



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

**RAISSA MATOS FONTES**

**IDENTIFICAÇÃO DE CASOS DE LEPTOSPIROSE E HANTAVIROSE EM PACIENTES  
COM SUSPEITA CLÍNICA DE DENGUE NO CEARÁ**

**FORTALEZA**

**2014**

RAISSA MATOS FONTES

IDENTIFICAÇÃO DE CASOS DE LEPTOSPIROSE E HANTAVIROSE EM PACIENTES  
COM SUSPEITA CLÍNICA DE DENGUE NO CEARÁ

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.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Malta Lima  
Co-orientador: Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares

FORTALEZA

2014

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

---

F682i Fontes, Raissa Matos.  
Identificação de casos de leptospirose e hantavirose em pacientes com suspeita clínica de dengue no Ceará / Raissa Matos Fontes. – 2014.  
124 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, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Patologia.  
Orientação: Profa. Dra. Danielle Malta Lima.  
Coorientação: Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares.

1. Dengue. 2. Leptospirose. 3. Hantavírus. 4. Diagnóstico Diferencial. I. Título.

---

CDD 614.571

RAISSA MATOS FONTES

IDENTIFICAÇÃO DE CASOS DE LEPTOSPIROSE E HANTAVIROSE EM PACIENTES  
COM SUSPEITA CLÍNICA DE DENGUE NO CEARÁ

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 01/04/2014

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Danielle Malta Lima (Orientadora)

Universidade de Fortaleza - UNIFOR

---

Dra. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo

Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará - LACEN

---

Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Maria Jânia Teixeira

Universidade Federal do Ceará - UFC

À minha mãe que sempre trabalhou em prol dos meus estudos e nunca mediu esforços para a realização dos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos derramadas na minha vida e na elaboração deste trabalho.

Ao Curso de Pós Graduação em Patologia, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Dra. Danielle Malta Lima, pelos inúmeros conhecimentos passados, pelo carinho, atenção e cuidado com a minha carreira profissional e emocional e por sempre me encorajar a acreditar em mim mesma e me fazer buscar as melhores oportunidades.

Ao meu co-orientador, Dr. Jeová Keny Baima Colares, pelos excelentes comentários e sugestões neste trabalho.

Às professoras Margarida Maria de Lima Pompeu e Maria Jânia Teixeira, pelo grande aprendizado de conhecimentos e valores.

Aos professores do Curso de Pós Graduação em Patologia, pelo rico conhecimento transmitido, que tanto me ajudaram no meu conhecimento intelectual e profissional.

Aos professores do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC.

Ao Centro de Virologia da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto, especialmente Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca e Dr. Luís Tadeu Moraes Figueiredo, pela colaboração em etapas importantes da minha dissertação.

Ao Gilberto Sabino pela grande troca de conhecimentos e pela grande ajuda prestada durante as etapas realizadas na USP.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Desenvolvimento da Universidade de Fortaleza, especialmente Dra. Luciana Relly Bertolini e Dr. Marcelo Bertolini, por ceder espaço para a realização de parte dos experimentos.

Ao Laboratório Central (LACEN), especialmente a Dra. Fernanda Montenegro.

Aos funcionários do Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), dentre eles os médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem e bioquímicos.

Aos pacientes participantes deste estudo, sem eles não seria possível a realização desta pesquisa.

À Paula e à Valéria, secretárias da Coordenação do Curso de Pós Graduação em Patologia, que sempre estavam dispostas a esclarecer minhas dúvidas.

Aos meus pais, Niza Matos e Antônio Fontes, por terem investido na minha educação.

Ao meu irmão Neto Fontes, pelo carinho e apoio, além de ser um exemplo na minha vida.

Ao meu namorado, Luís Henrique de Aguiar, que sempre confiou no meu potencial profissional e revisou as referências bibliográficas deste trabalho comigo.

À Lucineide, técnica do laboratório, pelo árduo trabalho de manutenção do laboratório e dos materiais utilizados nos experimentos.

À Claudênia Costa Praciano, pela grande ajuda física e psicológica durante toda a minha vida acadêmica.

Aos amigos de laboratório: Alan Rodrigo, Sayonara Melo, Priscila Veras, Dyana Alves, Cícera Lazzarotto, Igor Sá, Kaio Tavares, Anderson Almeida, pelos conhecimentos e pela amizade construída ao longo dos dias.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.” (Marthin Luther King)



## RESUMO

A dengue é considerada a mais importante arbovirose no mundo em termos de morbimortalidade, causando 50 a 270.000.000 de infecções por ano, dos quais 2.000.000 de casos evoluem para as formas mais graves e 21.000 resultam em morte. As manifestações clínicas variam desde formas assintomáticas e síndrome febril indiferenciada a quadros hemorrágicos graves. Considerando-se que a dengue possui um amplo e inespecífico espectro clínico, torna-se difícil distingui-la de outras doenças, utilizando apenas critérios clínicos e epidemiológicos. Há uma grande prevalência de pacientes com quadro de dengue não confirmado laboratorialmente em epidemias, havendo necessidade de pesquisar outros possíveis agentes etiológicos responsáveis por estes casos a fim de se adotar medidas terapêuticas precoces e efetivas. O presente estudo apresentou como objetivo identificar casos de leptospirose e hantavirose nos pacientes com quadro dengue-símile. Foram avaliados 93 pacientes, com quadro clínico de dengue, atendidos em hospital de referência no Estado do Ceará, no período de janeiro a setembro de 2012. As amostras foram avaliadas para dengue através do teste imunocromatográfico NS1, ELISA-IgM e RT-PCR. As amostras negativas para dengue foram testadas para leptospirose, através de ELISA-IgM e PCR, e para hantavirose, através da reação de RT-PCR. Todas as amostras do estudo foram testadas para hantavírus através de ELISA-IgM e ELISA-IgG. Dos 93 pacientes avaliados para dengue, 48 (51,6%) foram positivos por pelo menos um dos testes utilizados. Dos 45 pacientes com resultados negativos para dengue, 13 (28,8%) foram positivos para leptospirose, sendo 5 por ELISA IgM e 8 por PCR. Um (1,07%) paciente foi positivo para hantavírus, através de ELISA IgM e 30 (31,6%) foram positivos pelo ELISA-IgG. Trinta e dois (32,2%) pacientes permaneceram negativos nos testes realizados para dengue, leptospirose e hantavírus, não tendo sua etiologia revelada. Desta forma, em epidemias de dengue, os casos de leptospirose e hantavirose podem estar sendo subdiagnosticados e confundidos com a dengue, levando a tratamentos inadequados. Além destes, outros agentes etiológicos devem estar envolvidos, sendo necessárias maiores investigações para se definir suas etiologias e as reais prevalências dessas patologias no Estado.

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

## ABSTRACT

Dengue is considered the most important arbovirus in the world in terms of morbidity and mortality, causing 50-270,000,000 infections per year, of which 2,000,000 cases progress to more severe forms and 21,000 result in death. Clinical manifestations range from asymptomatic and undifferentiated febrile syndrome to severe hemorrhagic. Considering that dengue has a wide range and nonspecific clinical spectrum, it is difficult to distinguish it from other diseases, using only clinical and epidemiological criteria. There is a high prevalence of patients with a non-laboratory confirmed dengue in epidemics, there is a need to investigate other possible etiologic agents responsible for these cases in order to take early and effective therapeutic measures. This study aimed to identify cases of leptospirosis and hantaviruses in patients with dengue-like syndrome. Therefore, we evaluated 93 patients, with clinical suspicion of dengue, recruited during January-September in 2012, in the State of Ceará. The samples were tested for dengue through NS1 immunochromatographic, ELISA-IgM and RT-PCR. Dengue negative samples were tested for leptospirosis, through ELISA-IgM and PCR, and for hantaviruses, through RT-PCR. All the samples from this study were tested for hantavirus by ELISA-IgM and ELISA-IgG. Of the 93 patients evaluated for dengue, 48 (51,6%) were positive for at least one of the tests. Of the remaining 45 patients with negative results for dengue, 13 (28,8%) patients were positive for leptospirosis, 5 by ELISA-IgM and 8 by PCR. One (1,07%) patient was positive for hantavirus by ELISA IgM and 30 (31,6%) were positive by ELISA-IgG. Thirty two (32,2%) patients remained negative in tests for dengue, leptospirosis and hantavirus, not having revealed its etiology. Thus, in epidemics of dengue, leptospirosis and hantaviruses cases were underdiagnosed and confused with dengue, leading to inappropriate treatment. Besides these, other etiologic agents should be involved, requiring further investigation to define its etiology and the actual prevalence of these pathologies in State.

