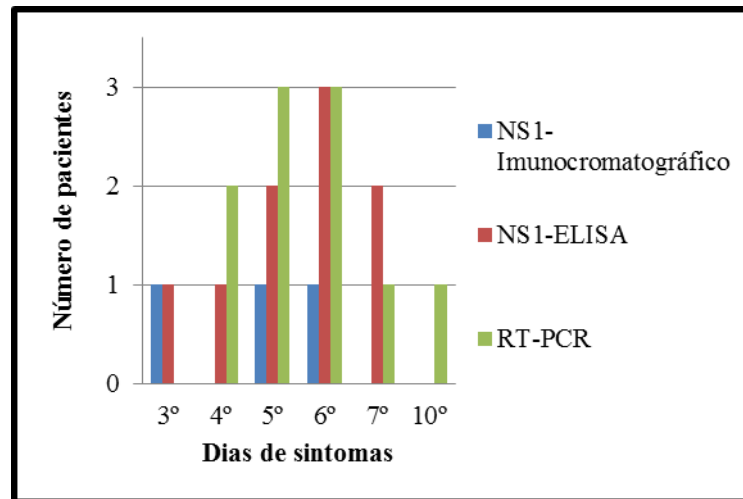


Figura 18. Gráfico dos pacientes hospitalizados positivos para dengue através da detecção da NS1 pelo teste imunocromatográfico, ELISA-NS1 e do RNA viral em comparação com o tempo após o início de sintomas.

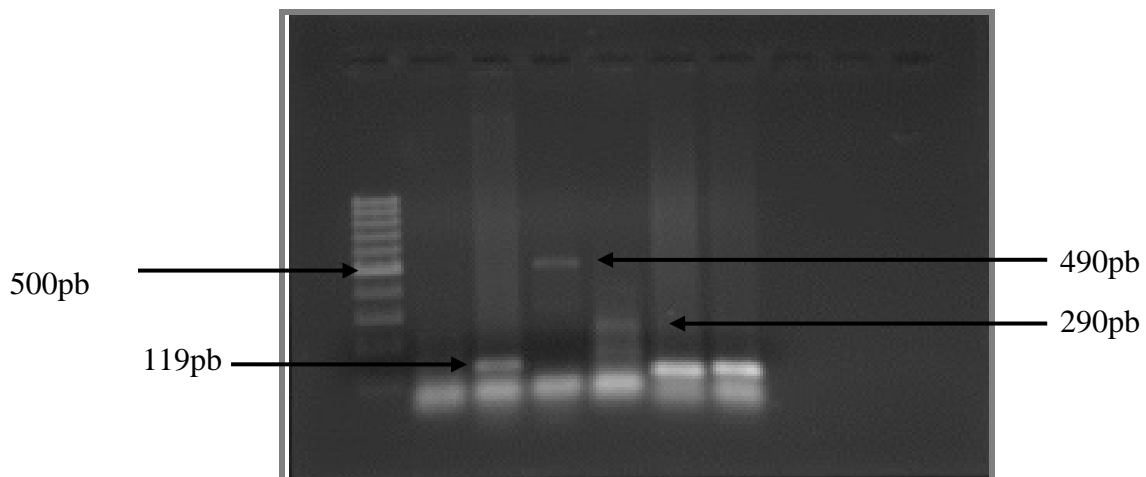


Figura 19. Identificação dos produtos de RT-PCR para sorotipagem de dengue por eletroforese em gel de agarose a 2%. M) Marcador de peso molecular de 100pb; 1) Controle negativo. 2) Controle positivo DENV-2. 3) Amostra do paciente de ambulatório positivo para DENV-1. 4) Amostra do paciente hospitalizado positiva para DENV-3. 5) e 6) Amostras de pacientes hospitalizados positivas para DENV-2.

4.3.4 Teste ELISA IgG dengue

Dentre os 34 pacientes hospitalizados, 27 (79,4%) foram positivos para detecção do anticorpo IgG anti-dengue.

4.3.5 Teste imunocromatográfico dengue duo test bioeasy

O teste rápido IgM e IgG foi realizado nas amostras coletadas dos pacientes hospitalizados entre um intervalo de dois a três dias após a primeira coleta, no qual foram realizados os testes NS1, RT-PCR e ELISA-IgG. No entanto, 5 pacientes foram transferidos de hospital e 1 paciente evoluiu a óbito. Contudo, este teste foi realizado em 28 pacientes, sendo que 17 (60,7%) pacientes foram positivos para IgM e 22 (78,5%) para IgG (Tabela 5).

Tabela 5. Número de pacientes hospitalizados positivos para o teste imunocromatográfico IgM e IgG.

Teste Imunocromatográfico dengue duo-IgM e IgG		
Número de pacientes internados (N=28)	IgM	IgG
		17 (60,7%)

4.3.6 Teste ELISA IgM dengue

Dentre os 28 pacientes hospitalizados, 16 (57,1%) foram positivos e 12 (42,8%) negativos. Os pacientes positivos estavam entre o 5º e o 11º dia de sintomas (Figura 20). Um paciente foi positivo na detecção de IgM e negativo para detecção de IgG, indicando uma possível infecção primária, enquanto 15 dos 28 pacientes internados foram positivos para IgM e para IgG indicando uma infecção secundária (Figura 21).

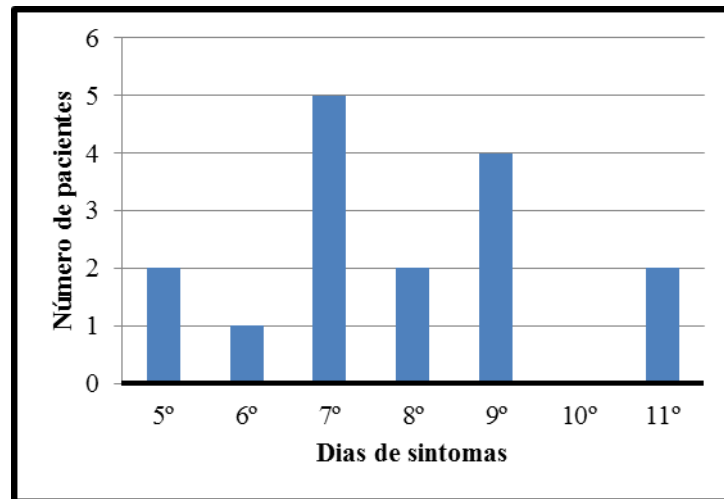


Figura 20. Gráfico dos pacientes hospitalizados positivos para dengue através da detecção de IgM pelo teste imunoenzimático ELISA.

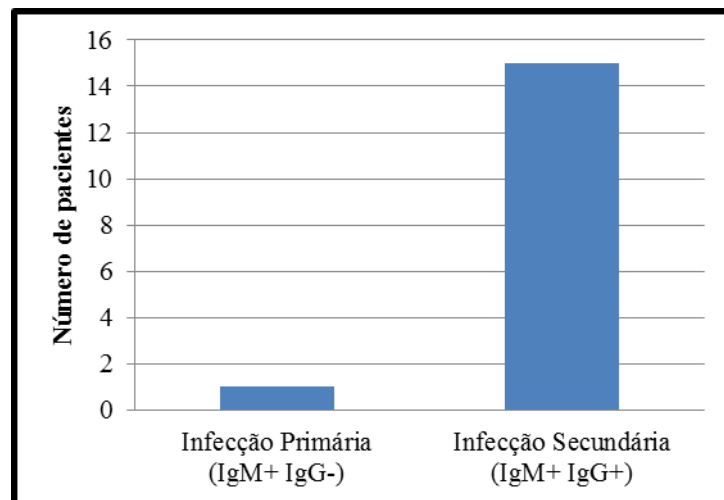


Figura 21. Gráfico dos pacientes positivos para dengue que estavam hospitalizados e que tinham uma possível infecção primária ou infecção secundária.

4.4 Pacientes testados para leptospirose

Após serem aplicados todos os testes diagnósticos para pesquisa de dengue, os pacientes foram avaliados para detecção de leptospirose. As amostras utilizadas foram coletadas no retorno dos pacientes, ou seja, a partir do 3º dia de infecção. Os 68 pacientes avaliados primeiramente para dengue foram avaliados posteriormente para leptospirose e 5 (7,3%) foram positivos para *Leptospira* através do teste de ELISA. O teste imunocromatográfico foi realizado apenas nos pacientes negativos para dengue (41 pacientes) e apenas 1 (2,4%) positivo pelo teste imunocromatográfico.

De acordo com a distribuição dos sexos, 3 (60%) eram do sexo feminino e 2 (40%) masculino e com média de idade de 32,4 anos (Tabela 6). As amostras positivas foram coletadas entre os meses de fevereiro a junho (Figura 22).

Tabela 6. Correlação entre a positividade dos testes, dias de sintomas e características epidemiológicas dos pacientes. (*) Pacientes internados.

Paciente	Sexo	Idade	Dias de Sintomas	Teste imunocromatográfico	Teste de ELISA
VMA	F	34	8 dias	-	+
VPL*	M	34	6 dias	+	+
JBS	F	31	6 dias	-	+
HVH*	M	21	7 dias	-	+
MLS*	F	42	7 dias	-	+

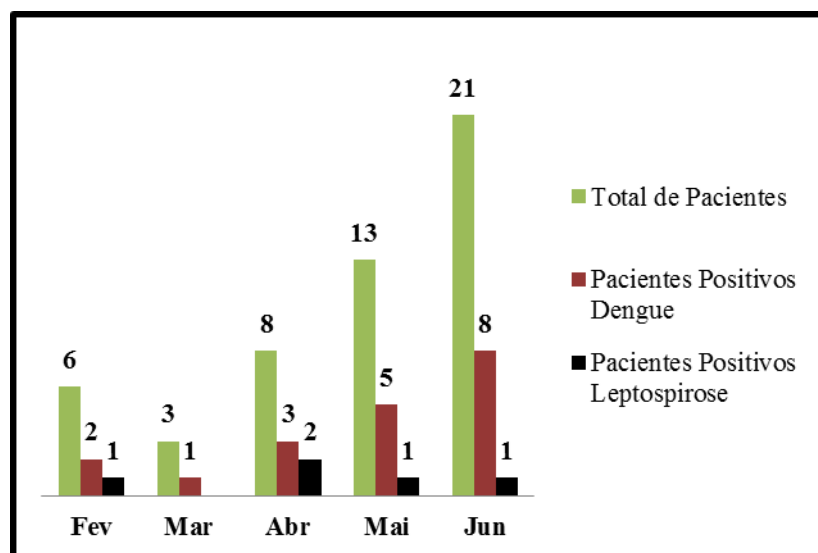


Figura 22. Gráfico de distribuição mensal dos pacientes recrutados e dos que foram positivos para dengue e para leptospirose.

4.4.1 Teste imunocromatográfico *Leptospira* (Bioeasy®)

Os sessenta e oito pacientes que foram avaliados inicialmente para dengue e que tinham a segunda coleta, foram avaliados para a presença de anticorpo IgM anti-leptospira através do ensaio imunocromatográfico *Leptospira* (Bioeasy®). Através desta técnica apenas 1 (1,47%) foi positivo (Figura 23).

4.4.2 Teste ELISA IgM Leptospirose

Os mesmos pacientes avaliados para o teste imunocromatográfico, também foram avaliados para pesquisa de IgM anti-leptospira, pelo teste imunoenzimático ELISA. Cinco (7,35%) pacientes apresentaram positividade para este teste diagnóstico. Estes pacientes encontravam-se entre o 6º ao 8º dias de sintomas (Figura 23). Dentre estes 5 pacientes positivos, 3 estavam internados.

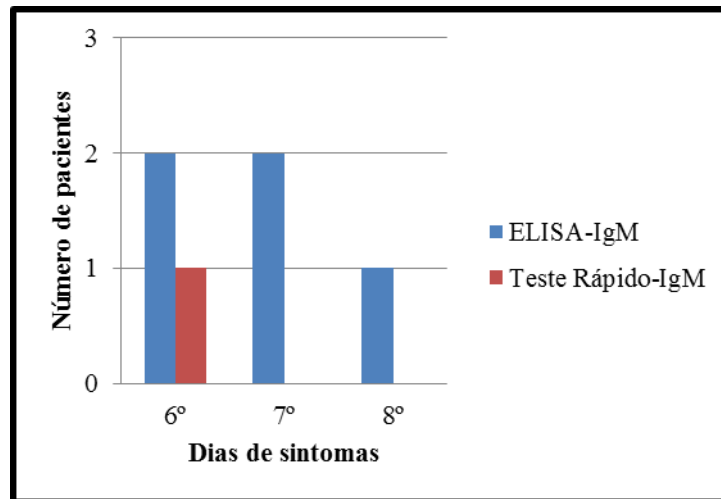


Figura 23. Gráfico dos pacientes positivos para leptospirose através da detecção de IgM anti-leptospira em comparação com o tempo após o início de sintomas.

4.4.3 Sinais e sintomas semelhantes entre os pacientes positivos para dengue e leptospirose

Os sintomas mais comuns dos pacientes positivos para dengue foram: 43 (89,5%) cefaleia, 41 (85,4%) mialgia, 31 (64,5%) artralgia, 27 (56,2%) prostração, 26 (53%) exantema e 24 (50%) dor retro-orbitária. Os pacientes positivos para leptospirose apresentaram: 5 (100%) prostração, 4 (80%) cefaleia, 4 (80%) mialgia, 3(60%) artralgia, 2 (40%) dor retro-orbitária e 1 (20%) exantema (Figura 24).

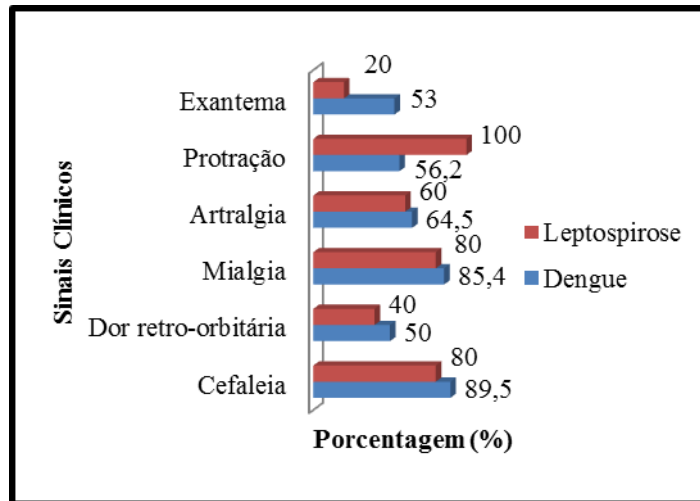


Figura 24. Gráfico ilustrativo com os sinais e sintomas similares aos pacientes positivos para dengue e para leptospirose.

Outros sinais frequentes nos pacientes positivos para dengue foram: 35 (72,9%) anorexia, 25 (52%) náuseas, 23 (47,9%) vômitos, 14 (35,4%) prurido, 13 (27%) diarreia e 13 (27%) tosse. Outros sintomas como expectoração, edema, dispnéia, dor abdominal e dor epigástrica também foram relatados. Os pacientes com leptospirose apresentaram também: 5 (100%) anorexia, 3 (60%) náuseas, 2 (40%) vômitos, 2 (40%) diarreia, 1 (20%) tosse, e 1 (20%) prurido (Figura 25).

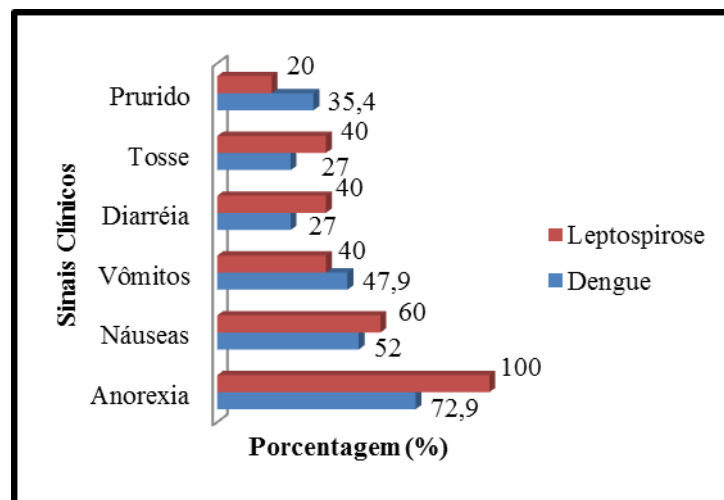


Figura 25. Gráfico ilustrativo com outros sinais e sintomas similares encontrados nos pacientes positivos para dengue e para leptospirose.

4.4.4 Possíveis co-infecções

Dentre os 68 pacientes avaliados para dengue e para leptospirose, 2 pacientes apresentaram resultados positivos para ambas as infecções, sendo o paciente VMA positivo na RT-PCR para dengue e também positivo no teste de ELISA para leptospirose e o paciente JBS positivo para estas infecções através do ELISA-IgM (Tabela 7).

Tabela 7. Paciente que apresentou resultados positivos em testes para identificação de dengue e leptospirose

Paciente	Sexo	ELISA-NS1	RT-PCR	ELISA-IgM dengue	ELISA-IgM leptospirose
VMA	F	-	+	-	+
JBS	F	-	-	+	+

5 DISCUSSÃO

A dengue é uma infecção de etiologia viral aguda e acomete milhares de pessoas a cada ano, causando diversas manifestações clínicas que variam desde manifestações assintomáticas a quadros mais graves (HENCHAL; PUTNAK, 1990; GUZMAN; ISTURÍS, 2010, SAN MARTÍN *et al.*, 2010). O diagnóstico preciso da dengue é essencial para o tratamento clínico correto dos pacientes, pois pode fornecer medidas de controle contra doença e ainda pode auxiliar pesquisas que envolvem a patogênese da doença. A confirmação do diagnóstico é essencial para diferenciar a dengue de outras infecções e também para o acompanhamento clínico dos pacientes que apresentam as formas mais graves da doença.

Existem atualmente, diversas técnicas que servem para a confirmação da infecção por dengue, que variam desde testes sorológicos, virológicos ou moleculares. Contudo, cada teste possui um período que permite uma maior eficácia. Os testes virológicos e moleculares apresentam uma maior sensibilidade quando realizados no período de viremia ou fase aguda da doença, enquanto os testes sorológicos são mais eficazes na fase de convalescência (GUBLER, 1998; WHO, 2009, BRASIL, 2010). Cada técnica utilizada apresenta vantagens (preço acessível, boa sensibilidade e especificidade, rapidez e detecção do sorotipo) e desvantagens (alto custo, baixa sensibilidade, reações cruzadas, etc.) tornando desta forma, o método de escolha do diagnóstico mais dificultoso, pois cada técnica possui uma característica individual.

Apesar da grande necessidade de um diagnóstico preciso para identificação da infecção por dengue, é muito difícil identificá-la principalmente no estágio inicial devido à dificuldade de isolamento viral e a dificuldade de acesso às técnicas de detecção do genoma viral, pois, são técnicas de alto custo e que necessitam de laboratórios especializados. Devido os anticorpos anti-dengue surgirem a partir do quinto dia de infecção, o resultado através destes testes podem ser demorados. Além disso, em regiões onde a dengue é endêmica, testes sorológicos não devem ser utilizados isoladamente, pois os anticorpos de uma infecção anterior podem persistir por mais de 60 dias (CHUA *et al.*, 2011)

O diagnóstico clínico-epidemiológico é de grande importância, pois a partir deste, são observados os sintomas relatados e outras informações acerca da doença. Contudo, em épocas de epidemias, devido à grande quantidade de casos, a confirmação laboratorial pode ser dispensada, permitindo desta forma, que o paciente seja diagnosticado e tratado apenas pelo critério clínico-epidemiológico. Porém, se faz necessário ressaltar que tanto o uso do

diagnóstico clínico-epidemiológico como o uso de técnicas para detecção da doença são ideais para um diagnóstico preciso, porque desta maneira aumenta-se as chances de um tratamento correto para o paciente. Durante epidemias, também é essencial a realização de diagnóstico diferencial de dengue para identificação da infecção, pois muitas outras patologias compartilham sintomas semelhantes (BRASIL, 2011a).

O Estado do Ceará é um dos mais importantes, dentre os Estados do Brasil, em termos de números de casos de DC e FHD (CUNHA, 1998). Os primeiros registros de dengue no Ceará ocorreram na década 80 e a partir da sua primeira identificação, a doença encontra-se presente no Estado em todos os anos, principalmente no primeiro semestre, devido provavelmente a fatores como o aumento da pluviosidade, temperatura e umidade. Apesar do seu predomínio no primeiro semestre, a dengue tem sido relatada durante o ano inteiro (CEARÁ, 2011a).

Neste estudo, no período de fevereiro a dezembro de 2010, 86 pacientes com síndrome febril atendidos nos hospitais São José de Doenças Infecciosas e Distrital Nossa Senhora da Conceição foram avaliados, sendo 52 pacientes atendidos no ambulatório e 34 hospitalizados. Dentre os 86 pacientes, 48 (55,8%) foram positivos para dengue, em pelo menos um dos testes específicos realizados (teste imunocromatográfico NS1, RT-PCR, teste imunocromatográfico IgM/IgG, ELISA-IgM e ELISA-NS1), sendo 27 atendidos no ambulatório e 21 hospitalizados. De acordo com a Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, neste mesmo ano, foram notificados no Estado 13.817 casos e 125 (67,9%) municípios tiveram transmissão comprovada de dengue, apresentando um importante aumento no número de casos quando comparados com 2009. A incidência da doença no Ceará, em 2010, foi de 161,74 por 100.000 habitantes. Esse aumento no número de casos quando comparados com o ano de 2009, se deve provavelmente a re-circulação do sorotipo DENV-1.

Os pacientes recrutados neste estudo foram separados por grupos (ambulatoriais e hospitalizados). Os pacientes atendidos no ambulatório tinham que estar necessariamente entre o primeiro ao quinto dia de sintomas da doença para a realização de testes virológicos e moleculares. Os pacientes hospitalizados foram recrutados mesmo apresentando mais de cinco dias de sintomas. A segunda coleta ocorreu a partir do terceiro dia de infecção para a realização dos testes sorológicos. Segundo o Ministério da Saúde, os pacientes internados apresentam um quadro mais grave e devido esta gravidade, caso o paciente não seja tratado corretamente, possivelmente o mesmo pode evoluir ao óbito. A DC e a FHD apresentam uma similaridade de sintomas como cefaléia, artralgia, mialgia, prostração, exantema e podem ou

não apresentar manifestações hemorrágicas (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997; BRASIL, 2011). Contudo, a FHD tem como característica o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de líquidos para o interstício, e, caso os pacientes que apresentam FHD não recebam um tratamento eficaz, os mesmos podem sofrer um colapso circulatório, caracterizando a SCD (HEMUNGKORN *et al.*, 2007). Outra forma grave da dengue é a DCC, que representa todo caso grave, mas que não se enquadra nos critérios da OMS de FHD e também quando a classificação de dengue clássica é insatisfatória (BRASIL, 2011a).

Os pacientes positivos neste estudo apresentaram média de idade de aproximadamente 36 anos, sendo que o maior grupo com a doença confirmada foram aqueles que possuíam entre 18 a 28 anos. Cavalcanti *et al.* (2011), relataram mudança no padrão de idade dos pacientes atingidos por dengue, e que desde 2007, a população mais atingida passou a ser crianças. Outros estudos também relataram que além da população mais jovem ser a que mais apresenta infecção por dengue, o aumento de casos de FHD também tem sido observado nesta população (HALSTEAD, 2006; TEIXEIRA, 2009). Entretanto, é válido ressaltar que neste estudo foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão, e que, segundo os critérios de inclusão, só seriam incluídos nesta pesquisa pacientes acima de 18 anos. Portanto, mesmo que esteja ocorrendo uma mudança na população atingida pela doença, este fato não seria observado no presente estudo, pois, os indivíduos mais jovens, menores de 18 anos não foram recrutados.

Em relação ao sexo, foi possível observar neste estudo, que a população feminina foi a mais afetada, sendo 52% dos pacientes positivos para dengue do sexo feminino e 48% do sexo masculino. Mesmo com um pequeno número amostral, estes resultados não corroboram com os dados da SESA, que afirmam que cerca de 60% da população atingida pela dengue, pertencem ao sexo masculino (CEARÁ, 2011a). Outros estudos demonstraram que a população masculina é a mais atingida (GREGORY *et al.*, 2010; GUNASEKARAN *et al.*, 2011).

Como descrito anteriormente, a dengue está presente no Estado do Ceará durante todo o ano, mais precisamente no primeiro semestre (CEARÁ, 2011a). Neste estudo, foi observado que a doença também esteve presente em todo o ano de 2010, corroborando com os dados da SESA. Também foi observado, que a maior prevalência de pacientes positivos para a infecção de dengue ocorreu nos meses de junho, julho e agosto, contradizendo os dados da SESA, no qual relata que os casos de dengue são mais frequentes nos meses de março, abril e junho. Entretanto, é válido ressaltar, que ainda segundo a SESA, os principais reservatórios

do agente transmissor da doença no Ceará, *A. aegypti*, são depósitos que servem para o armazenamento de água, como por exemplo, caixas de água, tambores, potes e etc. permitindo, desta forma, que o agente transmissor continue ativo por vários meses após o período chuvoso. Vasconcelos *et al.* (1995), em um estudo realizado no Ceará em 1994, evidenciaram a presença da doença no primeiro semestre, mas com o maior número de casos em junho, concordando com os dados da SESA naquele mesmo ano, sendo que 16.608 casos foram notificados. Em um estudo que avaliou a relação entre os elementos atmosféricos e a dengue em Fortaleza entre os anos de 2001 a 2009, Magalhães (2011) observou que, quando ocorre o aumento das precipitações pluviométricas, percebe-se o aumento da infestação do *A. aegypti* e a maior concentração dos casos ocorre na quadra chuvosa, podendo o aumento dos casos de dengue ser verificado até dois meses após os meses com maior índice pluviométrico.

Neste estudo foram utilizadas as técnicas de detecção de NS1 e RT-PCR em pacientes que estavam entre o primeiro e quinto dia de febre, enquanto o teste de ELISA-IgM e o teste imunocromatográfico para a detecção de IgM foram realizados nas amostras coletadas dos mesmos pacientes na segunda coleta, sendo que os mesmos estavam entre o terceiro e o décimo primeiro dia de infecção. O teste de ELISA-IgG também foi utilizado nas amostras de soro coletadas entre o primeiro e o quinto dia de doença.

A detecção da glicoproteína NS1, atualmente, tem sido uma importante ferramenta na detecção do vírus dengue, pois a NS1 é bastante conservada e também abundante no soro de pacientes infectados na fase aguda da doença. Portanto, o diagnóstico através do uso desta técnica, tem sido amplamente utilizado para detecção da infecção por dengue (TEIXEIRA; BARRETO, 2009; WANG; SEKARAN, 2010).

Duas metodologias principais para detecção de NS1 no soro podem ser empregadas, o teste imunocromatográfico NS1 e o ELISA-NS1. O primeiro teste permite a identificação da NS1 em apenas 15 minutos, fornecendo um diagnóstico rápido, fácil de realizar, não necessita de um laboratório com equipamentos modernos, possui custo acessível e é ideal para ser utilizada no início da infecção. No entanto, é uma técnica que ainda precisa ser aperfeiçoada, devido sua sensibilidade ser mais baixa que a do teste de ELISA (FRY *et al.*, 2011). Blacksell *et al.* (2006a), relataram que os testes imunocromatográficos possuem baixa capacidade de diferenciar infecção primária de secundária, apesar dos fabricantes afirmarem que esta característica seja possível.

Dussart *et al.* (2008) compararam a utilização de dois diferentes testes imunocromatográficos em amostras de soro de pacientes na fase aguda da doença e

constatarem que esta técnica é de grande importância para a detecção de dengue, sendo que das 272 amostras positivas através do RT-PCR e/ou isolamento viral, 224 foram positivas para detecção da NS1 através do teste Platelia Dengue NS1 Ag test, 211 positivas pelo Dengue NS1 Ag STRIP, quando utilizado em 30 minutos, e, 207 positivas também pelo Dengue NS1 Ag STRIP, quando utilizado em 15 minutos. Silva *et al.* (2011) analisaram a detecção da glicoproteína NS1 em pacientes com RT-PCR confirmados e mostraram que de 54 amostras avaliadas e coletadas entre o primeiro e o terceiro dia de sintomas, 50 foram positivas.

Neste estudo, foram avaliados 52 pacientes de ambulatório, que estavam entre o primeiro ao quinto dia de infecção para detecção da glicoproteína através do teste imunocromatográfico (Dengue NS1 Ag STRIP), sendo que apenas 11 (22,9%) foram positivos, não corroborando com estudos de Dussart *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2011), que apresentaram uma alta positividade para detecção de NS1 através do teste rápido. Estudos realizados por Bessof *et al.* (2008) e Tricou *et al.* (2010) demonstraram que a eficiência do teste imunocromatográfico NS1 é variável, pois pacientes que apresentaram infecção secundária de dengue tiveram um resultado negativo para detecção de NS1. Hang *et al.* (2009), sugerem que a negatividade pelo teste de NS1 em uma infecção secundária poderia ocorrer devido a ligação do anticorpo IgG com a proteína NS1, pois durante os primeiros dias da infecção secundária, uma quantidade substancial da proteína NS1 pode ter se ligado aos anticorpos específicos IgG formados na fase aguda da infecção primária.