**Keywords:** dengue, leptospirosis, hantavirus, febrile syndrome, differential diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Áreas de risco pela infecção do vírus dengue.	19
<b>Figura 2</b> - Gráfico de distribuição da incidência dos casos de dengue no Estado do Ceará desde a sua primeira epidemia.	21
<b>Figura 3</b> - Percentual de isolamento para dengue por sorotipo viral no Ceará.	22
<b>Figura 4</b> - Estrutura genômica do vírus dengue.	24
<b>Figura 5</b> - <i>Aedes aegypti</i> durante repasto sanguíneo.	25
<b>Figura 6</b> - Nova classificação de dengue e seus sinais de alerta.	28
<b>Figura 7 - A:</b> Dengue vírus, antígeno e resposta de anticorpo usado no diagnóstico. <b>B:</b> Comparação dos testes diagnósticos em relação à confiança e à acessibilidade.	32
<b>Figura 8</b> - Comparação da resposta primária e secundária em relação à produção dos anticorpos.	33
<b>Figura 9</b> - Gráfico com o número de casos confirmados de leptospirose no Brasil por região, entre 1997 e 2009.	36
<b>Figura 10</b> - Casos confirmados de leptospirose no Ceará, entre 1995 e 2010.	37
<b>Figura 11</b> - Fotomicrografia de <i>Leptospira sp.</i> , demonstrando sua forma helicoidal.	38
<b>Figura 12</b> - Cinética da leptospirose.	42
<b>Figura 13</b> - Distribuição global de hantavírus: FHSR e SPCVH.	44
<b>Figura 14</b> - Distribuição geográfica dos casos de hantavirose ocorridos no Brasil, entre 1993 e 2001.	45
<b>Figura 15</b> - Representação esquemática de uma partícula de hantavírus. As letras L, M e S representam os segmentos grande, médio e pequeno, respectivamente, do genoma.	47
<b>Figura 16</b> - Curso clínico e sintomatológico da FHSR.	50
<b>Figura 17</b> - Curso clínico e sintomatológico da SCPVH.	51
<b>Figura 18</b> - Viremia e resposta imunológica em humanos com infecção por hantavírus.	53
<b>Figura 19</b> - Fluxograma dos diagnósticos realizados nos pacientes com síndrome febril aguda.	58
<b>Figura 20</b> - Fluxograma dos pacientes recrutados, excluídos e incluídos no estudo.	66

- Figura 21** - **A:** Imunocromatográfico de paciente positivo; **B:** Imunocromatográfico de paciente negativo; **C:** Eletroforese mostrando os produtos do RT-PCR para dengue. Coluna 1: Marcador de 100 pb; Coluna 12: paciente positivo; Coluna 13: e controle negativo; Coluna 14: controle positivo (420 pb). 67
- Figura 22** - Eletroforese mostrando os produtos do PCR para leptospirose. Coluna 1: Marcador de 100 pb; Coluna 2: controle positivo (274pb); Coluna 3, 9 e 12: pacientes positivos; Coluna 13: controle negativo. 72
- Figura 23** - Padronização do RT-PCR de hantavírus. **A:** G1/HANGGn-C/ G1/HANGGn-S. Coluna 1: Marcador de 100pb; Coluna 2: Controle positivo (324pb); Coluna 3: Controle negativo. **B:** SAHN-S/ SAHN-C. Coluna 1: Marcador de 100pb; Coluna 2: Controle positivo (264pb); Coluna 3: Controle negativo. 78

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Pacientes positivos pelo teste imunocromatográfico NS1 em comparação com o tempo decorrido do início dos sintomas.	68
<b>Gráfico 2</b> - Pacientes positivos pelo ensaio de ELISA-IgM em comparação com o tempo decorrido do início dos sintomas.	68
<b>Gráfico 3</b> - Distribuição temporal dos casos inclusos e confirmados para dengue.	69
<b>Gráfico 4</b> - Distribuição etária dos pacientes confirmados para dengue.	69
<b>Gráfico 5</b> - Comparação sintomatológica entre pacientes confirmados laboratorialmente para dengue e dengue-símile. (*) estatisticamente significativa.	70
<b>Gráfico 6</b> - Comparação dos achados laboratoriais inespecíficos entre os pacientes com dengue e dengue-símile. A: Hemoglobina, hematócrito, linfócitos AST e ALT; B: Leucócitos e plaquetas. (*) estatisticamente significativa.	71
<b>Gráfico 7</b> - Pacientes apresentando uma possível infecção primária ou infecção secundária.	72
<b>Gráfico 8</b> - Pacientes positivos pelo PCR em comparação com o tempo decorrido do início dos sintomas.	73
<b>Gráfico 9</b> - Pacientes positivos pelo ELISA em comparação com o tempo decorrido do início dos sintomas.	74
<b>Gráfico 10</b> - Distribuição etária dos pacientes positivos para leptospirose.	74
<b>Gráfico 11</b> - Gráfico de distribuição temporal dos pacientes incluídos, positivos para dengue e para leptospirose.	74
<b>Gráfico 12</b> - Comparação sintomatológica entre pacientes positivos para dengue e leptospirose.	75
<b>Gráfico 13</b> - Comparação dos achados laboratoriais inespecíficos entre os pacientes com dengue e leptospirose. A: Hemoglobina, hematócrito, linfócitos, ALT e AST; B: Leucócitos e plaquetas.	76
<b>Gráfico 14</b> - Sorologia IgG para hantavírus dos pacientes inclusos (n=95).	78
<b>Gráfico 15</b> - Gráfico de distribuição temporal dos pacientes incluídos e com SFI.	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.	62
<b>Tabela 2</b> - Pacientes positivos para cada um dos testes para dengue.	67
<b>Tabela 3</b> - Pacientes positivos para cada um dos testes para leptospirose.	73
<b>Tabela 4</b> - Exames laboratoriais inespecíficos dos pacientes com leptospirose.	77
(*) Resultados alterados.	
<b>Tabela 5</b> - Características epidemiológicas do paciente com sorologia positiva para hantavírus.	79
<b>Tabela 6</b> - Exames laboratoriais inespecíficos do paciente com sorologia positiva para hantavírus. (*) Resultados alterados.	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>C</b>	Proteína do capsídeo
<b>DC</b>	Dengue clássica
<b>DCC</b>	Dengue com complicações
<b>DENCO</b>	<i>Dengue Control</i> (controle da dengue)
<b>DENV</b>	Dengue vírus
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>E</b>	Proteína do envelope
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FHD</b>	Febre hemorrágica da dengue
<b>FHSR</b>	Febre hemorrágica com síndrome renal
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
<b>HSJ</b>	Hospital São José de Doenças Infecciosas
<b>Ht</b>	Hematócrito
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IRA</b>	Insuficiência renal aguda
<b>IV</b>	Isolamento viral
<b>L</b>	<i>Large segment</i> (segmento grande)
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>M</b>	<i>Medium segment</i> (segmento médio)
<b>MAT</b>	Teste de microaglutinação
<b>N</b>	Proteína do nucleocapsídeo viral
<b>NS</b>	Proteína não estrutural
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PrM</b>	Proteína pré-membrana
<b>qRT-PCR</b>	RT-PCR em tempo real

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase
<b>S</b>	<i>Small segment</i> (segmento pequeno)
<b>SARA</b>	Síndrome da angústia respiratória aguda
<b>SCD</b>	Síndrome do choque da dengue
<b>SPCVH</b>	Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Dengue</b>	<b>18</b>
<i>1.1.1 Epidemiologia</i>	<b>18</b>
<i>1.1.2 Agente etiológico</i>	<b>23</b>
<i>1.1.3 Transmissão</i>	<b>25</b>
<i>1.1.4 Manifestações clínicas</i>	<b>26</b>
<i>1.1.5 Patogênese</i>	<b>28</b>
<i>1.1.6 Diagnóstico</i>	<b>30</b>
<i>1.1.7 Diagnóstico diferencial</i>	<b>33</b>
<b>1.2 Leptospirose</b>	<b>34</b>
<i>1.2.1 Epidemiologia</i>	<b>34</b>
<i>1.2.2 Agente etiológico</i>	<b>37</b>
<i>1.2.3 Transmissão</i>	<b>39</b>
<i>1.2.4 Manifestações clínicas</i>	<b>39</b>
<i>1.2.5 Patogênese</i>	<b>41</b>
<i>1.2.6 Diagnóstico</i>	<b>42</b>
<b>1.3 Hantavírus</b>	<b>43</b>
<i>1.3.1 Epidemiologia</i>	<b>43</b>
<i>1.3.2 Agente etiológico</i>	<b>46</b>
<i>1.3.3 Transmissão</i>	<b>47</b>
<i>1.3.4 Manifestações clínicas</i>	<b>48</b>
<i>1.3.5 Patogênese</i>	<b>52</b>
<i>1.3.6 Diagnóstico</i>	<b>52</b>
<b>1.4 Justificativa</b>	<b>54</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b>	<b>55</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>55</b>
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Delineamento do estudo</b>	<b>56</b>
<b>3.2 População de estudo</b>	<b>56</b>
<b>3.3 Coleta e processamento das amostras</b>	<b>56</b>
<b>3.4 Local de estudo</b>	<b>59</b>