Tricou *et al.* (2010), também sugerem que a baixa positividade do teste poderia estar relacionada a uma baixa carga viral dos pacientes infectados. No entanto, dos 11 pacientes positivos para NS1 no presente estudo, 6 foram positivos para IgM e IgG, indicando uma possível infecção secundária, e por apresentar uma diferença irrelevante, não podemos afirmar com certeza que a presença de uma infecção secundária seria um fator determinante para a baixa sensibilidade do teste imunocromatográfico. Estudos anteriores também relataram diferença na sensibilidade do teste em relação ao sorotipo do vírus, sendo que pessoas infectadas com os sorotipos 2 ou 4 foram as que mais apresentaram baixa sensibilidade no teste (para DENV-1, 93%, DENV-2, 82%, DENV-3, 87%, DENV-4, 71%) (BESSOF *et al.*, 2008; 2010). Neste estudo, dentre os pacientes de ambulatório que foram positivos no teste rápido para detecção de NS1, apenas 4 foram positivos no RT-PCR, sendo que 3 pacientes estavam infectados com o DENV-2, concordando com Bessof *et al.* (2008; 2010), e que pode ser outro fator para explicar a baixa positividade do teste imunocromatográfico neste estudo,

além da suposição de Tricou *et al.* (2010) de que os pacientes podem ter apresentado uma baixa carga viral, influenciando também no resultado do teste.

Em relação aos 34 pacientes hospitalizados, apenas 3 pacientes foram positivos no teste imunocromatográfico NS1. É válido ressaltar, que a maioria dos pacientes internados possuíam mais de cinco dias de sintomas, corroborando com outros estudos como os de Castro-Jorge *et al.* (2010) e Wang e Sekaran (2010), que demonstraram que o diagnóstico através do NS1 possui uma maior sensibilidade quando realizado nas amostras coletadas entre o primeiro e até no máximo no quinto dia de sintomas.

A outra forma de detecção da glicoproteína NS1 é realizada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Este ensaio é mais sensível e possui um custo mais baixo do que o teste imunocromatográfico, também é rápido e de fácil execução e assim como o teste rápido NS1, não necessita de laboratórios de grandes infra-estruturas, entretanto, tem como desvantagem a não-identificação dos sorotipos que causam a infecção (GUZMÁN *et al.*, 2010). Neste estudo, o teste de ELISA NS1 conseguiu detectar, dentre os 86 pacientes, o antígeno NS1 em 23 (26,7%), sendo que, 14 pacientes eram de ambulatório e 9 estavam hospitalizados. Todos os pacientes que foram positivos no teste imunocromatográfico NS1, também foram positivos no ELISA-NS1. Observa-se através deste resultado, que o teste de ELISA NS1 apresentou uma maior positividade que o teste imunocromatográfico NS1, mas ainda assim, o teste obteve uma baixa positividade não corroborando com o estudo de Osorio *et al.* (2010) que demonstraram uma grande positividade do teste, sendo que dentro de 310 amostras de soro, 218 foram positivas no teste imunoenzimático para detecção da NS1. O teste de ELISA-NS1 ainda identificou a infecção por dengue em 3 pacientes (dois de ambulatório e um hospitalizado) que foram negativos nos diagnósticos de RT-PCR, NS1 imunocromatográfico, no ELISA-IgM e no teste rápido para detecção de IgM.

Os fatores que explicam a baixa sensibilidade desta técnica podem ser os mesmos elucidados para o teste imunocromatográfico de detecção de NS1, como, a baixa carga viral, relação com o sorotipo e período de coleta (como no caso dos pacientes hospitalizados). Dentre os 14 pacientes de ambulatório positivos no ELISA-NS1, 7 pacientes foram positivos no ELISA-IgM e ELISA-IgG, sugerindo infecção secundária. Desta forma, percebe-se que a presença de anticorpos da classe IgG podem influenciar na positividade do teste, como sugerido por Hang *et al.* (2009), entretanto, de acordo com os nossos resultados, este fato parece não ser o fator principal para a baixa positividade do teste.

A priori, um paciente que se encontra hospitalizado, possivelmente possuiria uma maior carga viral, e um maior nível sérico de glicoproteína NS1 no soro, no entanto, esta glicoproteína é somente detectada nos primeiros dias de sintomas (ALCON *et al.*, 2002), fato que explica a baixa positividade nos pacientes hospitalizados. Ainda não se conhece as razões que podem levar um paciente à forma mais grave da doença. Contudo, existem diversas teorias que tentam explicar o desenvolvimento das formas graves. A primeira hipótese relaciona o aparecimento da FHD à virulência da cepa infectante, a segunda, teoria de Halstead, a FHD está relacionada com infecções sequenciais por diferentes sorotipos. Outra hipótese sugere que a resposta imunológica na segunda infecção é exacerbada, resultando numa forma mais grave da doença, e, por fim, uma hipótese integral de multicasualidade que explica a que FHD é resultado da interação dos fatores das duas primeiras teorias descritas, acompanhados de fatores dos hospedeiros como, idade, sexo, etnia, genética e estado imunológico do paciente (HALSTEAD, 1988; LEITMEYER *et al.*, 1999; GUZMÁN; KOURI, 2003; ROTHMAN, 2004).

Comparando os testes de NS1 e RT-PCR, o primeiro possui diversas vantagens, que incluem a rapidez, o custo-benefício, a fácil aplicação e padronização, o que propicia a pesquisa em países pobres (HU *et al.*, 2011). Ding *et al.* (2010), através de seu estudo com pacientes na fase aguda, mostraram que de 153 pacientes com dengue confirmada por testes de RT-PCR e ELISA-IgM, 147 foram positivos somente no NS1, sugerindo que o último realmente possui mais vantagens que o RT-PCR para o diagnóstico de dengue na fase aguda. No presente estudo, o teste de ELISA-NS1, apesar de uma baixa positividade (26,7%), ainda conseguiu identificar a infecção em um maior número de pacientes quando comparado ao RT-PCR, que identificou a infecção em apenas 16 pacientes, corroborando com o estudo de Ding *et al.* (2010).

Dentre os diagnósticos para dengue, a técnica da PCR tem se tornado uma importante ferramenta, revolucionando o diagnóstico laboratorial, tanto para a detecção de infecção por dengue como no diagnóstico para outras infecções (DE PAULA *et al.*, 2004; DUTRA *et al.*, 2009). Esta técnica tem como principais características sua rapidez de realização e boa sensibilidade (DAS *et al.*, 2008; PEELING *et al.*, 2010; DOMINGO *et al.*, 2010).

O RT-PCR e o qPCR têm substituído gradativamente o isolamento viral, e, apesar deste último ser ainda considerado o “padrão ouro” por apresentar boa especificidade e capacidade de detecção do sorotipo, o mesmo precisa de um grande período para confirmação

do diagnóstico, pois vai depender do crescimento das células, e, além disso, é um teste que para ser realizado necessita de pessoas especializadas para a sua realização e laboratórios muito bem equipados (GUBLER, 1998; GUZMÁN; KOURÍ, 2004; SHU; HUANG, 2004; KAO *et al.*, 2008). Muitos estudos têm demonstrado que a PCR tem apresentado uma maior sensibilidade quando comparado ao isolamento viral, e ainda, consegue detectar o RNA do vírus mesmo quando as amostras de soro permanecem muito tempo armazenadas (LANCIOTTI *et al.*, 1992; POERSCH *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2008; DUTRA, 2009).

Muitos protocolos têm sido descritos para detecção do material genético do vírus dengue e diferem apenas no tipo de sequência-alvo (KAO *et al.*, 2008; CHUA *et al.*, 2011). Entretanto, a PCR mais utilizada nos laboratórios ainda é a que utiliza o protocolo desenvolvido por Lanciotti *et al.* (1992), pois através desta técnica se consegue, além de detectar a infecção por dengue, pode-se identificar o sorotipo em uma única reação (GUZMÁN *et al.*, 2010; CHUA *et al.*, 2011). A técnica de RT-PCR multiplex desenvolvida por Lanciotti *et al.* (1992) utiliza seis diferentes oligonucleotídeos, no qual 2 *primers* são desenhados a partir de uma região de consenso e os outros quatro *primers* são específicos para cada sorotipo, permitindo a geração de fragmentos com tamanhos diferentes para uma possível diferenciação do sorotipo responsável pela doença. Esta reação possui sensibilidade de 94% e 93% para DENV-1 e DENV-2, respectivamente, e 100% tanto para o DENV-3 e DENV-4 quando comparadas com o isolamento viral (LANCIOTTI *et al.*, 1992). Apesar da técnica de RT-PCR possuir diversas vantagens, muitas desvantagens também tem sido relatadas, como por exemplo, grandes possibilidades de contaminação, necessidade de equipamentos de precisão e profissionais aptos para a realização deste teste, alto custo de reagentes e aparelhos, necessidade de estocagem das amostras em temperaturas muito baixas, devido à molécula de RNA viral ser muito sensível (PARIDA, 2008; DUTRA *et al.*, 2010).

Através da utilização do RT-PCR desenvolvido por Lanciotti *et al.* (1992) alguns estudos demonstram a ocorrência de infecção simultânea por mais de um sorotipo de dengue em um mesmo paciente. Bharaj *et al.* (2008) identificaram 39 pacientes que possuíam diversas combinações entre os sorotipos em um surto de dengue na Índia, sendo que os pacientes infectados com os sorotipos DENV-1 e DENV-3 foram os mais comuns. Dentre os pacientes co-infectados, seis foram classificados, de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde, com FHD. Araújo *et al.* (2006) também relataram um caso de co-infecção com os sorotipos 2 e 3 no Ceará, ocorrido em 2003 em um paciente residente em Tauá.

Mesmo com uma infecção dupla, este paciente apresentou sintomas leves. No presente estudo, nenhum paciente com dengue estava infectado com mais de um sorotipo.

Embora o RT-PCR seja uma técnica de bastante aceitação e possuir muitas vantagens, neste estudo, entre os 86 pacientes que participaram da pesquisa, apenas 16 (18,6%) foram positivos para este diagnóstico, sendo que 6 pacientes foram atendidos no ambulatório e 10 estavam hospitalizados, demonstrando uma baixa positividade da RT-PCR, contestando estudos de Shu & Huang (2004) e Saxena *et al.* (2008) que afirmaram que esta técnica seria uma possível substituta, com melhor sensibilidade, para o isolamento viral. Castro-Jorge *et al.* (2010), demonstraram que através da técnica de RT-PCR, seguindo o protocolo de Lanciotti, foi possível detectar o RNA viral em 63% de amostras de soro positivas para IgM, enquanto no presente estudo a positividade foi de apenas 18,6%. Neste estudo, o teste RT-PCR sozinho, conseguiu detectar o RNA em cinco pacientes (3 de ambulatório e 2 hospitalizados).

Dentre os sorotipos encontrados nos pacientes de ambulatório, cinco haviam sido infectados pelo DENV-2 e um infectado pelo DENV-1. Apesar das amostras de soro dos pacientes de ambulatório utilizadas para detecção do RNA terem sido coletadas até o quinto dia de sintomas da doença, alguns fatores devem ser levados em conta para a elucidação desta baixa positividade, tais como, a degradação do RNA viral que pode ter ocorrido em várias etapas: durante a preparação da reação, no manuseio das amostras colhidas, transporte e acondicionamento das mesmas (SANTOS *et al.*, 2008). Outro fator de suma importância foi descrito por Reynes *et al.* (2003), que apontaram uma falha no protocolo de Lanciotti na detecção do DENV-1, no qual foi aconselhado mudanças no protocolo original, visando a identificação de novas linhagens.

No ano de 2010, segundo a SESA, o sorotipo circulante mais isolado no Estado do Ceará foi o DENV-1, o que provavelmente foi responsável pelos casos graves e que não ocorriam no Estado desde 2006. Devido o DENV-1 ter sido prevalente, possivelmente a técnica de RT-PCR não conseguiu detectar estes sorotipos neste trabalho. Alves (2005) observou que o protocolo de Lanciotti poderia não estar detectando todas as linhagens do vírus dengue circulantes no Recife, pois de 72 amostras analisadas no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, 20 foram positivas para a detecção de IgM e apenas 20% das amostras que tiveram detecção de IgM foram positivas através da técnica de RT-PCR. Acredita-se que a variabilidade genética que estes vírus estão expostos, pode ter sido imposta a sequências de nucleotídeos da região do

genoma viral que foi alvo do desenho dos *primers*. É válido ressaltar, que a sensibilidade do diagnóstico através do RT-PCR é variável não somente de acordo com o protocolo adotado, mas também devido à utilização de diversos outros reagentes, como por exemplo, *primers*, enzimas, tampões, sequência-alvo do genoma, condições das reações. Enfim, qualquer um destes critérios pode influenciar os resultados de uma reação de PCR (KAO *et al.*, 2005).

Mesmo as amostras dos pacientes hospitalizados terem sido coletadas depois de cinco dias de infecção, o RT-PCR ainda conseguiu identificar o material genético em dez pacientes, inclusive, em um paciente que se encontrava no décimo dia de doença, sugerindo que o mesmo poderia estar com uma elevada carga viral e demonstrando desta forma uma possível relação entre carga viral e gravidade da doença. Um estudo realizado no Tahiti com crianças internadas demonstrou que a detecção da infecção por dengue por RT-PCR só foi possível até o terceiro dia de sintomas (MURGUE *et al.*, 2000). No presente estudo, os sorotipos isolados nos pacientes hospitalizados foram o DENV-2 e DENV-3, sendo o sorotipo 2 o mais comum encontrados em 9 pacientes. Thomas *et al.* (2008) observaram que o DENV-2 está ligado a complicações, principalmente se este paciente infectado pelo DENV-2 estiver em uma infecção secundária. Nisalak *et al.* (2003), também demonstraram que o DENV-2 estava ligado a casos de FHD em infecções secundárias de dengue na Tailândia. Nesta pesquisa, 8 dos 10 pacientes hospitalizados tiveram o anticorpo IgG detectado, caracterizando uma possível infecção secundária, corroborando com os dados de Thomas *et al.* (2008) e Nisalak *et al.* (2003). Entretanto, nos pacientes de ambulatório deste estudo, dos cinco positivos por RT-PCR e infectados com sorotipo 2, quatro também tiveram o IgG detectado, demonstrando que a relação entre o sorotipo infectante e a gravidade da doença ainda é bastante contraditória, como já sugerido em outros trabalhos (GUBLER, 1998).

Dentre os testes sorológicos, o ELISA-IgM é o mais utilizado na rotina laboratorial. Este teste oferece uma boa sensibilidade e especificidade, é de simples execução, prático e pode ser realizado em qualquer laboratório de rotina, no entanto, para uma melhor eficácia, o melhor período para realização do mesmo é a partir do quinto dia de sintomas da doença, período no qual a pessoa infectada pelo vírus dengue passa a produzir anticorpos (DE PAULA *et al.*, 2004; WHO, 2009; GUZMÁN *et al.*, 2010). Um fato de grande importância e que deve ser levado em consideração para a eficácia do teste, é o comportamento dos anticorpos, pois este difere entre a infecção primária e a secundária. Quando ocorre na infecção primária, os anticorpos da classe IgM começam a ser detectados, geralmente, a partir do quinto dia de doença, enquanto numa infecção secundária, os anticorpos passam a ser

detectados mais cedo, mas em menores quantidades. Estes diferentes padrões de resposta podem comprometer o resultado do diagnóstico (SA-NGASANG *et al.*, 2003; WHO, 2009).