<b>3.5 Definição de caso confirmado para dengue</b>	<b>59</b>
<b>3.6 Técnicas Laboratoriais</b>	<b>59</b>
<b>3.6.1 Dengue</b>	<b>59</b>
3.6.1.1 <i>Teste Imunocromatográfico NS1 Ag STRIP</i>	59
3.6.1.2 <i>IgM ELISA</i>	60
3.6.1.3 <i>IgG ELISA</i>	60
3.6.1.4 <i>Extração RNA</i>	60
3.6.1.5 <i>RT-PCR</i>	61
3.6.1.6 <i>Eletroforese</i>	61
<b>3.6.2 Leptospirose</b>	<b>62</b>
3.6.2.1 <i>IgM ELISA</i>	62
3.6.2.2 <i>Extração DNA</i>	62
3.6.2.3 <i>PCR</i>	63
3.6.2.4 <i>Eletroforese</i>	63
<b>3.6.3 Hantavírus</b>	<b>63</b>
3.6.3.1 <i>IgM e IgG ELISA</i>	63
3.6.3.2 <i>Extração RNA</i>	64
3.6.3.3 <i>RT-PCR</i>	64
3.6.3.4 <i>Eletroforese</i>	65
<b>3.7 Análise Estatística</b>	<b>65</b>
<b>3.8 Considerações éticas</b>	<b>65</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Total de pacientes</b>	<b>66</b>
<b>4.2 Dengue</b>	<b>66</b>
4.2.1 <i>Diagnóstico</i>	66
4.2.2 <i>Características epidemiológicas</i>	69
4.2.3 <i>Características clínicas e laboratoriais</i>	70
4.2.4 <i>Infecções secundárias</i>	71
<b>4.3 Leptospirose</b>	<b>72</b>
4.3.1 <i>Diagnóstico</i>	72
4.3.2 <i>Características epidemiológicas</i>	74
4.3.3 <i>Características clínicas e laboratoriais</i>	75
<b>4.4 Hantavírus</b>	<b>77</b>

<i>4.4.1 Diagnóstico</i>	77
<i>4.4.2 Características epidemiológicas</i>	79
<i>4.4.3 Características clínicas e laboratoriais</i>	79
<b>4.5 Síndrome Febril Indiferenciada</b>	<b>80</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>81</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>119</b>
A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	119
B- FICHA DE AVALIAÇÃO	120
<b>ANEXOS</b>	<b>122</b>
A- PARACER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HSJ	122
B- NÚMERO DE PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HSJ	123

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dengue

### 1.1.1 Epidemiologia

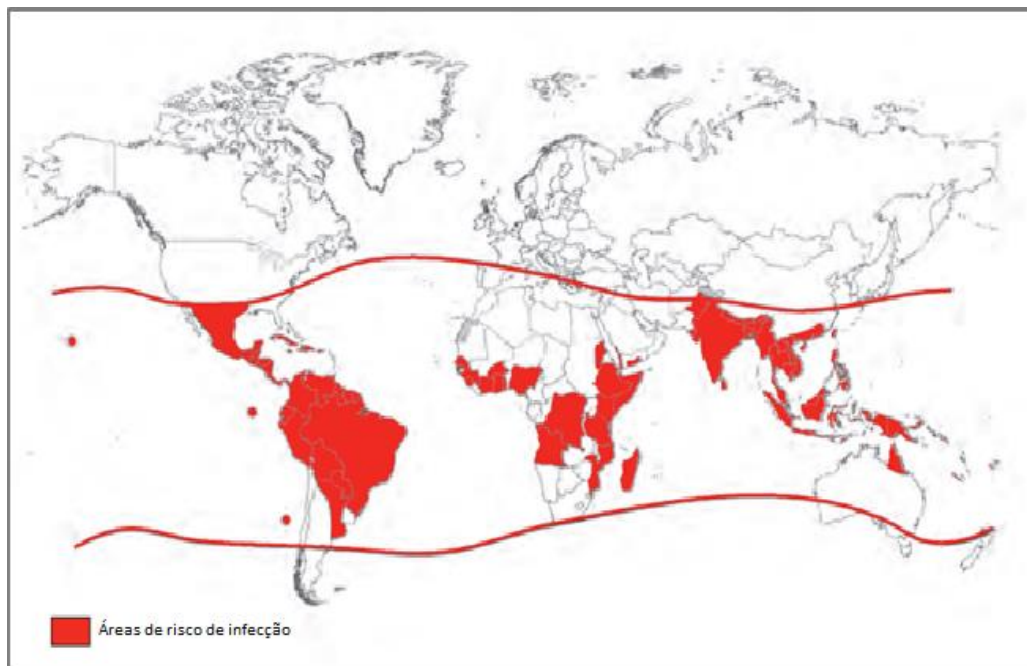
A dengue é considerada a mais importante arbovirose no mundo em termos de morbimortalidade (GUZMAN *et al.*, 2010; GUZMAN; KOURI, 2003). Atualmente, estima-se que ocorrem de 50 a 270.000.000 infecções por dengue anualmente, das quais 2.000.000 de casos evoluem para as formas mais graves e 21.000 resultam em morte (WHO, 2009). A maioria dos casos de dengue é assintomática, assim, pessoas com doença leve podem não procurar atendimento médico e, conseqüentemente, o número real de casos de dengue ser subestimado (GÓMEZ; WILLOQUET, 2009).

Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas, ou 40% da população do mundo vive em áreas onde há um risco de transmissão de dengue (Figura 1). Os sorotipos do vírus dengue (DENV) são encontrados em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. A dengue é endêmica em pelo menos 100 países na Ásia, no Pacífico, nas Américas, na África e no Caribe (GUZMAN *et al.*, 2010; SAN MARTÍN *et al.*, 2010; WHITEHORN; FARRAR, 2010). Depois de décadas de ausência nos Estados Unidos (EUA), a dengue surgiu recentemente com casos adquiridos localmente com o estabelecimento de endemicidade em territórios tropicais dos EUA, como por exemplo, em Porto Rico (MORENS; FAUCI, 2008). A dengue não ocorre naturalmente na Europa, mas condições adequadas para transmissão podem aumentar o risco de infecção, como por exemplo, o estabelecimento da população do mosquito e a presença de estrangeiros infectados (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2007). Impulsionada por estes fatores, a recente epidemia na Ilha da Madeira (Portugal), em 2012, apresentou 966 casos confirmados laboratorialmente (SOUSA *et al.*, 2012). Esta foi a primeira epidemia de dengue na Europa desde a década de 1920, quando ocorreu uma epidemia na Grécia, onde o mosquito havia sido introduzido a menos de meia década (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Nas regiões tropicais e subtropicais, a dengue é endêmica, ocorrendo todos os anos, geralmente durante a temporada de chuva, quando as populações de mosquitos *Aedes* encontram condições favoráveis para sua reprodução. Para ocorrer uma epidemia de dengue é necessária a coexistência de uma série de fatores: presença de mosquitos vetores, grande número de pessoas sem imunidade a um dos sorotipos virais e a oportunidade de contato entre

os dois. Além desses, outros fatores importantes na epidemiologia global da dengue incluem: mudanças demográficas, crescimento da população, tendências econômicas, aumento do tamanho da população urbana e da densidade devido à migração rural-urbana, modernização do transporte com o aumento do fluxo de pessoas, vetores e patógenos e mudanças nas políticas de saúde pública (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; COSTA; TEIXEIRA, 1999; KUNO, 1995; TEIXEIRA; BARRETO, 1996; TEIXEIRA *et al.*, 1999).

**Figura 1** - Áreas de risco pela infecção do vírus dengue.



Fonte: WHO, 2009

Descrições do quadro clínico de epidemias compatíveis com a dengue estão registradas desde 610 d.C. Surtos epidêmicos de doença febril aguda na Índia Francesa, em 1635, e no Panamá, em 1699, têm sido atualmente relacionados à dengue. Considera-se que as ocorrências mais bem documentadas antes do isolamento do agente etiológico são as da Filadélfia (1778) e do Egito (1779) (MARTINEZ-TORRES, 1990 *apud* BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Quando os meios de transportes eram mais lentos que os atuais, um mesmo sorotipo persistia circulando em determinada área por alguns anos, causando surtos epidêmicos periódicos, modulados pela reposição da população de indivíduos suscetíveis (GUBLER, 1997).