Apesar da técnica ELISA-IgM ser a mais utilizada na rotina laboratorial, a mesma apresenta diversas desvantagens, como por exemplo, a baixa sensibilidade antes do quinto dia de sintoma, pode apresentar reações cruzadas com outras flaviviruses e não detecta o sorotipo infectante (GUBLER, 1998; PEELING *et al.*, 2010).

Neste estudo, o teste de ELISA-IgM apresentou resultados satisfatórios. Dentre os 86 pacientes apenas 68 foram avaliados, pois 18 pacientes não tiveram a segunda coleta realizada, porque seis pacientes que estavam internados foram transferidos de hospital e doze pacientes atendidos no ambulatório não retornaram para a segunda coleta. Trinta e oito (55,8%) foram positivos para esta técnica, sendo que 22 foram atendidos no ambulatório e 16 estavam hospitalizados. De todos os diagnósticos aplicados, o ELISA-IgM apresentou uma maior positividade, e, quando realizado sozinho, o mesmo conseguiu identificar a infecção por dengue em três pacientes de ambulatório. No entanto, um estudo realizado por Khan *et al* (2009), durante um surto de dengue no Paquistão em 2006, demonstraram que quando as técnicas de RT-PCR e ELISA-IgM foram comparadas, o teste molecular apresentou uma maior positividade, sendo que dentre 83 amostras de casos suspeitos de dengue, o RT-PCR foi positivo em 73 (87,9%) pacientes, enquanto o ELISA conseguiu detectar a infecção em 61 (83,6%), não corroborando com os resultados do presente estudo. Khan *et al.* (2009), também enfatizaram que apesar do RT-PCR apresentar uma positividade maior, mesmo com pouca diferença quando comparado ao ELISA-IgM, os testes sorológicos têm um papel importante no diagnóstico, pois são técnicas de baixo custo e facilmente disponíveis principalmente nos países endêmicos, e, a sensibilidade e especificidade dos kits comerciais podem ser variáveis, portanto a avaliação destes kits é de grande importância para um aprimoramento no diagnóstico. Velathanthiri *et al.* (2006), em um estudo realizado no Sri Lanka, mostraram que os testes sorológicos são mais úteis para detecção de dengue, pois dentre 226 pacientes com dengue-símile, o anticorpo IgM foi detectado em 117 (81,8%), enquanto o RNA viral foi detectado em apenas 27 (11,9%) pacientes, corroborando com os achados do presente estudo. No trabalho de Velathanthiri *et al.* (2006), as amostras dos pacientes foram coletadas entre o primeiro e o oitavo dia de sintomas, e o IgM foi detectado, inclusive, em pacientes que estavam no primeiro dia de infecção. Entretanto, foi observado que com o passar dos dias de infecção, a positividade tornou-se mais intensa. No presente estudo, o teste de ELISA-IgM foi realizado nas amostras dos pacientes que estavam entre o terceiro e o décimo primeiro dia de

sintomas, e foi observado que, ao passar do tempo, a infecção tornou-se mais presente, sendo o sexto e o nono dia os mais frequentes. Vale ressaltar que o IgM foi identificado em um paciente que estava no terceiro dia de infecção e outro que estava no quarto dia.

Em um estudo realizado por Hunsperger *et al.* (2009), foi evidenciado que os testes realizados para detecção de IgM, apesar de serem úteis para a vigilância e de servirem como suporte para o diagnóstico de dengue em conjunto com os sintomas clínicos e fornecerem informações epidemiológicas, não deveriam ser utilizados para a confirmação da doença em países endêmicos, pois o IgM persiste por mais de 60 dias, e a presença do mesmo pode indicar que uma infecção de dengue ocorreu há cerca de dois ou três meses atrás.

Outro teste de grande importância para a constatação de uma possível infecção secundária, também foi realizado neste estudo através do ensaio de ELISA, para a detecção de anticorpos IgG em amostras coletadas dos pacientes entre o primeiro e o quinto dia de infecção. Dentre os 52 pacientes de ambulatório, um paciente não foi avaliado, pois não tinha mais amostra de soro. O teste foi realizado em 51 pacientes e 39 (76,4%) foram positivos para este teste. Dentre os 39 pacientes positivos para IgG, 16 foram positivos também para IgM, indicando uma possível infecção secundária, enquanto 6 foram positivos somente para IgM, indicando uma possível infecção primária. Entre os pacientes hospitalizados, 27 (79,4%) foram positivos para a detecção do anticorpo IgG anti-dengue. Entretanto, dos pacientes positivos para IgG, 15 tiveram detecção positiva de IgM, também indicando uma possível infecção secundária e apenas 1 foi positivo para IgM, sugerindo uma infecção primária. Thomas *et al.* (2008), observaram diferenças significativas em pacientes com infecções primárias e secundárias, sendo que, dos 146 pacientes avaliados, 78 apresentaram infecção primária por dengue, enquanto, 39 foram confirmados com infecção secundária. Todos os pacientes com infecção de dengue pela segunda vez foram diagnosticados com FHD, a forma mais grave da doença. Neste estudo, não observamos diferença entre pacientes recrutados no ambulatório e pacientes hospitalizados em relação à gravidade da doença em uma possível infecção secundária, contradizendo dessa forma, os dados de Thomas *et al.* (2008). Segundo Guzman & Kouri (2003), a infecção secundária parece ser o principal fator de risco para FHD, entretanto, outros fatores como: imunidade do hospedeiro, o vírus e as condições epidemiológicas também são importantes. Os autores também levantam a discussão de que os fatores que levam ao desenvolvimento das formas mais graves são ainda bastante incoerentes.

Muitos kits comerciais de ELISA para detecção de IgM e IgG têm sido desenvolvidos com o objetivo de facilitar o diagnóstico dos pacientes com dengue. Estes

testes possuem sensibilidade e especificidade variadas, entretanto, têm se mostrado de grande importância no diagnóstico de dengue e na diferenciação entre infecções primárias e secundárias. A maioria destes testes utiliza a combinação dos quatro sorotipos e os resultados estão disponíveis dentro de 15 a 90 minutos (dependendo do fabricante), no entanto, resultados falso-positivos também já foram relatados (VAUGN *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2000; PEELING *et al.*, 2010).

Neste estudo, os pacientes também foram avaliados através do teste imunocromatográfico para detecção de IgM e IgG. As amostras utilizadas foram as da segunda coleta, portanto, esta técnica foi aplicada somente em 68 pacientes. Através deste teste, a detecção de IgM ocorreu em 36 (52,9%) pacientes, sendo 19 de ambulatório e 17 internados e a detecção de IgG ocorreu em 39 (57,3%) pacientes, cujo 17 eram de ambulatório e 22 hospitalizados. Quando comparado ao teste de ELISA-IgM, observamos que este apresentou uma positividade um pouco maior, pois conseguiu detectar a doença em dois pacientes que não foram positivos para IgM através do teste rápido IgM. Entretanto, o teste rápido apresentou uma boa positividade quando comparado com as outras técnicas realizadas (teste imunocromatográfico NS1, ELISA-NS1 e RT-PCR), evidenciando que o diagnóstico por este teste, na detecção de anticorpos, se mostra útil e que poderia ser utilizado na rotina laboratorial. Nga *et al.* (2007), demonstraram através de um estudo de comparação de testes rápidos com o ELISA, que dentre 200 amostras de pacientes, 78 pacientes foram positivos para IgM e 100 para IgG pelo teste imunocromatográfico Pan Bio cassete, e pelo ELISA, 162 pacientes tiveram o anticorpo IgM identificado. O autor ainda relata que apesar da facilidade de uso, os testes imunocromatográficos possuem um valor limitado para o diagnóstico e que precisam ser melhorados para a implantação na rotina, diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho. Para Blacksell *et al.* (2011) os testes imunocromatográficos apresentam uma boa sensibilidade, e quando em combinação com o diagnóstico para detecção de NS1, a sensibilidade e especificidade aumentaram. No entanto, em regiões endêmicas existe uma maior probabilidade de ocorrer falso-positivos IgM/IgG, devido a persistência de anticorpos de uma infecção de dengue anterior ou de uma infecção causada por um outro flavivírus. Portanto, mais estudos são imprescindíveis para determinar os melhores antígenos de diagnóstico, não só para a infecção por dengue, mas também para outras enfermidades em que a sorologia não é suficientemente sensível durante a fase aguda. Um diagnóstico rápido e preciso na fase aguda é essencial na melhoria do manejo dos pacientes.

A dengue representa a mais importante arbovirose do mundo, em termos de morbidade e mortalidade e, considerando a sua variedade de sintomas, torna-se bastante difícil distingui-la de outras infecções empregando apenas critérios clínico-epidemiológicos, por isso é de extrema necessidade a utilização de métodos laboratoriais para confirmação da doença (GUZMAN; KOURI, 2003; CHUA *et al.*, 2011). Devido ao amplo espectro clínico da dengue, o Ministério da Saúde recomenda a realização de diagnóstico diferencial para outras diversas patologias, dentre as quais se encontra a leptospirose que necessita ser diferenciada precocemente da dengue para tratamento específico efetivo (BRASIL, 2010).

A leptospirose humana é uma zoonose de ampla distribuição mundial e assim como a dengue, possui um amplo espectro nas suas manifestações clínicas, que variam desde formas mais simples até formas mais graves, no qual é conhecida como síndrome de Weil. É na fase inicial da infecção que a leptospirose se assemelha a outras patologias e os principais sintomas são: febre abrupta associada à cefaléia, mialgia, dor retro-orbitária, entre outros (VIJAYACHARI *et al.*, 2008; EVANGELISTA; COBURN, 2010).

O diagnóstico clínico da leptospirose baseia-se no quadro clínico e também em dados epidemiológicos, sendo confirmado por técnicas laboratoriais. Existem diferentes técnicas utilizadas para a detecção da leptospirose, no entanto, o método laboratorial vai depender da fase evolutiva em que se encontra o paciente. As principais técnicas são: o isolamento da leptospira, o teste de microaglutinação (MAT), ELISA-IgM e PCR (DAHER *et al.*, 2010b; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). O isolamento da bactéria permanece como diagnóstico principal, entretanto, esta técnica é muito difícil de ser realizada, pois necessita de um grande período de cultura. Porém, esta técnica possui como vantagem, a capacidade de identificação dos sorovares (BRASIL, 2011). O PCR, utilizado para detecção de DNA na fase aguda da doença, tem se mostrado bastante eficaz em diferentes estudos e diferentes protocolos tem sido propostos para o aumento da eficácia do teste, contudo, este diagnóstico possui elevado custo e laboratórios bem equipados (PEREZ; GOARANT, 2010; VILLUMSEN *et al.*, 2010; THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011). Os testes mais utilizados na rotina laboratorial são o MAT e o ELISA-IgM, no entanto, o diagnóstico pelo ELISA vem se tornando cada vez mais utilizado devido sua rapidez, facilidade e baixo custo. Porém, o MAT tem como característica principal a identificação do sorovar responsável pela infecção, contudo, necessita de coletas pareadas e é muito complicado para ser usado na rotina laboratorial (ARUMUGAM *et al.*; BRASIL, 2011b).

Estudos que realizaram a comparação entre o MAT e ELISA demonstraram que a detecção de anticorpos pelo ELISA tem se tornado mais eficaz, no entanto, casos de falso-positivos foram observados (LEVETT; BRANCH, 2002; BAJANI *et al.*, 2003). Bajani *et al.* (2003), ainda relataram que quando utilizado na fase aguda, o teste de ELISA reduz sua sensibilidade, sendo de 95% na fase de convalescência e 52,7% na fase inicial da infecção, comprovando que o ELISA apresenta uma maior eficácia entre o sexto e o sétimo dia de sintoma. Dessa forma, são necessários mais estudos para o diagnóstico na fase aguda da leptospirose, permitindo que o paciente receba um tratamento correto, porque o tratamento quando empregado no curso inicial da doença impede que o paciente evolua para as formas mais graves (TOYOKAWA *et al.*, 2011).

No Ceará, a leptospirose tem sido notificada desde 1995, sendo que em 2008 foi registrado um surto em Várzea Alegre e em 2009, um dos anos com o maior número de casos confirmados no Estado, perdendo apenas para o ano de 1995, onde foram notificados 192 casos suspeitos, no qual 85 foram confirmados. No ano de 2010, 29 casos foram confirmados dentro dos 71 notificados (CEARÁ, 2011b). A partir destes dados, observa-se que a leptospirose tem estado presente no Ceará, mostrando que é uma doença de importância local, pois tem se mantido endêmica.

Segundo o Ministério da Saúde, são necessários apenas dois sintomas de dengue associados a febre para se considerar um caso suspeito de dengue, e quando estes sintomas são relatados pelos pacientes, o caso deve ser notificado à Vigilância Epidemiológica. Além disso, durante epidemias de dengue, o diagnóstico do paciente é realizado apenas por critério clínico-epidemiológico (BRASIL, 2010). Portanto, devido a dengue apresentar sintomas inespecíficos, é provável que muitos casos de dengue confirmados dessa forma, não sejam na verdade dengue e sim infecções causadas por outros agentes etiológicos, dentre eles, bactérias do gênero *Leptospira*.

No presente estudo, 86 pacientes recrutados foram avaliados para dengue. Quarenta e oito foram positivos para tal doença. Após todas as amostras terem sido testadas para infecção de dengue, 68 amostras de sessenta e oito pacientes, que tinham retornado para fazer a segunda coleta, foram submetidas à pesquisa de anticorpos IgM anti-*Leptospira* através dos testes imunoenzimático e imunocromatográfico. Cinco (7,3%) pacientes foram positivos na detecção de IgM através do ELISA e 1 (1,47%) foi positivo pelo teste imunocromatográfico. Dentre os pacientes positivos para leptospirose, três eram do sexo feminino e dois do sexo masculino. Apesar de um pequeno número amostral, estes dados não corroboram com os

dados da SESA, que relatou que 85,5% da população atingida são homens. Daher *et al.* (2010a), realizaram um estudo retrospectivo no Estado, e também, demonstraram a população masculina como a mais atingida. A média de idade entre os pacientes positivos foi de 32,4 anos, no entanto, como descrito anteriormente, neste estudo foram avaliados apenas pacientes acima de 18 anos. Porém, segundo a SESA, a faixa etária mais atingida está entre os pacientes de 20 a 49 anos (CEARÁ, 2011).

Em relação à distribuição mensal dos pacientes positivos para leptospirose, os mesmos encontraram-se distribuídos entre os meses de fevereiro a junho, período que de acordo com a SESA, é o momento no qual mais se notifica casos da doença (CEARÁ, 2011). Em um estudo que demonstra a ocorrência de chuvas e a incidência de leptospirose, Magalhães *et al.* (2009) demonstraram que a doença ocorre principalmente no período de maior precipitação, ou seja, entre fevereiro a maio, e que, em junho a doença ainda é registrada.

A partir destes resultados, podemos sugerir que pode estar ocorrendo uma subnotificação de leptospirose no Ceará, principalmente pela inespecificidade de sintomas e pelo fato de tanto dengue como leptospirose ocorrerem nos períodos chuvosos. Portanto, é necessário considerar a possibilidade de que quadros de leptospirose podem vir a ser confundidos com dengue (LEVETT *et al.*, 2000). É importante também orientar médicos e pacientes, que a leptospirose ocorre no mesmo ambiente e período em que a dengue ocorre, e que, os doentes devem ser cuidadosamente avaliados e monitorados. Estudos têm demonstrado a confusão do diagnóstico entre dengue e leptospirose e vice-versa na rotina médica, constituindo desta forma um grande problema para o manejo dos pacientes (SANDERS *et al.*, 1999; LEVETT *et al.*, 2000). O diagnóstico preciso e precoce é indispensável para a conduta clínica, visto que o tratamento apropriado dos pacientes acometidos por dengue ou leptospirose são bastante diferentes, e também para que se tomem medidas de vigilância epidemiológica e controle adequadas.

Brown *et al.* (2010), em um estudo de pesquisa de leptospirose em 590 pacientes com suspeita de dengue na Jamaica, demonstraram que 314 tiveram sorologia positiva para dengue e 27 apresentaram positividade para leptospirose. Souza *et al.* (2007), identificaram anticorpos anti-leptospira em pacientes com suspeita clínica de dengue e de hepatite, em um estudo realizado em Minas Gerais, sendo que dentre 215 amostras de pacientes com suspeita de dengue, 34 foram positivas para leptospirose e entre 224 amostras com suspeita de hepatite, sem confirmação diagnóstica de hepatite viral, 20 foram positivas para leptospirose.

O autor ainda ressalta a necessidade de alerta aos profissionais de saúde, de que, a leptospirose também é uma doença febril e que os testes específicos para cada infecção são fundamentais para o esclarecimento clínico e para as ações de vigilância epidemiológica. Mesmo com um pequeno número amostral para leptospirose, o presente estudo, corrobora com os dados de Brown *et al.* (2010) e Souza *et al.* (2007), mostrando que ocorrem confusões diagnósticas entre paciente dengue-símiles.

Além de confusões diagnósticas entre dengue e leptospirose, co-infecções com estas patologias, apesar de serem raras, podem acontecer (LEVETT *et al.*, 2000; BRUCE *et al.*, 2005). No presente estudo, dois pacientes foram positivos em testes laboratoriais para dengue e leptospirose sugerindo uma possível co-infecção, sendo o paciente VMA positivo na técnica RT-PCR para dengue e no ELISA-IgM para leptospirose. O paciente JBS foi positivo no ELISA-IgM tanto para dengue quanto para leptospirose. Vários estudos têm evidenciado que a co-infecção entre dengue e leptospirose é possível, demonstrando mais uma vez a necessidade de utilização de diagnósticos específicos para ambas as doenças (RELE *et al.*, 2001; BEHERA *et al.*, 2010; MEGUINS *et al.*, 2010). Rele *et al.* (2001), em um relato de caso realizado em Mumbai, demonstraram uma possível co-infecção por estas patologias, em duas pacientes que apresentavam quadro febril e com resultados positivos no teste de ELISA-IgM para dengue e leptospirose e negativos no MAT. Meguins *et al.* (2010) também relataram a co-infecção entre dengue e leptospirose em um estudo realizado na Amazônia, no qual um paciente apresentou resultados positivos para dengue, através do MAC-ELISA, e para leptospirose pelo teste ELISA-IgM e MAT. Os pacientes que apresentaram uma possível co-infecção no presente estudo foi atendido no ambulatório e não possuíam nenhum sinal de gravidade (como manifestações hemorrágicas) para ambas as doenças, sendo os sintomas mais relatados anorexia, mialgia, artralgia e prostração. Apesar dos pacientes terem apresentado resultados para as duas infecções, não se pode afirmar com certeza que foi realmente uma co-infecção, pois não foi realizado outro teste mais específico para leptospirose, como por exemplo, o MAT. Vale ressaltar, que os anticorpos IgM tanto contra dengue quanto contra leptospirose podem estar circulantes por um longo período (WINSLOW *et al.*, 1997; GUBLER, 1998). Entretanto, mesmo não realizando outras técnicas de diagnóstico, Behera *et al.* (2010) consideraram como co-infecção um paciente que possuiu positividade nos testes de ELISA para detecção de anticorpos anti-dengue e anti-*Leptospira*.

O teste de ELISA-IgM foi aplicado nas amostras coletadas no período entre o sexto e décimo dia de sintomas. Anticorpos da classe IgM na leptospirose começam a surgir a partir

do terceiro dia de infecção, podendo persistir até 5 meses (WINSLOW *et al.*, 1997). Assim, como todas nossas amostras foram colhidas a partir do quinto até o décimo dia de sintomas, com exceção de três pacientes que tiveram amostras colhidas no terceiro (2 pacientes) e no quarto dia (1 paciente) de infecção, todas estavam dentro deste intervalo de tempo, permitindo que ambos os testes fossem viáveis para detecção da doença. O kit de ELISA utilizado foi o PanBio[®], que possui sensibilidade apropriada, diminuindo a probabilidade de falso-negativos (ZOCHOWSKI *et al.*, 2001).

Dentre as amostras testadas para leptospirose, o teste de ELISA apresentou uma maior positividade quando comparado com o teste imunocromatográfico, detectando a leptospirose em 5 pacientes, enquanto o teste rápido detectou somente em um, não corroborando, desta forma, com trabalhos de Sehgal *et al.* (2003), que demonstraram em um estudo realizado na Índia, que o teste imunocromatográfico foi tão sensível quanto o ELISA. Sehgal *et al.* (2003) evidenciaram que quando os testes foram utilizados durante a fase de convalescência, a sensibilidade foi ainda maior (86%;87,7%).

Blacksell *et al.* (2006b), evidenciaram em um estudo realizado em Laos, que o teste rápido utilizado nas amostras de pacientes na fase de convalescência apresentou baixos resultados quando comparados ao ELISA-IgM (47,8%; 65,2%). No entanto, Blacksell *et al.* (2006b), ainda compararam os resultados do ELISA e do teste rápido ao MAT e observaram que o último foi o mais sensível, com 78,2% de sensibilidade, sugerindo que tanto o ELISA quanto o teste imunocromatográfico apresentaram baixos resultados. Cohen *et al.* (2007) demonstraram, a partir de um estudo na Tailândia com pacientes febris, que testes rápidos de captura de anticorpos contra dengue e contra leptospirose, apresentam boa sensibilidade apenas quando realizados na fase de convalescência, visto que, na fase aguda poucas amostras foram positivas para as doenças citadas anteriormente. O estudo ainda indicou o re-teste em pacientes que continuam com os sintomas, mas que foram negativos no primeiro diagnóstico seja realizado.

É de grande importância o estudo de diagnóstico para leptospirose, pois esta doença apresenta diversas manifestações clínicas assemelhando-se com outras infecções, dentre elas a dengue, e, apesar da existência de diferentes técnicas laboratoriais, cada uma com vantagens e desvantagens, poucas são utilizadas na detecção precoce da doença.

Os principais sintomas dos pacientes positivos para leptospirose neste estudo foram febre (100%), cefaléia (80%), dor retro-orbitária (40%), mialgia (80%), artralgia (60%), prostração (100%) e exantema (20%). Outros sinais e sintomas como anorexia, desidratação,

náuseas, vômitos, prurido, diarreia e tosse também foram relatados. Daher *et al.* (2010a) realizaram um estudo retrospectivo no Ceará e demonstraram que os principais sinais e sintomas foram febre (96,5%), cefaléia (74,6%), mialgia (92,5%), icterícia (94,5%), vômitos (71,6%), desidratação (63,5%) e calafrios (62,2%). Apesar da icterícia não ter sido evidenciada neste estudo, os achados deste trabalho corroboram com os dados de Daher *et al.* (2010a). Vale salientar, que dentre os 5 pacientes positivos para leptospirose 3 estavam internados, e que provavelmente tenham desenvolvido alguma das formas mais graves da leptospirose.

Os principais sinais e sintomas mais relatados entre os pacientes positivos para dengue foram cefaléia (89,5%), dor retro-orbitária (50%), mialgia (85,4%), artralgia (64,5%), prostração (56,2%) e exantema (53%). Observa-se que mesmo com maior frequência, estes mesmos sintomas foram relatados também pelos pacientes positivos para leptospirose, demonstrando a similaridade de sintomas entre estas infecções e corroborando com trabalhos de Brown *et al.* (2010) que também observaram a paridade de sintomas entre pacientes positivos para dengue e leptospirose.

Ao final do estudo, mesmo após a realização de diversas técnicas de diagnóstico para dengue e em seguida para leptospirose, 35/86 pacientes permaneceram negativos e sem nenhum diagnóstico etiológico específico e, portanto, foram classificados como pacientes com síndrome febril indiferenciada (SFI). Desta forma, pode-se sugerir que estes pacientes foram acometidos por outros agentes infecciosos que ocasionam um quadro clínico inespecífico semelhante ao de dengue ou leptospirose e que não foram estudados neste trabalho, ou até mesmo pelos agentes aqui estudados, mas que não conseguiram ser detectados pelas metodologias empregadas. Trabalhos têm mostrado confusão diagnóstica da dengue e leptospirose com outras patologias, como hantavirose, rubéola e influenza A, os quais podem estar sendo responsáveis por parte das síndromes febris e que aqui não foram diagnosticadas (SILVA, EVANGELISTA, 2010; LIMA *et al.*, 2011)

Continua um grande desafio para os profissionais de saúde, principalmente das regiões tropicais, um diagnóstico correto de uma dada infecção, visto que muitas enfermidades apresentam um quadro clínico semelhante. O diagnóstico demorado leva ao uso empírico de medicação diante da suspeita clínica, especialmente nos casos mais graves (ELLIS *et al.*, 2008).

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que, durante epidemias de dengue, outras infecções, dentre elas a leptospirose, são confundidas com a dengue. Mais

estudos, com o objetivo de contribuir para um maior conhecimento de prevalência das infecções humanas e da sintomatologia são necessários, pois o controle de certas doenças só é possível quando o agente etiológico é identificado, permitindo desta forma que medidas preventivas sejam tomadas.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados no presente estudo podemos concluir que:

- Dentre os testes diagnósticos para detecção de antígeno, o ELISA-NS1 apresentou uma maior positividade quando comparado ao RT-PCR;
- A glicoproteína NS1 foi identificada através do teste de ELISA, principalmente nos pacientes que estavam na fase inicial da doença, enquanto nos pacientes hospitalizados a positividade foi baixa;
- O teste NS1 imunocromatográfico apresentou uma baixa positividade, tanto nos pacientes de ambulatório e nos internados;
- O RT-PCR, apesar de ter sido capaz de detectar o RNA do vírus em apenas 16 pacientes, o mesmo identificou a infecção em pacientes hospitalizados que possuíam mais de cinco dias de sintomas iniciais;
- O sorotipo DENV-2 foi o mais encontrado entre os pacientes positivos no RT-PCR;
- Dentre os testes utilizados para detecção de anticorpo, o ELISA-IgM apresentou uma maior positividade, e pode-se sugerir que o teste imunocromatográfico para detecção de IgM também apresentou uma boa positividade, uma vez que apenas dois pacientes positivos no ELISA não tiveram o anticorpo detectado pelo teste rápido;
- A detecção de IgG foi bastante alta, 76,7%. Foi possível observar um número bastante elevado de pacientes positivos para IgG que relataram não ter tido dengue anteriormente;
- Foi observado que pode ocorrer confusão diagnóstica entre dengue e leptospirose no Estado do Ceará, devido à grande similaridade de sintomas e superposição da sazonalidade;
- Dentre os testes utilizados para detecção de leptospirose, o teste de ELISA-IgM apresentou uma maior positividade quando comparado ao teste imunocromatográfico;
- Demonstra-se a necessidade de mais pesquisas para detecção de dengue e leptospirose ainda no início da infecção, impedindo que o paciente evolua para as formas mais graves da doença, e, permitindo dessa forma, que sejam desenvolvidos programas de controle epidemiológico adequados para cada patologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELA-RIDDER, B.; SIKKEMA, R.; HARTSKEERL, R.A. Estimating the burden of human leptospirosis. **International Journal of Antimicrobial Agents** 36: S5-S7, 2010.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. de laPeña. *Leptospira* and Leptospirose. **Veterinary Microbiology** 140: 287-296, 2010.

AHMAD, S.M.; SHAH, S.; AHMAD, F.M.H. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine** 51: 195-200, 2005.

ALCON, F.; TALARMIM, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, M.; 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. **Journal of Clinical Microbiology** 40: 376–381, 2002.

ALVES, V.L.F. **Otimização de Teste Diagnóstico Molecular e Análise da Variabilidade Genética dos Diferentes Sorotipos do Vírus Dengue Baseado na Técnica Proposta por Lanciotti (1992)** 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

ARAÚJO, F.M.C.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G.A.; RAMALHO, I.L.C.; RORIZ, M.L.F.S.; *et al.* Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101: 925-928, 2006.

ARUNACHALAM, N.; TEWARI, S.C.; THENMOZHI, V.; RAJEDRAN, R.; PARAMASIVAN, R.; MANAVALAN, R.; *et al.* Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. **Indian Journal Medical Research** 127: 395-397, 2008.

ARUMUGAM, G.; JACOB, S.M.; ANITHA, D.; RAJAPPA, S.M. Occurrence of leptospirosis among suspected cases in Chennai, Tamil Nadu. **Indian Journal of Pathology & Microbiology** 50: 100- 102, 2011.

BAJANI, M.D.; ASHFORD, D.A.; BRAGG, S.L.; WOODS, C.W.; AYE, T.; SPIEGEL, R.A.; *et al.* Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology** 41: 803- 809, 2003.

BAL, A.M., Usual clinical manifestations of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine** 51: 179-183, 2005.

BANDYOPADHYAY, S.; LUM, L.C.S.; KROEGER, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue hemorrhagic fever. **Tropical Medicine and International Health** 8: 1238–1255, 2006.

BEHERA, B.; CHAUDHRY, R.; PANDEY, A.; MOAHAN, A.; DAR, L.; PREMLATHA, M.M.; *et al.* Co-infections due to leptospira, dengue and hepatitis E: a diagnostic challenge **Journal of Infection in developing countries** 4: 48- 50, 2010.

BESSOFF, K.; DELOREY, M.; SUN, W.; HUNSPERGER, E. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. **Clinical and Vaccine Immunology** 15: 1513-1518, 2008.

BESSOFF, K.; PHOUTRIDES, E.; DELOREY, M., Utility of a Commercial Nonstructural Protein 1 Antigen Capture Kit as a Dengue Virus Diagnostic Tool. **Clinical and Vaccine Immunology** 17: 949–953, 2010.

BHARAJ, P.; CHAHAR, H.S.; PANDEY, A.; DIDDI, K.; DAR, L.; GULERIA, R.; *et al.* Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. **Virology Journal** 5: 1-5, 2008.

BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Disease** 3: 757–771, 2003.

BINDER, W.D.; MERMEL, L. A. Leptospirosis in an urban setting: caso report and review of an emerging infectious disease. **The Journal of Emergency Medicine** 16: 851–856, 1998.

BLACKSELL, S. D.; NEWTON, P.N.; BELL, D.; KELLEY, J.; MAMMEN, M.P.; VAUGHN, D.W.; *et al.* The comparative accuracy of 8 commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection. **Clinical Infectious Diseases** 42: 1127-1134, 2006a.

BLACKSELL, S. D.; SMYTHE, L.; PHETSOUVANH, R.; DOHNT, M.; HARTSKEERL, R.; SYMONDS, M.; *et al.* Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* Immunoglobulin M Antibodies in Laos. **Clinical and Vaccine Immunology** 13: 1166–1169, 2006b.

BLACKSELL, S.D.; JARMAN, R.G.; BAILEY, M.S.; TANGANUCHITCHARNCHAI, A.; JENJAROEN, K.; GIBBONS, R.V.; *et al.* Evaluation of six commercial point-of-care tests for the diagnosis of acute dengue infections: The need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. **Clinical and Vaccine Immunology** Disponível em: <http://cvi.asm.org/content/early/2011/10/12/CVI.05285-11.abstract>. Acesso em: 19 out. 2011.

BOLLATI, M.; ALVAREZ, K.; ASSENBERG, R.; BARONTI, C; CANARD, B.; COOK, S.; *et al.* Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. **Antiviral Research** 87:125–148, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21922. Acessado em 08/05/2011a.

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

_____. **Guia Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico.** 7 ed.- Brasília: Ministério da saúde, 2011b – no prelo.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso** 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010.

_____. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 4 ed- Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

_____. Investigação de surto de leptospirose em Várzea Alegre-CE, em 2008. **Boletim eletrônico epidemiológico** Ano 08, nº20, 2008.

_____. Investigação de surto de leptospirose no município de Pacoti,Ceará, em 2009. **Boletim eletrônico epidemiológico** Ano 10, nº 09, 2010.

BROWN, M.G.; VICKERS, I.E.; SALAS, R.A.; SMIKLE, M.F. Leptospirosis in suspected cases of dengue in Jamaica, 2002- 2007. **Tropical Doctor** 40: 92-94, 2010.

BRUCE, M.G.; SANDERS, E.J.; LEAK, J.A.D.; ZAIDEL, O.; BRAGG, S.L.; AYE, T.; *et al.* Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. **Acta Tropica** 96: 36- 46, 2005.

BUDIONO, E.; SUMARDI; RIYANTO, B.S.; HISYAM, B.; HARTOPO, A.B. Pulmonary involvement predicts mortality in severe leptospirosis patients. **Acta Medica Indonesiana** 41: 11- 14, 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. **Journal of Medical Virology** 82: 1400-1405, 2010

CASTRO, J.R.; SALABERRY, S.R.S.; SOUZA, M.A.; LIMA-RIBEIRO, A.M.C., Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44: 217-222, 2011.

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

CAVALCANTI, L.P; VILAR, D.; SOUZA-SANTOS, R.; TEIXEIRA, M.G., Change in age pattern of persons with dengue, Northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases** 17: 132-134, 2011.

CEARÁ, Secretaria da Saúde do Estado. Boletim Eletrônico Epidemiológico de Dengue. Disponível em: <http://www.saude.ce.gov.br/site/index.php>. Acessado em: 05/05/2011a.

_____. Secretaria da Saúde do Estado. Boletim Eletrônico Epidemiológico de Leptospirose. Disponível em: <http://www.saude.ce.gov.br/site/index.php>. Acessado em: 10/06/2011b.

COHEN, A.L.; DOWELL, S.F., NISALAK, A.; MAMMEN, M.P.; PETKANCHANAPONG, W.; FISK, T.L. Rapid diagnostic tests for dengue and leptospirosis: antibody detection is insensitive at presentation. **Tropical Medicine & International Health** 12: 47- 51, 2007.

CHATERJI, S.; ALLEN, J.C.; CHOW, A., CHOW, A.; LEO, Y.S.; OOI, E.E., Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 84: 224–228, 2011.

CHUA, K.B.; MUSTAFA, B.; ABDUL WAHAB, A.H.; CHEM, Y.K.; KHAIRUL, A.H.; KUMARASAMY, V.; *et al.* A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on

single acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. **The Malaysian Journal of Pathology** 33: 13-20, 2011.

COELHO, M.S.Z.S.; MASSAD, E., The impact of climate on Leptospirosis in São Paulo, Brazil. **International Journal of Biometeorology** 55: 1-9, 2011.

CUNHA, R.V.; MIAGOSTOVICH, M.P.; PETROLA, Z.; ARAÚJO, E.S.M.; CORTEZ, V.; POMBO, V.; *et al.* Retrospective study on dengue in Fortaleza, state of Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 93: 155-159, 1998.

DAHER, E.F.; ZANETTA, D.M.T.; CAVALCANTE, M.B., ABDULKADER, R.C.R.M. Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 61: 630-634, 1999.

DAHER, E. F. ; SILVA JUNIOR, G.B. Leptospirose-Revisão da literatura e análise dos casos registrados no Ceará entre 1985 e 1998. **Revista Ceará Médico, Associação Médica Cearense** 13: 12-24, 2005.

DAHER, E.F.; MARQUES, C.N.; LIMA, R.S.A.; SILVA JÚNIOR, G.B.; BARBOSA, A.S.; BARBOSA, E.S.; *et al.* Acute kidney injury in an infectious disease intensive care unit – an assessment of prognostic factors. **Swiss Medical Weekly** 138: 128-133, 2008.

DAHER, E.F.; LIMA, R.S.A.; JÚNIOR, G.B.S.; SILVA, E.C.; KARBAGE, N.N.N.; KATAOKA, R.S.; *et al.* Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Disease** 14: 3-10, 2010a.

DAHER, E.F.; ABREU, K.L.S.; JÚNIOR, G.B.S. Insuficiência renal aguda associada à leptospirose. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** 32: 408- 415, 2010b.

DANTÉS, H.G.; WILLOQUET, J.R., Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. **Caderno de Saúde Pública** 25: 19-31, 2009.

DA-ROCHA, L.; TAUIL, P.. Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42:18-22, 2009.

DAS, S.; PINGLE, M.R.; MUÑOZ-JORDÁN, J.; RUNDELL, M.S.; RONDINI, S.; GRANGER, K.; *et al.* Detection and serotyping of dengue virus in serum samples by multiplex reverse transcriptase PCR–Ligase Detection Reaction Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 3276- 3284, 2008.

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

DE FIGUEIREDO, M.L.G.; GOMES, A.C., AMARILHA, A.A.; LEANDRO, A.S.; ORRICO, A.S.; ARAÚJO, R.F.; *et al.* Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virology Journal** 7: 152-156, 2010.

DIAS, J.P., TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; MENDES, M.C.; GUIMARÃES, P.; REIS, M.G.; KO, A.; BARRETO, M.L. Factors associated with *Leptospira sp* infection in a large urban center in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40: 499-504, 2007

DING, X.; HU, D.; CHEN, Y.; DI, B.; JIN, J.; PAN, Y.; *et al.* Full serotype and group-specific NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for rapid differential diagnosis of dengue virus infection. **Clinical and Vaccine Immunology** 18: 430-434, 2011.

DOMINGO, C.; NIEDRIG, M.; TEICHMAN, A.; KAISER, M.; RUMER, L.; JARMAN, R.G.; *et al.* 2nd International External Quality Control Assessment for the Molecular Diagnosis of Dengue Infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4: 833, 2010.

DOUDIER, B.; GARCIA, S.; QUENNEE, V.; JARNO, P.; BROUQUI, P. Prognostic factors associated with severe leptospirosis. **Clinical Microbiology and Infection** 12: 299- 300, 2009.

DUSSART, P.; PETIT, L.; LABEAU, B.; BREMAND, L.; LEDUC, A.; MOUA, D.; *et al.* Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. **Plos Neglected Tropical Disease** 2: 280, 2008.

DUTRA, N.R.; PAULA, M.B.; OLIVEIRA, M.D.; OLIVEIRA, L.L.; de PAULA, S.O. The laboratorial diagnosis of dengue: Applications and implications. **Journal of Global Infectious Diseases** 1: 38-44, 2009.

ELLIS, T.; IMRIE, A.; KATZ, A.R.; EFLER, P.V. Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001–2002. **Vector Borne and Zoonotic Diseases** 8: 541-547, 2008.

EVANGELISTA, K.V. & COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology** 5: 1413-1425, 2010.

FIGUEIREDO, L.T.M.; OWA, M.A.; CARLUCCI, R.H.; O., L., Estudo sobre diagnóstico laboratorial e sintomas do dengue, durante uma epidemia ocorrida na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** 34: 121-130, 1992.

FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue. Em "Tratado de Infectologia". Livraria Atheneu, São Paulo. Editores: Ricardo Veronesi e Roberto Focaccia, 343-356, 2005.

FORATINNI, O.P., Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus*(Skuse) no Brasil. **Revista de Saúde Pública** 20: 244-245, 1986.

FRY, S.R.; MEYER, M.; SEMPLE, M.G.; SIMMONS, C.P.; SEKARAN, S.D.; HUANG, X.G.; *et al.* The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. **Plos Neglected Tropical Disease** 5: 1199, 2011.

GARDELLA-GARCIA, C. E., PEREZ-RAMIREZ, G., NAVARRETE- ESPINOSA, J., CISNEROS, A.; JIMENEZ-ROJAS, F.; RAMÍREZ-PALACIOS,; *et al.* Specific genetic

markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico. **BMC Microbiology** 8: 117, 2008.

GIBBONS, R.V.; VAUGHN, D.W., Dengue: an escalating problem. **British Medical Journal** 324:1563-1566, 2002.

GREGORY, C.J.; SANTIAGO, L.M.; ARGÜELO, D.F.; HUNSPERGER, E.; TOMASHEK, K.M.. Clinical and laboratory features that differentiate dengue from other febrile illnesses in an endemic area- Puerto Rico, 2007–2008. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene** 82: 922-929, 2010.

GUBLER, D.J., Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases** 1: 55-57, 1995.

_____. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D.; KUNO, G. editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*: CAB International; 1-22, 1997.

_____. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews** 11: 480-496, 1998.

_____. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **TRENDS in Microbiology** 10: 100-103, 2002.

GUNASEKARAN, P.; KAVERI, K.; MOHANA, S.; ARUNAGIRI, K.; BABU, B.V.S.; PRIYA, P.P.; *et al.* Dengue disease status in Chennai (2006-2008): A retrospective analysis. **The Indian Journal of Medical Research** 133: 322-325, 2011.

GURUKUMAR, K.R.; PRIYADARSHINI, D.; PATIL, J.A.; BHAGAT, A.; SINGH, A; SHAH, P; CECILIA, D., Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. **Virology Journal** 6: 1-8, 2009.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G., Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 3: 621-627, 1996.

_____. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology** 27: 1-13, 2003.

_____. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases** 8: 69-80, 2004.

GUZMÁN, M.G.; HALSTEAD, S.B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D.J.; *et al.*, Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews** 8: 7-16, 2010.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R.E., Update on the global spread of dengue. **International Journal of Antimicrobial Agents** 36: 40-42, 2010.

HALSTEAD, S.B., Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. **Science** 239: 476- 480, 1988.

_____. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Revista Panamericana de Salud Pública** 6:407-15, 2006.

HANG, V.T.; NGUYET, N.M.; TRUNG, D.T.; TRICOU, V.; YOKSAN, S.; DUNG, N.M.; *et al.* Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **Plos Neglected Tropical Diseases** 3: e360, 2009.

HEMUNGKORN, M.; THISYAKORN, U.; THISYAKORN, C., Dengue infection: A growing global health threat. **BioScience Trends** 1: 90-96, 2007.

HENCHAL, E. A. & PUTNAK, R.. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews** 3: 376-396, 1990.

HILTON, R. Acute renal failure. **BMJ** 333: 786- 790, 2006.

HONARMAND, H.R.; ABDOLLAHPOUR, G.; ESHRAGHI, S.S., Comparison of two ELISA methods for the laboratory diagnosis of acute leptospirosis. **Iranian Journal of Medical Sciences** 35: 116-121, 2010.

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 Journal** 8:47, 2011.

HUNSPERGER, E.A.; YOKSAN, S.; BUCHY, P.; NGUYEN, V.C.; SEKARAN, S.D.; ENRIA, D.A.; *et al.* Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. **Emerging Infectious Diseases** 15: 436- 440, 2009.

JAHAN, F. Dengue Fever (DF) in Pakistan. **Asia Pacific Family Medicine** 10: 1, 2011.

JUNJHON, J.; EDWARDS, T.J.; UTAIPAT, U.; BOWMAN, V.D.; HOLDAWAY, H.A.; ZHANG, W.; *et al.*, Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. **Virology Journal** 84: 8353- 8358, 2010.

KALAYANAROOJ, S.; VAUGHN, D.W.; NIMMANNITYA, S.; GREEN, S.; SUNTAYAKORN, S.; KUNENTRASAI, N.; *et al.*, Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness. **The Journal of Infectious Diseases** 176: 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. **Journal of microbiology, immunology and infection** 38: 5-16, 2008.

KHAN, E.; MEHRAJ, V.; NASIR, A.; KHAN, N.A.; BILLOO, B.; MOATTER, T.; HASAN, R. Evaluation of two ELISA Assay Kits against RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection in a hospital setting in Karachi, Pakistan. **The Journal of the Pakistan Medical Association** 59: 390-394, 2009.

KO, A.L.; REIS, M.G.; DOURADO, C.R.M.; JOHNSON, W.D. Jr.; RILEY, L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *The Lancet* 354: 829-825, 1999.

KURANE, I., Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. ***Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease*** 30: 329-340, 2007.

LAI, Y.L.; CHUNG, Y.K.; TAN, H.C.; YAP, H.F.; YAP, G.; OOI, E.E.; NG, L.C., Cost-Effective Real-Time Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for dengue virus followed by Rapid Single-Tube Multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. ***Journal of Clinical Microbiology*** 45: 935-941, 2007.

LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J., CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V., Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. ***Journal of Clinical Microbiology*** 30: 545-551, 1992.

LEI, H.Y.; HUANG, K.J.; YEH, T.M.; LIU, H.S.; LIU, C.C. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. ***American Journal of Infectious Diseases*** 4: 1-9, 2008.

LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.M.; SALAS, R.; CHACON, I.V.; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R., Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. ***Journal of Virology*** 73: 4738-4747, 1999.

LEVETT, P.N.; WHITTINGTON, C.U., Evaluation of the Indirect Hemagglutination Assay for diagnosis of acute leptospirosis. ***Journal of Clinical Microbiology*** 36: 11-14, 1998.

LEVETT, P.N.; BRANCH, S.L.; EDWARDS, C.N. Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados. ***The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*** 62: 112- 114, 2000.