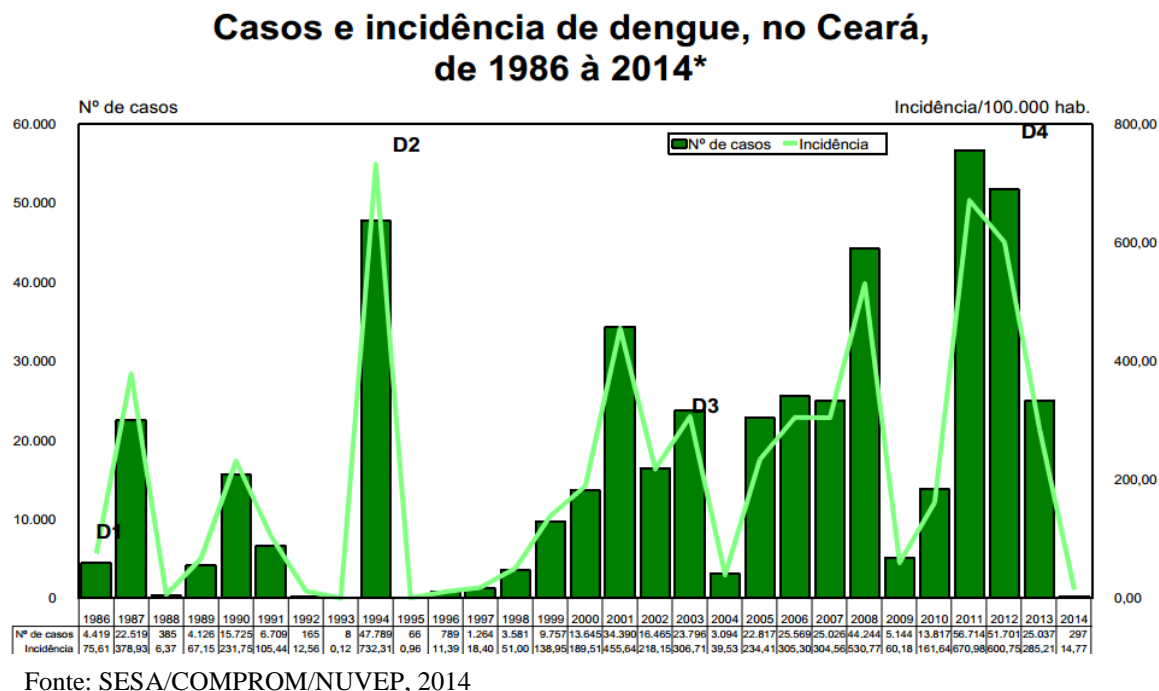
Após a Segunda Guerra Mundial, a dengue passou a exibir características mais severas, pois esse evento proporcionou a circulação de diferentes sorotipos em uma mesma região, além de mudanças ecológicas e demográficas significativas que facilitaram a

transmissão e disseminação da dengue (KUNO, 2007). Em 1953, nas Filipinas, foi registrado o primeiro surto de febre hemorrágica da dengue (FHD), confundido na época com outras febres hemorrágicas, mas a confirmação de que se tratava do DENV só se deu em 1958 (MARTINEZ-TORRES, 1990).

Desde 1846, há relatos de epidemias de dengue no Brasil ocorridas em São Paulo e Rio de Janeiro, mas as primeiras citações na literatura científica datam de 1916, na cidade de São Paulo, e em Niterói no ano de 1923 (MEIRA, 1916 *apud* BARRETO; TEIXEIRA, 2008; PEDRO, 1923 *apud* BARRETO; TEIXEIRA, 2008). A primeira evidência de ocorrência de epidemia de dengue no Brasil é de 1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista, Roraima (MALAVIGE *et al.*, 1984). DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foram introduzidos no Rio de Janeiro em 1985, 1990 e 2000, respectivamente, e se espalharam por todo o país. Em 2005, o DENV-4 foi isolado de casos de FHD em Manaus (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Em julho de 2010, o sorotipo 4 foi isolado novamente em Roraima, após 28 anos da sua ausência no Estado (TEMPORÃO *et al.*, 2011). Desde 1996, a dengue deixou de ser uma doença intermitente e passou a ocorrer a cada ano (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

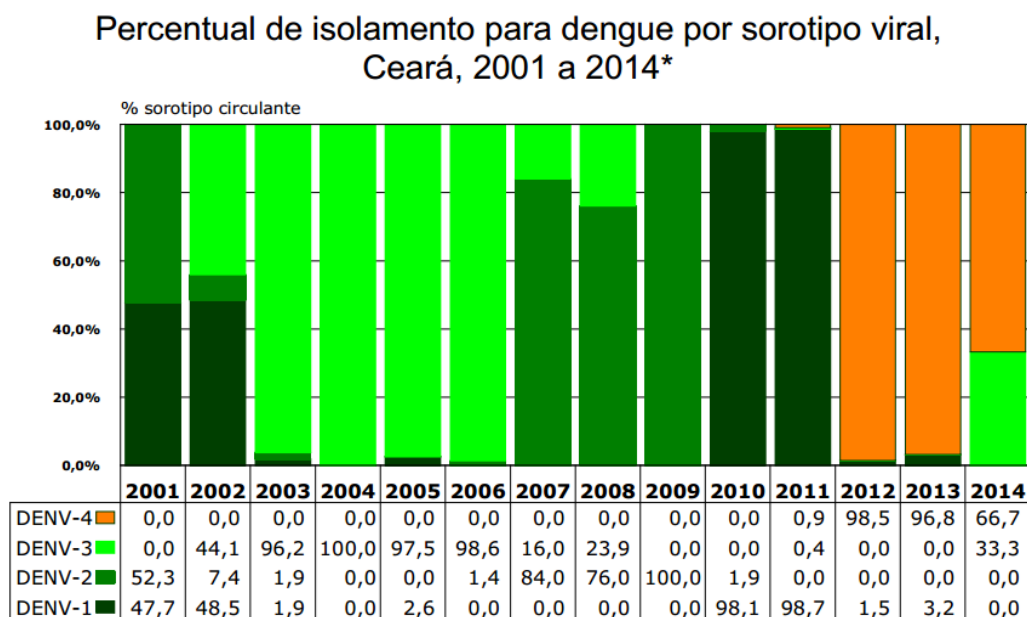
O Estado do Ceará é um dos mais importantes em termos de números de notificações, sendo o segundo Estado do Brasil a apresentar o maior índice de casos (CUNHA *et al.*, 1998; CAVALCANTI *et al.*, 2010). Até o momento, foram registrados 6 picos epidêmicos nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011 e 2012 (VASCONCELOS *et al.*, 1998; CEARÁ, 2013; Figura 2).

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



A notificação dos casos no Estado iniciou-se desde 1986, após isolamento do sorotipo DENV-1. Os primeiros casos confirmados de FHD ocorreram em 1994, com o isolamento do DENV-2 (SOUZA *et al.*, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 1995; CEARÁ, 2014). Até 2001, co-circularam os sorotipos DENV-1 e DENV-2. Em 2002, foi isolado o DENV-3 no Estado que predominou durante 2003 até o ano de 2006, quando em 2007 o DENV-2 voltou a circular no Ceará com alta taxa de isolamento até 2009. Em 2010, o DENV-1, cuja entrada no Ceará se deu em 1986, após um silêncio epidemiológico re-circulou no Estado com taxa de isolamento maior do que 98%. Finalmente, no fim de 2011, foi isolado pela 1ª vez no Estado o DENV-4, principal responsável pelas epidemias atuais (CEARÁ, 2014; Figura 3).

**Figura 3** – Percentual de isolamento para dengue por sorotipo viral no Ceará.



Fonte: LACEN, 2014

No Ceará, os reservatórios infestados são principalmente aqueles utilizados para o armazenamento de água, como caixas d'água, tambores, potes de barro e tanques. Além disso, nos últimos anos, o Estado tem registrado casos em todos os meses do ano com predomínio no primeiro semestre do ano (CEARÁ, 2014). Em 2012, foram confirmados 51.915 casos de dengue em 167 (90,7%) municípios, com a circulação de DENV-1 e DENV-4 (CEARÁ, 2014).

Até o momento, não existem vacinas licenciadas para a prevenção de dengue, nem terapias específicas para deter ou limitar a replicação do vírus ou mesmo modular a gravidade dos sintomas dos pacientes afetados, o diagnóstico preciso e precoce é essencial para uma vigilância eficaz e para a instituição adequada de medidas de controle (HU *et al.*, 2011; TRICOU *et al.*, 2010). Na ausência de uma vacina segura e eficaz contra a dengue, todas as medidas para controle da doença são dirigidas ao transmissor (WHO, 2009). Porém, há uma grande dificuldade de controle deste, visto sua extraordinária competência na escolha de locais para oviposição (GADELHA; TODA, 1985). O uso de agentes químicos, como inseticidas, em depósitos de água que não podem ser eliminados ou manejados vem sendo racionalizado devido a perspectiva de uma longa convivência com o vetor (PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1994). Neste sentido, o controle biológico tem



sido incentivado, como a utilização de espécies de peixes larvófagos no controle das larvas destes insetos (PAMPLONA *et al.*, 2004).

### **1.1.2 Agente etiológico**

O gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae contém mais de 70 vírus, muitos dos quais são importantes patógenos humanos, causando grandes ameaças à saúde pública mundial. Um dos principais vírus deste gênero é o DENV responsável por um grande número de infecções e mortes a cada ano (ZOU *et al.*, 2011). O vírus possui 4 sorotipos, estreitamente relacionados, porém antigenicamente distintos: sorotipo dengue 1, 2, 3 ou 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (HENCHAL; PUTNAK, 1990; GUBLER, 1998; HALSTEAD, 2007).

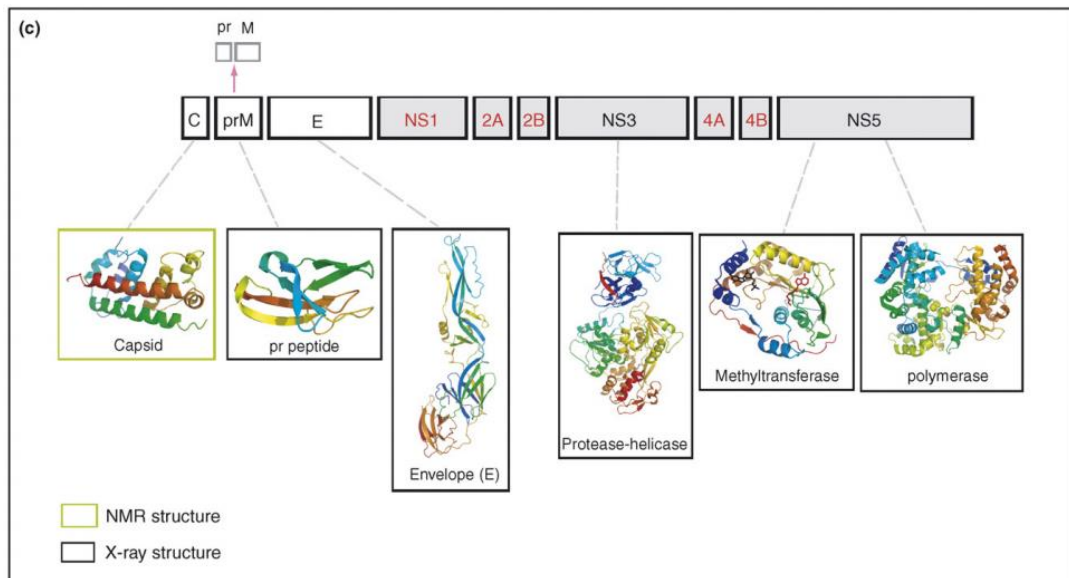
O genoma viral é formado por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, apresentando comprimento aproximado de 11 kilobases (Kb). Estruturalmente, o vírus caracteriza-se por ser envelopado e esférico, com um capsídeo icosaédrico revestindo o RNA viral. Cercando o nucleocapsídeo, está uma bicamada lipídica contendo proteínas. O genoma do DENV codifica suas proteínas na seguinte ordem: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (CHAMBERS *et al.*, 1990; LODEIRO *et al.*, 2009). A tradução do genoma do vírus gera um precursor de uma grande poliproteína, que é processado pelas células do hospedeiro e pelas proteases virais, que originam as 10 proteínas do vírus maduro (CHAMBERS *et al.*, 1990; DUSSART *et al.*, 2006; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

O DENV possui 3 proteínas estruturais [Capsídeo (C), pré-membrana (prM) e de envelope (E)] que estão envolvidos principalmente na formação dos componentes do vírus e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que são os principais responsáveis pela replicação viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; Figura 4). A glicoproteína E possui conformação tridimensional, importante para a exposição dos determinantes antigênicos virais. Os anticorpos específicos contra o vírus reconhecem os epítomos da proteína E, promovendo lise do envelope ou bloqueio de seus receptores. Essa ação resulta na neutralização viral, uma vez que a entrada do vírus na célula através da ligação do vírus ao receptor de membrana é mediada pela proteína E. Os epítomos de E são os mais importantes determinantes antigênicos do vírus e, por isso, definem a produção de anticorpos específicos para o sorotipo viral (CHAMBERS *et al.*, 1990; NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2003; MILLER *et al.*, 2008). A proteína prM possui diferentes conformações no DENV imaturo e maduro. O peptídeo “pr” a partir de prM é clivado durante a maturação e M

permanece na partícula madura como uma proteína transmembrana. A clivagem da proteína prM funciona como pré-requisito para aquisição da infectividade do vírus, visto que os epítomos da proteína E ficam livres para exercer sua atividade (JUNJHON *et al.*, 2010).

Dentre as proteínas não estruturais, a NS1 é uma glicoproteína altamente conservada. Ela possui atividade na maturação viral e é encontrada na superfície, ligada à membrana da célula infectada e secretada no espaço extracelular (CHAMBERS *et al.*, 1990; MACKENZIE; SCHLESINGER *et al.*, 1990; JONES; YOUNG, 1996; KUMARASAMY *et al.*, 2007). A forma hexamérica solúvel dessa proteína é também encontrada circulando no soro de pacientes na fase aguda, por isso tem sido utilizada para diagnóstico precoce de dengue (CROOKS *et al.*, 1994; FLAMAND *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2000a). Em relação as demais proteínas não estruturais, a NS3 é uma serina protease e uma helicase dependente de ATP requerida durante o processamento da poliproteína viral, a NS5 é uma metiltransferase e uma RNA polimerase dependente de RNA, NS2b que é um cofator para a atividade de protease da NS3 e a NS4b tem sido implicada no bloqueio da resposta pelo interferon (IFN). As demais proteínas não estruturais, NS1, NS2a e NS4a, tem funções ainda desconhecidas (PERERA; KUHN, 2008).

**Figura 4** - Estrutura genômica do vírus dengue.



Fonte: PERERA; KUHN, 2008 (adaptado)

### 1.1.3 Transmissão

O vírus dengue é um arbovírus, necessitando de um vetor artrópode para ocorrer sua transmissão aos seres humanos. Esta ocorre através da picada de fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*, infectadas por um dos sorotipos. As espécies de maior importância mundial envolvidas na transmissão são *A. aegypti* e *A. albopictus* (HENCHAL; PUTNAK, 1990; Figura 5). Os mosquitos infectam-se após alimentarem-se de indivíduos na fase virêmica ou por transmissão transovariana, no qual estes artrópodes podem transmitir os vírus diretamente para a prole (JOSHI; MOURYA; SHARMA, 2002; ARUNACHALAM *et al.*, 2008; GUZMAN; ISTÚRIZ, 2010). No mosquito infectado, o vírus passa do trato intestinal para as glândulas salivares após um período de incubação extrínseco que dura cerca de 10 dias (WATTS *et al.*, 1987).

**Figura 5** - *Aedes aegypti* durante repasto sanguíneo.



Fonte: CDC

A detecção de anticorpos anti-dengue nos soros de primatas não humanos em floresta ou em regiões escassamente povoadas na Ásia e na África sugere que esses animais estão envolvidos na transmissão enzoótica do vírus, porém a relação deste fenômeno com a infecção humana é desconhecida (RUDNICK; MARCHETTE; GARCIA, 1967). Seres humanos podem ser infectados de primatas não humanos, sob certas condições de laboratório (BENTE; RICO-HESSE, 2006).

O *Aedes* é um vetor eficiente por várias razões, como por exemplo, ser altamente suscetível ao vírus dengue, se alimentar preferencialmente de sangue humano, se desenvolver na proximidade destes, se alimentar durante o dia e ter sua picada quase que imperceptível.

Além disso, estes mosquitos se alimentam várias vezes durante um mesmo ciclo, aumentando as chances de infecção (PLATT *et al.*, 1997; HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001).