LEVETT, P.N., Leptospirosis. ***Clinical Microbiology Reviews*** 14: 296-326, 2001.

LEVETT, P.N.; BRANCH, S.L. Evaluation of two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene** 66: 745- 748, 2002.

LIMA, M.R.Q.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; de FILLIPS, M.B, LIMONTA, D.; SANTOS, F.B., A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. **PLOS Neglected Tropical Disease** 5: 1147, 2011.

LIMA, D.M.; SANTOS, G.B.; OLIVEIRA, A.C.A; FONTES, R.M.; COLARES, J.K.B.C.; ARAÚJO, F.M.C.A.; *et al.* Hantavirus infection in suspected dengue cases from Ceará State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44: 795-796, 2011.

LIMA, D.P.C.; SANTA ROSA, C.A. Inquérito sorológico para leptospirose no Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 16: 259-264, 1974.

LODEIRO, M.F.; FILOMATORI, C.V.; GAMARNIK, A.V., Structural and Functional Studies of the Promoter Element for Dengue Virus RNA Replication. **Journal of Virology** 83: 993-008, 2009.

MAGALHÃES, G.B. **Clima e saúde : relações entre os elementos atmosféricos e a dengue na região metropolitana de Fortaleza** 2011. Dissertação (Mestrado em Dinâmica Territorial e Ambiental). Departamento de Geografia, Universidade Federal do Ceará.

MAGALHÃES, G.B.; ZANELLA, M.E.; SALES, M. C. L.. A ocorrência de chuvas e a incidência de leptospirose em Fortaleza-CE. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde (Uberlândia)** 5: 77-87, 2009.

MALAVIGE, G.N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D.J.; SENEVIRATNE, S.L., Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal** 80: 588-601, 2004.

MARTINA, B.E.E.;KORAKA, P.; OSTERHAUS, A.D.M.E., Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. **Clinical Microbiology Reviews** 22: 564-581, 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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 43: 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. **Revista de Saúde Pública** 40: 737-739, 2006.

MATHEW, T.; SATISHCHANDRA, P.; MAHADEVAN, A.; NAGARATHNA, S.; YASHA, T.C.; CHANDRAMUKHI, A.; *et al.*, Neuroleptospirosis-revisited: experience from a tertiary care neurological centre from south India. **Indian Journal of Medical Research** 124: 155-162, 2006.

MEGUINS, L.C; JÚNIOR, H.O.M. Co-infecção por leptospirose e dengue em um paciente da Amazônia brasileira. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** 1: 97- 99, 2010.

MURGUE, B.; ROCHE, C.; CHUNGUE, E.; DEPARIS, X. Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996–1997 dengue-2 outbreak in French, Polynesia. **Journal of Medical Virology** 60:432–438, 2000.

NGA, T.T.T.; THAI, K.T.D., PHUONG, H.L.; GIAO, P.T.; HUNG, L.Q.; BINH, T.Q.; MAI, V.T.C.; *et al.*, Evaluation of Two Rapid Immunochromatographic Assays for Diagnosis of Dengue among Vietnamese Febrile Patients. **Clinical and Vaccine Immunology** 14: 799-801, 2007.

NISALAK, A.; ENDY, T. P.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANAROOJ, S.; THISAYAKORN, U.; SCOTT, R.M.; *et al.* Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. **The American journal of Tropical Medicine and Hygiene** 68: 191-202, 2003.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; SOUZA, R.W.; ZAGNE, S.M.O.; SCHATZMAYR, H.G., Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1:co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiology and Infection** 111: 163-170, 1993.

NOISAKRAN, S.; PERNG, G.C., Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/ Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. **Society for Experimental Biology and Medicine** 233, 401-408, 2008.

OPS, DENGUE: Guías de atención para enfermos en la región de las Américas. La Paz: OPS/OMS, 2010.

OSORIO, L.; RAMIREZ, M.; BONELO, A; VILLAR, L.A.; PARRA, B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. **Virology Journal** 7: 361, 2010.

PAHO, Dengue in the Americas. **Epidemiological Bulletin** 10: 1-8, 1989.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **International Society for Infectious Diseases** 12: 351-357, 2008.

PARIDA, M.M. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. **Journal of Biosciences** 33: 617-628, 2008.

PEELING, R.W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J.L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M.J.; DEVI, S.; *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology** 8: 30-38, 2010.

PERERA, R.; KUHN, R.J., Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology** 11: 369-377, 2008.

PEREZ, J.; GOARANT, C., Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. **BMC Microbiology** 10: 325, 2010.

POERSCH, C.O.; PAVONI, D.P.; QUEIROZ, M.H.; BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; SANTOS, C.N.D.; KRIEGER, M.A., Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology** 32: 272–277, 2005.

RELE, M.C.; RASAL, A., DESPANDE, S.D.; KOPPILAR, G.V.; LAHIRI, K.R. Mixed infection due to *leptospira* and dengue in a patient with pyrexia. **Indian Journal of Medical Microbiology** 19: 206- 207, 2001.

REYNES, J.M.; ONG, S.; MEY, C.; NGAN, C.; HOYER, S.; SALL, A.A. Improved molecular detection of dengue virus serotype 1 variants. **Journal of Clinical Microbiology** 41: 3864-3867, 2003.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation** 113: 946–951, 2004.

SALAEMAE, W.; JUNAID, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; KATZENMEIER, G., Structure-guided mutagenesis of active site residues in the dengue virus two-component protease NS2B-NS3. **Journal of Biomedical Science** 17: 68, 2010.

SAMSA, M.M.; MONDOTTE, J.A.; IGLESIAS, N.G.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; BARBOSA-LIMA, G.; Da POIAN, A.T.; BOZZA, P.T.; GAMARNIK, A.V., Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS Pathogens** 5: 1-14, 2009.

SAMUEL, P.P. & TYAGI, B.K., Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian Journal of Medical Research** 123: 615-628, 2006.

SAN MARTÍN, J.L.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLÓRZANO, J.A.; BOUCKENOOGHE, A.; DAYAN, G.H.; GUZMÁN, M.G. The Epidemiology of Dengue in

the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 82: 128-135, 2010.

SANDERS, E.J.; RIGAU-PÉREZ, J.G.; SMITS, H.L.; DESEDA, C.C.; VORNDAM, V.A., AYE, T.; *et al.* Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Ricco in 1996. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 61: 399-404, 1999.

SA-NGASANG, A.; WIBULWATTANAKIJ, S.; CHANAMA, S.; O-RAPINPATIPATI, A.; A-NUEGOONPIPAT, A.; ANANTAPREECHA, S.; SAWANPANYALERT, P.; KURANE, I. Evaluation of RT-PCR as a tool for diagnosis of secondary dengue virus infection. **Japanese Journal of Infectious Disease** 56: 205-209, 2003.

SA-NGASANG, A.; ANANTAPREECHA, S.; A-NUEGOONPIPAT, A.; CHANAMA, S.; WIBULWATTANAKIJ, S.; PATTANAKUL, K.; *et al.*, Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Epidemiology and Infection** 134: 820-825, 2006.

SANTOS, H.W.G.; POLONI, T.R.S.S.; SOUZA, K.P.; MULLER, V.D.M.; TREMESCHIN, F.; NALI, N.C.; *et al.*, A Simple One-Step Real-Time RT-PCR for Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Journal of Medical Virology** 80: 1426-1433, 2008.

SARKAR, U.; NASCIMENTO, S.F.; BARBOSA, R.; MARTINS, R.; NUEVO, H.; KALAFANOS, I.; *et al.*, Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 66: 605–610, 2002.

SAXENA, P.; DASH, P.K.; SANTHOSH, S.R.; SHRIVASTAVA, A.; PARIDA, M.; RAO, P.V.L.. Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. **Virology Journal** 5: 20-25, 2008.

SCHILLING, S.; LUDOLFS, D.; AN, L.V.; SCHMITZ, H., Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. **Journal of Clinical Virology** 31: 179-184, 2004.

SEHGAL, S. C.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; UMAPATHI, T. Field application of Lepto lateral flow for rapid diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology** 52, 897- 901, 2003.

SENEVIRATNE, S.L.; MALAVIGE, G.N.; SILVA, H.J., Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 100: 608-614, 2006.

SHEKATKAR, S.B.; HARISH, B.N.; MENEZES, G.A.; PARIJA, S.C., Clinical and serological evaluation of leptospirosis in Puducherry, Indian. **Journal of Infection in Developing Countries** 4: 139-143, 2010.

SHEPARD, D.S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y.A.; *et al.* Economic impact of dengue illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 84: 200-207, 2011.

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

SILVA, A.D.; EVANGELISTA, M.S.N. Syndromic surveillance: Etiologic study of acute febrile illness in dengue suspicious cases with negative serology. Brazil, Federal District, 2008. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 52: 237-242, 2010.

SILVA, F.G.; SILVA, S.J.S.; ROCCO, I.M.; SILVEIRA, V.R.; SUZUKI, A.; KATZ, G.; *et al.* Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue - São Paulo. **Bepa** 8: 14-26, 2011.

SINGH, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A., Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva. **Journal of Pediatrics** 83: 22-35, 2007.

SLACK, A. Leptospirosis. **The Australian Family Physician** 39: 495-498, 2010.

SOUZA, A.I.; NOGUEIRA, J.M.R.; PEREIRA, M.M. Anticorpos anti-*Leptospira* em pacientes de Mato Grosso do Sul com suspeita clínica de dengue ou hepatite viral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40: 431-435, 2007.

TASSINARI, W.S.; PELLEGRINI, D.C.P.; SABROZA, P.C.; CARVALHO, M.S. Distribuição espacial da leptospirose no Município do Rio de Janeiro, Brasil, ao longo dos anos de 1996-1999. **Caderno de Saúde Pública** 20: 1721-17129, 2004.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, M.L.; MOTA, E., Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Caderno de Saúde Pública** 21: 1307-1315, 2005.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N; BARRETO F., BARRETO, M.L., Dengue: Twenty-five years since reemergence in Brazil. **Caderno de Saúde Pública** 25: 7-18, 2009.

TEIXEIRA, M.G & BARRETO, M.L., Diagnosis and management of dengue. **British Medical Journal** 339: 1189–1193, 2009.

TELES, F. R. R.; PRAZERES, D. M. F.; LIMA-FILHO, J.L., Trends in dengue diagnosis. **Reviews in Medical Virology** 15: 287–302, 2005.

THAIPADUNPANIT, J.; CHIERAKUL, W.; WUTHIEKANUN, V.; LIMMATHUROTSAKUL, D; AMORNCHAI, P.; BOONSLIP, S.; *et al.*, Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and lipI32 Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. **PLoS ONE** 6: 1-6, 2011.

THOMAS, L.; VERLAETEN, O.; CABIÉ, A.; KAIKOMAR, S.; MORAVIE, V.; MARTIAL, J. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 78: 990-998, 2008.

TOYOKAWA, T.; OHNISHI, M.; KOIZUMI, N., Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert Review of Anti Infective Therapy** 9: 111-121, 2011.

TRICOU, V.; VU, H.T.T.; QUYNH, N.VN.; NGUEYN, C.VV.; TRAN, H.T.; FARRAR, J.; *et al.* Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **BMC Infectious Diseases** 10: 142, 2010.

UMAREDDY, I.; CHAO, A.; SAMPATH, A.; GU, F.; VASUDEVAN, S.G., Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **Journal of General Virology** 87: 2605-2614, 2006.

VALDÉS, K.; ALVAREZ, M.; PUPO, M; VÁZQUEZ, S.; RODRÍGUEZ, R.; GUZMÁN, M.G., Human Dengue Antibodies against Structural and Nonstructural Proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 7: 856–857, 2000.

VASCONCELOS, P.F.C.; MENEZES, D.B.; MELO, L.P.; PESSOA, E.T.F.P.; RODRIGUES, S.G., DA ROSA, E.S.T.; *et al.*, A Large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará state, Brazil, 1994. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** 37: 253-255, 1995.

VASCONCELOS, P.F.C.; LIMA, J.W.O.; DA ROSA, A.P.A.T.; TMBÓ, M.J.; DA ROSA, E.S.T.; LIMA, H.R.; *et al.*, Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soropidemiológico aleatório. **Revista de Saúde Pública** 32: 447-54, 1998.

VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; KALAYANAROOJ, S.; SOLOMON, T.; DUNG, N.M.; CUZZUBBO, A.; DEVINE, P.L. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Clinical Microbiology** 36: 234- 238, 1998.

VELATHANTHIRI, V.G.N.S.; FERNANDO, S.; FERNANDO, R.; MALAVIGE, G.N.; PEELAWATHTHAGE, M.; JAYARATNE, S.D.; AASKOV, J. Comparison of serology, virus isolation and RT-PCR in the diagnosis of dengue viral infections in Sri Lanka. **Dengue Bulletin** 30: 191-196, 2006.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; SHRIRAM, A.N., Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Bioscience** 33: 557-569, 2008.

VILLUMSEN, S.; PEDERSEN, R.; KROGFELT, K.A.; JENSEN, J.S. Expanding the diagnostic use of PCR in leptospirosis: Improved method for DNA extraction from blood cultures. **Plos One** 5: e12095, 2010.

WANG, S.M. & SEKARAN, S.D., Evaluation of a Commercial SD Dengue Virus NS1 Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Early Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Journal of Clinical Microbiology** 48: 2793-2797, 2010.

WATTS, D. M.; PORTER, K. R.; PUTVATANA, P.; VASQUEZ, B.; CALAMPA, C.; HAYES, C. G.; HALSTEAD, S. B. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever. **The Lancet** 354: 1431-1434, 1999.

WHITEHORN, J. & FARRAR, J., Dengue. **British Medical Bulletin** 95: 161-173, 2010.

WINSLOW, W.E.; MERRY, D.J.; PIRC, M.L.; DEVINE, P.L. Evaluation of a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. **Journal of Clinical Microbiology** 35: 1938- 1942, 1997.

WHO. Dengue, dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome in the context of the Integrated Management of Childhood Illness. Geneva, World Health Organization (WHO/FCH/CAH/05.13), 2005.

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

_____. Dengue. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/dengue/disease.htm>. Acessado em 05/05/2011a.

_____.Leptospirosis. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/leptospirosis/en/. Acessado em 10 de maio de 2011b.

_____. Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf> Acessado em: 12/05/2011c.

WU, S.J.; PAXTON, H.; HANSON, B.; KUNG, C.G.; CHEN, T.B.; ROSSI, C.; VAUGHN, D.W.; *et al.* Comparison of two rapid diagnostic assays for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. **Clinical and Diagnostic laboratory Immunology** 7: 106- 110, 2000.

YONG, Y. K.; THAYAN, R.; CHONG, H. T.; TAN, C. T.; SEKARAN, S. D., Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. **Singapore Medical Journal** 48: 662-668, 2007.

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. **Journal of Clinical Microbiology** 38: 1053-1057, 2000.

ZOCHOWSKI, W. J.; PALMER, M. F.; COLEMAN, T. J. An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK. **Journal of Clinical Pathology** 54: 25- 30, 2001.