Embora o *A. aegypti* seja o principal transmissor do DENV, o *A. albopictus* tem se expandido cada vez mais nos territórios brasileiros. O *A. albopictus*, originário da Ásia, foi introduzido no Brasil por navios mercantes (FORATTINI, 1986). Apenas 4 Estados brasileiros ainda não registraram a presença dessa espécie: Amapá, Acre, Piauí e Sergipe (SANTOS, 2003; BALESTRA *et al.*, 2008; AGUIAR *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010). Embora a maior parte dos Estados brasileiros tenha relatado sua presença, o *A. albopictus* ainda não foi incriminado por surtos de dengue no Brasil. Entretanto, a sua crescente adaptação ao ambiente urbano o torna um potencial vetor dos vírus da dengue nas populações humanas (MARTINS *et al.*, 2006).

#### **1.1.4 Manifestações clínicas**

As características clínicas de dengue variam muito, de acordo com a idade do paciente e estado imunológico, e podem ser classificadas em 4 apresentações: dengue clássica (DC), FHD, síndrome do choque da dengue (SCD), e outras síndromes incomuns, tais como a encefalopatia e insuficiência hepática fulminante que, no Brasil, foi classificada como dengue com complicações (DCC) (INNIS, 1995; WHO, 2009; ISTURIZ; GUBLER; FERREIRA *et al.*, 2005, BRASIL, 2011a). Alguns casos podem apresentar sinais clínicos incomuns, envolvendo o sistema nervoso central (ARAÚJO *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012).

Tipicamente, a DC é uma doença febril aguda caracterizada por cefaleia frontal, dor retroorbital, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos e eritema (COBRA *et al.*, 1995; KALAYANAROOJ *et al.*, 1997). Esta forma clínica é uma doença aguda e auto-limitante, que dura aproximadamente 4 ou 5 dias. A fase de convalescência geralmente ocorre de forma espontânea, mas pode ser prolongada e acompanhada por astenia e depressão. Na DC, manifestações hemorrágicas espontâneas não são comuns de ocorrer, porém a prova do laço positiva pode ser encontrada. Em relação aos dados laboratoriais inespecíficos, são frequentes plaquetopenia, leucopenia e elevação das enzimas hepáticas (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997; TROFA *et al.*, 1997; GUBLER, 1998; SENEVIRATNE; MALAVIGE; SILVA, 2006; JAHAN, 2011).

A FHD é definida como uma doença febril aguda, com hemorragias, plaquetopenia e evidência de extravasamento plasmático demonstrado por hemoconcentração (hematócrito aumentado em pelo menos 20% do valor basal), derrame pleural ou hipoalbuminemia ou

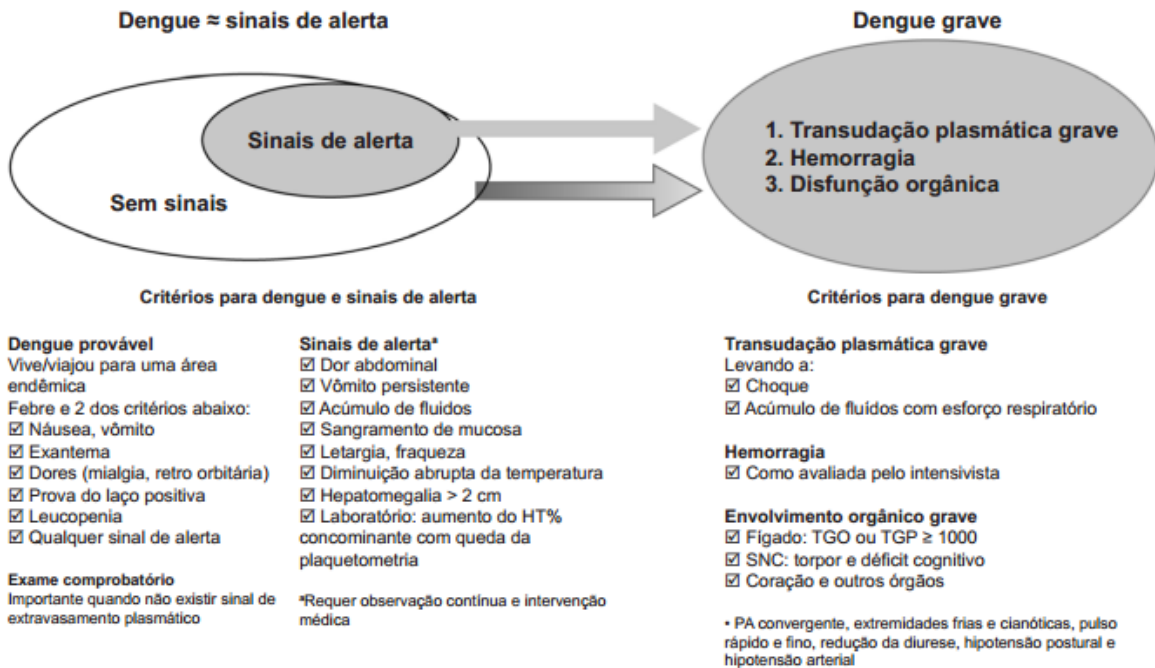
hipoproteïnemia (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1994). A principal alteração fisiopatol3gica que determina a severidade do quadro de FHD 3 o extravasamento do plasma que ocorre atrav3s das lacunas endoteliais, sem necrose ou inflamação do endot3lio capilar (CHATURVEDI; DHAWAN; MUKERJEE, 1997). Alguns sinais, conhecidos como sinais de alarme, indicam uma poss3vel evolução da doença para esta forma mais grave. Estes sinais consistem em dor abdominal intensa e cont3nua, v3mitos persistentes, hipotens3o, hepatomegalia, hemorragias importantes como a hemat3mese e/ou melena, sonol3ncia e irritabilidade, diminuição da diurese, aumento do hematócrito, queda abrupta de plaquetas e desconforto respirat3rio (WHO, 2009; BRASIL, 2011a). Manifestações hemorr3gicas espont4neas est3o presentes na maioria dos casos e mais de 50% dos pacientes apresentam prova do laço positiva (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997).

A SCD 3 definida como uma FHD com sinais de insufici3ncia circulat3ria, incluindo pulso fraco ( $\leq 20$  mm Hg), hipotens3o ou choque. O f3gado pode ser palp4vel e as enzimas hepáticas est3o normalmente muito alteradas (RIGAU-P3REZ, 1997). Os sinais de alerta para choque iminente s3o dor abdominal cont3nua e intensa, v3mitos persistente, agitação ou letargia e uma s3bita mudança na temperatura, da febre para hipotermia, com sudorese e prostração.

A DCC 3 todo caso grave que n3o pode ser classificado como FHD por n3o preencher todos os crit3rios de FHD descritos pela Organização Mundial de Sa3de (OMS). Os sinais e sintomas mais frequentes da DCC s3o: alterações neurol3gicas, insufici3ncia hepática, hemorragia digestiva volumosa, disfunção cardiorrespirat3ria, derrame pleural, pericárdico e ascite; plaquetopenia inferior a  $20.000/\text{mm}^3$ , contagem de leuc3citos  $\leq 1.000/\text{mm}^3$ , ou qualquer caso suspeito de dengue fatal que n3o possua todos os requisitos para a classificação final de FHD (BRASIL, 2011a).

Esta classificação em 4 apresentações cl3nicas diferentes, proposta em 1974 e revisada em 1997, apresenta alguns problemas práticos, visto que a classificação de alguns pacientes graves depende de resultados de laborat3rio, uma prática que pode levar a categorizar os casos graves como DC por falta de crit3rios. Desta forma, em 2009, a OMS prop3o uma classificação, baseada nos resultados do estudo multic3ntrico “DENCO” (DENgue COntrol). Esta nova classificação simplificada apresenta uma maior aplicabilidade prática baseada na avaliação cl3nica e nos exames laboratoriais amplamente dispon3veis, dividindo os casos de dengue em 2 categorias de gravidade: dengue (com ou sem sinais de alerta) e dengue grave (WHO, 2009; VERDEAL *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2014; ALEXANDER *et al.*, 2011; Figura 6).

**Figura 6** – Nova classificação de dengue e seus sinais de alerta.



Fonte: VERDEAL *et al.*, 2011

### 1.1.5 Patogênese

Na pele, os vírus dengue infectam as células dendríticas imaturas que migram e amadurecem nos linfonodos regionais, onde apresentam os antígenos virais às células T, iniciando as respostas da imunidade celular e humoral (WU *et al.*, 2000). Nas células do parênquima do fígado e nos macrófagos dos gânglios linfáticos, fígado e baço, bem como nos monócitos do sangue periférico há uma abundante replicação viral (JESSIE *et al.*, 2004). A partir desse ponto, a infecção pode evoluir para formas mais graves, ou não, da doença.

Várias hipóteses foram propostas no intuito de esclarecer a patogênese da dengue, apesar de que nenhuma, isoladamente, ser capaz de explicar os mecanismos envolvidos (HEMUNGKORN; THISYAKORN; THISYAKORN, 2007).

Infecções secundárias são mais prováveis de resultar em doença grave (THEIN *et al.*, 1997; VAUGHN *et al.*, 2000). Isto é explicado pela teoria do aumento da infecção dependente de anticorpos, onde após um período inicial de proteção cruzada, anticorpos adquiridos em infecções prévias por um determinado sorotipo do vírus dengue não seriam mais neutralizantes ou teriam títulos muito baixos para neutralizarem o sorotipo responsável pela infecção atual. Estes anticorpos se ligariam a outros epítomos do sorotipo responsável pela infecção atual, comuns aos 4 sorotipos virais, mas não o neutralizaria, formando então, complexos vírus-anticorpos que facilitariam a penetração do vírus nas células monocitárias.

As células mononucleares expressam na sua superfície receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, facilitando assim a internalização dos complexos vírus-anticorpos. Esta facilidade de penetração do vírus nestas células resulta em uma maior carga viral, maior intensidade da resposta imune com a liberação de citocinas e aminas vasoativas (HALSTEAD, 1988; KURANE, 2007; VAUGHN *et al.*, 2000; SULLIVAN, 2001). Os títulos mais elevados dessas citocinas podem resultar numa ativação amplificada da cascata do complemento, causando disfunção endotelial, destruição de plaquetas e consumo dos fatores de coagulação, que resultam em perda de plasma e manifestações hemorrágicas, resultando em formas mais graves da doença (KURANE; TAKASAKI, 2001; LEI *et al.*, 2001). Alguns estudos sugerem que os anticorpos anti-NS1 reagem de forma cruzada com as plaquetas e células endoteliais, resultando na disfunção endotelial e ativação do complemento (AVIRUTNAN *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2006).

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

Outra grande hipótese que tenta explicar a patogênese da FHD é a teoria integral da multicausalidade que sustenta que a FHD ocorre como consequência de fatores complexos e intrincados nos quais aspectos relacionados ao vírus, ao hospedeiro e à epidemiologia participam. Os fatores virais consistem na virulência da cepa, o sorotipo envolvido, mutações no genótipo viral; já os fatores de risco individual incluem idade, sexo, estado nutricional, infecção secundária e a imunocompetência do indivíduo; e os fatores de risco epidemiológicos são o número de indivíduos susceptíveis, alta densidade vetorial, circulação de diferentes sorotipos e hiperendemicidade. Segundo essa hipótese, a intercessão dos três grupos de fatores leva à FHD epidêmica (GUZMÁN; KOURI, 2003).

Algumas características do hospedeiro foram notificadas como fatores de risco para FHD / SCD, como a idade, onde o risco mais elevado observado em crianças; doenças crônicas, como asma brônquica, diabetes mellitus e anemia falciforme; etnia, sendo que o maior risco é observado nos brancos em comparação aos negros; e fatores genéticos (GONZALEZ *et al.*, 2005; SIERRA *et al.*, 2006; GUZMÁN *et al.*, 2002). Em relação aos fatores genéticos, vários estudos epidemiológicos indicaram componentes importantes na

susceptibilidade à doença, como alguns alelos HLA de classe I e II que estão associados ao desenvolvimento de dengue hemorrágica (STEPHENS *et al.*, 2002; LAFLEUR *et al.*, 2002).

### ***1.1.6 Diagnóstico***

O diagnóstico laboratorial específico da dengue é essencial para o diagnóstico conclusivo, diferenciando-a de outras síndromes febris tropicais. Existem diferentes testes capazes de diagnosticar a infecção pelo DENV, como o isolamento viral (IV), detecção de anticorpos séricos específicos, detecção de antígenos e RNA viral no plasma, soro e em tecidos (GUBLER, 1998).

Durante a fase aguda da doença, no período virêmico, os métodos diagnósticos recomendados são o IV, amplificação do RNA viral e detecção de NS1. No final da fase aguda, o diagnóstico sorológico é o método de escolha (WHO, 2009).

O IV é uma das técnicas mais específicas que possibilita a identificação do sorotipo do vírus dengue. Esta técnica é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da infecção, porém necessita que as amostras clínicas dos pacientes sejam coletadas entre o 1º e o 5º dia de febre que corresponde ao período virêmico (ARAÚJO, 2006). O IV pode ser a partir de inoculação em cérebro de camundongo; inoculação intratorácica em mosquitos; cultivo em células de mamífero e cultivo em células de mosquito (GUBLER, 1998). A principal linhagem celular utilizada para cultivo do DENV é a C6/36 do mosquito *A. albopictus*, embora outras linhagens celulares de mosquitos (*A. pseudoscutellaris* AP61) e mamíferos (células Vero, células LLC-MK2 e células BHK21) também possam ser utilizadas (SINGH; PAUL, 1968; RACE; WILLIAMS; AGOSTINI, 1979). Após um período de incubação que permita a replicação do vírus nas células escolhidas, a identificação viral é realizada utilizando anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo do DENV em ensaios de imunofluorescência e PCR (HENCHAL *et al.*, 1983; VORNDAM; KUNO, 1997; KAO *et al.*, 2001; GUZMÁN; KOURI, 2004).

Ultimamente os testes de detecção do ácido nucléico viral estão sendo bastante utilizados no diagnóstico e na pesquisa devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Dentre as técnicas de amplificação, as mais realizadas para diagnóstico do DENV são: RT-PCR (MORITA; TANAKA; IGARASHI, 1991; LANCIOTTI *et al.*, 1992), nested RT-PCR (LANCIOTTI *et al.*, 1992), one-step multiplex RT-PCR (HARRIS *et al.*, 1998) e qRT-PCR (CHIEN *et al.*, 2006). O RT-PCR é uma ferramenta que está revolucionando os testes laboratoriais, devido sua simplicidade e rapidez (SANTOS *et al.*, 2008; SAXENA *et al.*,



2008). A sensibilidade do RT-PCR, em comparação ao IV, varia entre 25% e 79%, dependendo do sorotipo em questão (RAENGSAKULRACH *et al.*, 2002). O qRT-PCR permite a quantificação da carga viral, onde a detecção do gene alvo amplificado por sondas fluorescentes substitui a necessidade de eletroforese na etapa pós-amplificação. Técnicas de RT-PCR multiplex e qRT-PCR multiplex foram desenvolvidas para a identificação de quaisquer um dos quatro sorotipos em uma única reação, tornando-se uma importante ferramenta que pode ser utilizada em investigações epidemiológicas e no planejamento de estratégias no controle contra o vírus (LANCIOTTI *et al.*, 1992; JOHNSON; RUSSELL; LANCIOTTI, 2005; KONG *et al.*, 2006; CHIEN *et al.*, 2006).

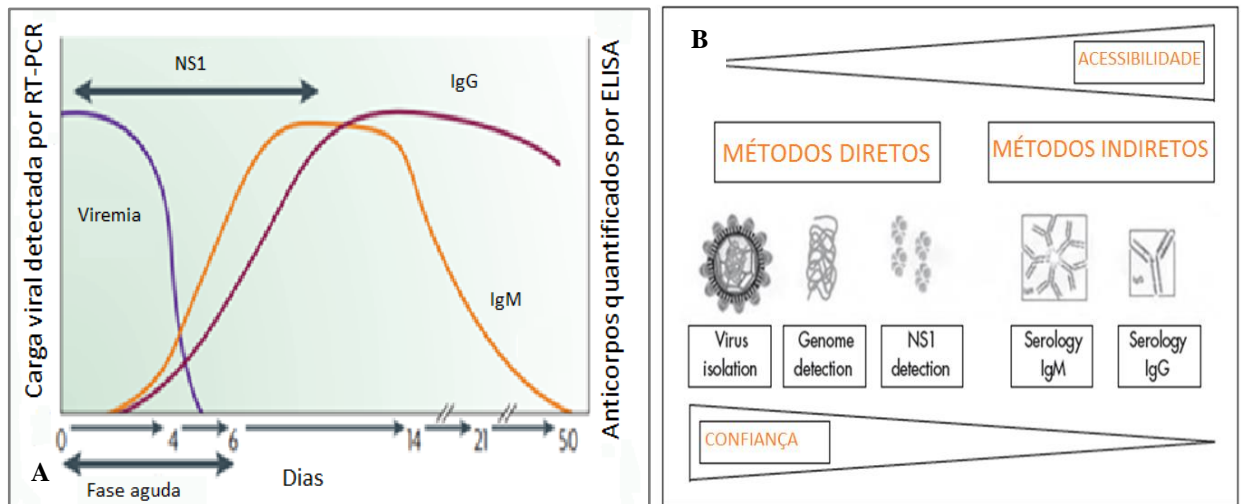
Os antígenos de dengue podem ser detectados nos tecidos, tais como fígado e baço, utilizando uma enzima e um substrato colorimétrico com anticorpos que se ligam a antígenos específicos de dengue. Um dos antígenos de grande interesse comercial para produção de novos testes diagnósticos é a proteína NS1 que além de ser uma das primeiras proteínas a ser produzida pelos vírus, é secretada na forma livre na corrente sanguínea, sendo de fácil detecção. Desta forma, muitos testes foram desenvolvidos para diagnosticar infecções pelo DENV utilizando NS1, como os testes imunoenzimáticos (ELISA) e imunocromatográficos (SHU *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2006). O ELISA detecta a secreção de NS1 *in vivo* tem demonstrado que o Ag NS1 é detectável a partir do 1º dia de febre, no sangue de indivíduos infectados, até o 9º dia, mesmo quando a amostra é negativa no RT-PCR e no ELISA-IgM (ALCON *et al.*, 2002).