ZOU, G.; CHEN, Y.L.; DONG, H.; LIM, C.C.; YAP, L.J.; YAU, Y.H.;*et al.*, Functional analysis of two cavities in flavivirus NS5 polymerase. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology** 286: 14362-14372, 2011.

ZUNINO, E.M. & PIZARRO, R.P., Leptospirosis. Puesta al dia. **Revista Chilena de Infectología** 24: 220-226, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

Coordenador do Projeto: Danielle Malta Lima
Grupo de investigadores: Jeová Keny Baima Colares
Danielle Malta Lima
Almira Monteiro
Laiane Fernanda de M. Bezerra

CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

A dengue é uma doença causada por um vírus, o vírus Dengue, e acomete milhões de pessoas no mundo inteiro. No Brasil, a dengue vem aumentando a cada ano e apesar da grande quantidade de estudos já realizados, ainda existem muitas dúvidas a respeito da doença, como por exemplo, não há um método de diagnóstico rápido, não há um tratamento eficaz para os sintomas causados pelo vírus dengue. Nosso trabalho tem como objetivo estudar os diferentes métodos de diagnóstico e as alterações causadas pelo vírus em nosso organismo. No sangue que você esta doando iremos fazer o diagnóstico de dengue e conseguiremos quantificar com exatidão quantos vírus dengue estarão presentes no seu sangue. Para que com isso, torne o diagnóstico mais rápido e eficaz, contribuindo para um diagnóstico mais precoce.

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste trabalho que estamos desenvolvendo. Caso concorde em participar do estudo, você deverá apenas permitir a realização de uma entrevista, seguida da coleta de 1 amostra de sangue (contendo 5ml de sangue) que vai durar no máximo 1/2 h. E uma segunda coleta será necessária depois de cinco dias contando da data da sua primeira coleta. O único desconforto será a picada da agulha, e em alguns casos poderá ocorrer a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local de onde foi retirado o sangue. Entretanto, faremos todo o possível para que isto não aconteça. Em resumo, neste estudo não está previsto nenhum tipo de dano, e poderá ajudar a entender melhor de que modo o vírus dengue age no organismo humano.

As amostras de sangue serão enviadas para o laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina, e o resultado do exame lhe será comunicado assim que possível. As amostras de sangue serão utilizadas apenas para esta a pesquisa.

Sua participação é voluntária, e sua identidade será preservada e não aparecerá em momento algum nos resultados do estudo. Não há obrigatoriedade alguma em participar deste estudo. Se você decidir não participar, o seu seguimento e tratamento nesta unidade não sofrerão prejuízo algum.

Você não receberá nenhum pagamento por sua participação nesta investigação, mas você estará ajudando a entender melhor sobre essa doença.

Qualquer dúvida, favor entrar em contato com Danielle Malta Lima no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina pelo telefone (0xx85) 33668310/33668311, ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas (0xx85) 34527880.

Mais uma vez, informamos que a participação neste estudo é completamente voluntária e você pode deixá-lo a qualquer momento.

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Reconheço que a minha participação é voluntária.

De acordo:

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Testemunha: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Telefones para contato: _____

Fortaleza, ___ / ___ / ____



Paciente
Impressão digital

APÊNDICE B – FICHA DE AVALIAÇÃO INICIAL E SUBSEQUENTE

Data da consulta ___ / ___ / _____ Número _____

MÉDICO: Dr.(a) _____

Projeto Dengue 2010
Ficha de Avaliação Inicial (1º ao 5º dia)

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____
Endereço: _____ Bairro: _____
Cidade: _____ Estado: _____ Telefone: () _____

OBS: Autoriza a ligação para sua residência para informar os resultados dos exames: Sim Não

Critérios de inclusão:

- Febre \leq 5 dias? Sim Não Data início da febre: ___/___/___
- Internado no HSJ? Sim Não Data início da febre: ___/___/___
- Mínimo de 2 dos critérios abaixo (assinale):

Cefaléia Dor retroorbitária Mialgias Artralgias Prostração Exantema

Critérios de exclusão:

Gestante < 18 anos Uso de imunossupressores Não concordou
 Possuir sinais de localização que sugiram outra etiologia (ex: influenza, gastroenterite, amigdalite, etc)

Manifestações clínicas:

Desidratação Edema Derrame pleural Ascite Prurido Anorexia
 Náuseas Vômitos Meningismo Diarréia Icterícia Palpitações
 Rinorréia Tosse Expectoração Dispnéia Dor de garganta
 Outras: _____

Manifestações hemorrágicas: Não

Gengivorragia Epistaxe Equimoses Petéquias Hematúria
 Metrorragia Hematêmese Melena
❖ Prova do laço: Positiva Negativa Não realizada
 Outras: _____

Antecedentes:

Dengue Período: _____ Internação? Sim Não Data: ___/___/___
 Familiares/vizinhos com sintomas semelhantes Contato com ratos/enxurradas
 Viagem últimos 30 dias Local: _____ Período: _____
 HAS Cardiopatia IRA/IRC DM DPOC Asma Anemia falciforme HIV/Aids
 Doença péptica Auto-ímmunes Outros: _____ RG HSJ: _____
 AINE Anti-agregantes Anticoagulantes Anti-hipertensivos

Sinais de alarme: Não

Dor abdominal intensa Vômitos persistentes \downarrow PA postural/hipotímia Oligúria
 Hemorragia importante Sonolência/irritabilidade Hepatomegalia dolorosa \downarrow temp/hipotermia
 \uparrow abrupto hematócrito \downarrow abrupta plaquetas Desconforto respiratório Derrames cavít.

Sinais de choque: Não

Hipotensão ($PA_{max} < 90$ mmHg) PA convergente (diferencial < 20mmHg) Pulso rápido e fino
 Extremidades frias/cianose Enchimento capilar lento (> 2 seg)

Complicações: Não Neurológicas Disfunção cardio-respiratória Hepáticas Hemorragias
Leucopenia (GB < 1000 Plaquetopenia (Plaq < 50000) Outras: _____

Data da consulta ___ / ___ / _____

Número _____

MÉDICO: Dr.(a) _____

Projeto Dengue 2010

Ficha de Avaliação Subsequente

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____
 Endereço: _____ Bairro: _____
 Cidade: _____ Estado: _____ Telefone: () _____

Controle:

- Data início da febre: ___ / ___ / ___ (D= ___)
- Data início da avaliação inicial: ___ / ___
- Data 1ª coleta: ___ / ___ (Se diferente da data anterior)
- Data 2ª coleta: ___ / ___ (Se diferente da data de hoje)

Manifestações clínicas adicionais (Não presentes na avaliação inicial): Não

- | | | | | | |
|--|-----------------------------------|---|-------------------------------------|--|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Cefaléia | <input type="checkbox"/> Mialgias | <input type="checkbox"/> Dor retroorbítaria | <input type="checkbox"/> Artralgias | <input type="checkbox"/> Prostração | <input type="checkbox"/> Exantema |
| <input type="checkbox"/> Desidratação | <input type="checkbox"/> Edema | <input type="checkbox"/> Derrame pleural | <input type="checkbox"/> Ascite | <input type="checkbox"/> Prurido | <input type="checkbox"/> Anorexia |
| <input type="checkbox"/> Náuseas | <input type="checkbox"/> Vômitos | <input type="checkbox"/> Meningismo | <input type="checkbox"/> Diarréia | <input type="checkbox"/> Icterícia | <input type="checkbox"/> Palpitações |
| <input type="checkbox"/> Rinorréia | <input type="checkbox"/> Tosse | <input type="checkbox"/> Expectoração | <input type="checkbox"/> Dispnéia | <input type="checkbox"/> Dor de garganta | |
| <input type="checkbox"/> Outras: _____ | | | | | |

Manifestações hemorrágicas (Durante todo o caso): Não

- | | | | | | |
|---|--|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Gengivorragia | <input type="checkbox"/> Epistaxe | <input type="checkbox"/> Equimoses | <input type="checkbox"/> Petéquias | <input type="checkbox"/> Hematúria |
| <input type="checkbox"/> Metrorragia | <input type="checkbox"/> Hematêmese | <input type="checkbox"/> Melena | | | |
| ❖ Prova do laço: <input type="checkbox"/> Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/> Não realizada | | | | | |
| <input type="checkbox"/> Outras: _____ | | | | | |

Sinais de alarme (Durante todo o caso): Não

- | | | | |
|--|--|---|--|
| <input type="checkbox"/> Dor abdominal intensa | <input type="checkbox"/> Vômitos persistentes | <input type="checkbox"/> ↓ PA postural/lipotímia | <input type="checkbox"/> Oligúria |
| <input type="checkbox"/> Hemorragia importante | <input type="checkbox"/> Sonolência/irritabilidade | <input type="checkbox"/> Hepatomegalia dolorosa | <input type="checkbox"/> ↓ temp/hipotermia |
| <input type="checkbox"/> ↑ abrupto hematócrito | <input type="checkbox"/> ↓ abrupta plaquetas | <input type="checkbox"/> Desconforto respiratório | <input type="checkbox"/> Derrames cavit. |

Sinais de choque (Durante todo o caso): Não

- | | | |
|--|--|--|
| <input type="checkbox"/> Hipotensão ($PA_{max} < 90\text{mmHg}$) | <input type="checkbox"/> PA convergente (diferencial $< 20\text{mmHg}$) | <input type="checkbox"/> Pulso rápido e fino |
| <input type="checkbox"/> Extremidades frias/cianose | <input type="checkbox"/> Enchimento capilar lento ($> 2\text{ seg}$) | |

Complicações (Durante todo o caso): Não

- | | | | |
|---|---|------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Neurológicas | <input type="checkbox"/> Disfunção cardio-respiratória | <input type="checkbox"/> Hepáticas | <input type="checkbox"/> Hemorragias |
| <input type="checkbox"/> Leucopenia ($GB < 1000$) | <input type="checkbox"/> Plaquetopenia ($Plaq < 50000$) | | |
| <input type="checkbox"/> Outras: _____ <input type="checkbox"/> Detalhes: _____ | | | |

Evolução (Desde primeira avaliação):

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Observação $< 24\text{h}$ | <input type="checkbox"/> Observação $> 24\text{h}$ | <input type="checkbox"/> Consultas emergenciais: n= _____ |
| <input type="checkbox"/> Internamento hospitalar | <input type="checkbox"/> Internamento UTI | <input type="checkbox"/> Atendimento fora do HSJ |
| <input type="checkbox"/> Outras: _____ <input type="checkbox"/> Detalhes: _____ | | |

MAC ELISA:	<input type="checkbox"/> positivo	<input type="checkbox"/> negativo	<input type="checkbox"/> não realizado
IgG ELISA:	<input type="checkbox"/> positivo	<input type="checkbox"/> negativo	<input type="checkbox"/> não realizado
Isolamento viral:	<input type="checkbox"/> positivo	<input type="checkbox"/> negativo	<input type="checkbox"/> não realizado
NS1:	<input type="checkbox"/> positivo	<input type="checkbox"/> negativo	<input type="checkbox"/> não realizado
RT-PCR:	<input type="checkbox"/> positivo	<input type="checkbox"/> negativo	<input type="checkbox"/> não realizado

ANEXOS

ANEXO A – PARACER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HSJ.

	GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ SECRETARIA DA SAÚDE	HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECIOSAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)		
Protocolo Nº 031/2009	CAAE:0033.0.042.000-09	
Título do Projeto: "Diagnóstico alternativos em pacientes com suspeita de dengue com testes imunológicos e virológicos negativos"		
Instituições envolvidas: Hospital São José de Doenças Infecciosas Universidade Federal do Ceará-UFC		
Pesquisadora Responsável: Dra. Danielle Malta Lima		
PARECER CONSUBSTANCIADO		
Analisamos o projeto em questão, em reunião ordinária do dia 27 de julho de 2009. O estudo tem como objetivo geral pesquisar os agentes etiológicos: Febre Amarela, Hantavirose, Mayaro, Orupouche e Leptospirose em pacientes o diagnóstico de Dengue negativo através de testes sorológicos e virológicos.		
A pesquisa será realizada nos ambulatórios de e na enfermaria do Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) pelo médico infectologista Dr. Jeová Keny Baima Colares. Os pacientes serão recrutados por busca ativa de casos, dentre homens e mulheres, com idade igual ou superior a 18 anos, apresentando quadro febril, associado a pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaléia, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia e exantema, atendidos no HSJ. O projeto foi submetido ao edital do "Programa Primeiro Projetos" – PPP/FUNCAP/CNPq, EDITAL FUNCAP 04/2009 e aguarda financiamento. Os aspectos éticos foram mencionados.		
O projeto está bem escrito, segue uma seqüência lógica e apresenta-se congruente com o método científico. Além disso, tem potencial para trazer grandes benefícios para melhoria do diagnóstico diferencial da dengue com relação a agentes etiológicos causadores de doenças importantes tais como a Febre Amarela, as Hantavíroses e a Leptospirose.		
Diante do exposto, o projeto foi considerado APROVADO .		
Lembramos a necessidade do envio de relatório do andamento do projeto (primeiro para 27 de julho de 2010) e de relatório final quando de sua conclusão, além de que qualquer mudança na proposta do estudo, deverá passar por uma prévia avaliação deste comitê. Outrossim, comunicamos que, mensalmente, o CEP-HSJ está monitorando pesquisas em execução no Hospital São José de Doenças Infecciosas escolhidas aleatoriamente.		
Fortaleza, 15 de agosto de 2009.		
Dr. Roberto Dias Leite Coordenador do CEP/HSJ		
Rua Nestor Barbosa, 315 - Parquiândia - Fortaleza / Ceará CEP 80.455-410 FAX (85) 3101.2363 FAX (85) 3101.2318 e-mail: hsj@hsj.ce.gov.br		

ANEXO B – NÚMERO DE PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HSJ.

	GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ SECRETARIA DA SAÚDE	HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECIOSAS
--	--	--

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)

Ofício Nº 064/2009

Fortaleza, 15 de agosto de 2009

Referente ao protocolo Nº 031/2009

CAAE: 0033.0.042.000-09

Título do Projeto: "Diagnóstico alternativo em pacientes com suspeita de dengue co testes imunológicos e virológicos negativos"

Instituição envolvida: Hospital São José de Doenças Infecciosas
Universidade Federal do Ceará-UFC

Pesquisador Principal : Dra. Danielle Malta Lima

Senhor Diretor,

Levamos ao conhecimento de V. Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas (CEP-HSJ), dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos do Conselho Nacional de Saúde, Resolução Nº 196 de outubro de 1996, publicada no Diário Oficial da União em 16 de outubro de 1996, aprovou o projeto em apreço na reunião ordinária no dia 27 de julho de 2009. Sem mais para o momento subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Dr. Roberto Dias Leite
Coordenador do CEP-HSJ

Ismo Sr.
Dr. Anastácio de Queiroz Sousa
Diretor Geral
Nesta

Rua Nestor Barbosa, 315 - Parque Indú - Fortaleza / Ceará
CEP 62.435-610 FONE (85) 3181.1363 FAX (85) 3181.2109
e-mail: hsj@hsj.ufc.br