O diagnóstico sorológico para dengue apresenta uma maior sensibilidade a partir da defervescência ou ao final da viremia. Testes sorológicos são mais comumente utilizados para o diagnóstico de infecção por DENV por serem relativamente mais baratos e fáceis de realizar. Porém, 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 *et al.*, 2010). Atualmente, os métodos sorológicos mais utilizados na rotina laboratorial são os testes imunoenzimáticos, porém amostras positivas para IgM, por si só, não confirmam infecção atual, devido ao fato de que anticorpos IgM podem permanecer circulantes no soro até 3 meses após a infecção (VORNDAM; KUNO, 1997; GUBLER, 1998; Figura 7).

O ELISA para detecção de IgG específico para dengue pode ser usado para confirmar a infecção por dengue em soros emparelhados, através de um aumento substancial deste anticorpo, o aumento dos títulos de IgG em 4 vezes em amostras pareadas indica infecção aguda por flavivírus (WHO, 2009). O ELISA IgG é também utilizado para classificar as

infecções em primária ou secundária, de acordo com a presença, ou não, deste anticorpo na fase aguda da doença (VORNDAM; KUNO, 1997; LIN *et al.*, 2006; WHO, 2009).

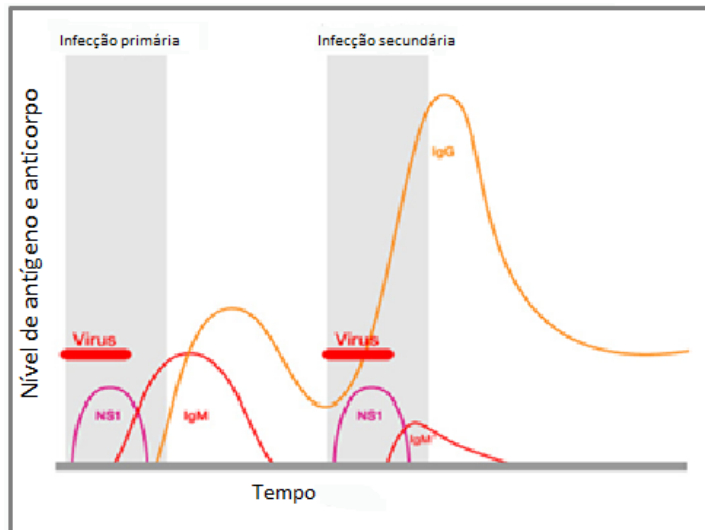
**Figura 7 - A:** Dengue vírus, antígeno e resposta de anticorpo usado no diagnóstico. **B:** Comparação dos testes diagnósticos em relação à confiança e à acessibilidade.



Fonte: **A:** GUZMÁN *et al.*, 2010 (adaptado); **B:** WHO, 2009 (adaptado)

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. Na infecção primária, IgM é normalmente detectada a partir do 5º dia da doença, enquanto que a IgG é detectada em níveis baixos, geralmente a partir do 7º dia após o início da infecção. Por outro lado, na infecção secundária, os anticorpos IgG são detectados em níveis elevados no início da fase aguda, através da estimulação das células B de memória da infecção anterior, enquanto que os anticorpos IgM são detectados com títulos inferiores aqueles observados nas infecções primárias, podendo ser indetectável em alguns casos (SCHILLING *et al.*, 2004; SHU; HUANG, 2004; SA-NGASANG *et al.*, 2006; WHO, 2009; Figura 8).

**Figura 8** - Comparação da resposta primária e secundária em relação à produção dos anticorpos.



Fonte: GUZMÁN *et al.*, 2010 (adaptado)

Mesmo possuindo um considerável número de técnicas para identificação da infecção para dengue, o ideal seria a combinação das mesmas para aumentar a eficácia do diagnóstico da doença (GUBLER, 1998; GURUKUMAR *et al.*, 2009; TEIXEIRA; BARRETO, 2009; GUZMÁN *et al.*, 2010). O diagnóstico confirmatório de um caso suspeito de dengue, além de ser importante para o paciente, para que receba tratamento e cuidados específicos, é importante a nível coletivo, uma vez que, a partir do conhecimento do perfil epidemiológico da dengue, torna-se possível estabelecer medidas preventivas e de controle específicas (BRASIL, 2011a).

### 1.1.7 Diagnóstico diferencial

Considerando-se que a dengue possui um amplo espectro clínico, torna-se difícil, em alguns casos, distingui-la de outras doenças utilizando apenas critérios clínico-epidemiológicos, sem o emprego de técnicas laboratoriais. Por isso, o Ministério da Saúde recomenda a realização de diagnóstico diferencial para as seguintes doenças: influenza, sarampo, rubéola, citomegalovírus, hepatites virais, hantavirose, febre amarela, oropouche, leptospirose, malária, dentre outras, a depender da situação epidemiológica da região (BRASIL, 2011a). O diagnóstico laboratorial específico é essencial para o diagnóstico conclusivo da dengue, diferenciando-a de outras síndromes febris tropicais (SHU; HUANG, 2004; VELATHANTHIRIA *et al.*, 2006). Contudo, em períodos epidêmicos, devido à quantidade exorbitante de casos suspeitos, a confirmação pode ser realizada através somente

de critérios clínicos associados à epidemiologia. A utilização destes critérios como única base para o diagnóstico da dengue pode ser arriscada, podendo levar a falhas diagnósticas devido a sintomatologia inespecífica semelhante a outras patologias (GUZMAN *et al.*, 2010; CASTRO-JORGE *et al.*, 2010; BRASIL, 2011a). Porém, dentro do espectro das doenças febris agudas semelhantes à dengue, certamente há patógenos que não são rotineiramente investigados pela carência de recursos e, também, pelo desconhecimento de sua existência na região. Dessa forma, os casos de dengue podem estar sendo superestimados em detrimento de outras patologias com sintomatologia semelhante (BRUCE *et al.*, 2005; SOUZA; NOGUEIRA; PEREIRA, 2007; SUHARTI *et al.*, 2009), levando pacientes a tratamentos inadequados e a uma possível piora de seu quadro clínico.

Dessa forma, no presente estudo optou-se por estudar a leptospirose e a hantavirose como etiologias de diagnóstico diferencial da dengue, por já serem linhas de estudo do laboratório de Virologia da Dra. Danielle Malta Lima (Universidade de Fortaleza). Além disso, a leptospirose foi escolhida por seguir uma linha de tratamento totalmente diferenciada da dengue e a hantavirose por ser uma patologia nunca notificada no Estado do Ceará.

## **1.2 Leptospirose**

### ***1.2.1 Epidemiologia***

A leptospirose é a zoonose mais importante do mundo. Trata-se de uma zoonose de grande importância social e econômica, por apresentar elevada incidência em determinadas áreas, alto custo hospitalar e apresentar alto índice de letalidade que pode chegar a 40%, nos casos mais graves (BRASIL, 2009). A leptospirose é também um problema veterinário, tendo um impacto direto sobre o comércio de animais e carnes (ELLIS, 1994).

Descrita pela primeira vez pelo alemão Adolf Weil em 1886, a leptospirose embora seja, provavelmente, a zoonose mais difundida do mundo, dados confiáveis da incidência e prevalência de casos humanos são escassos devido à pobre qualidade dos dados de vigilância, dificuldade de diagnóstico por apresentar muitos sintomas inespecíficos e baixa sensibilidade dos testes diagnósticos padrões (BOUNLU *et al.*, 1998; ABELA-RIDDER; SIKKEMA; HARTSKEERL, 2010). Assim, é provável que a leptospirose seja uma doença negligenciada e subestimada em muitas partes do mundo (BOUNLU *et al.*, 1998).

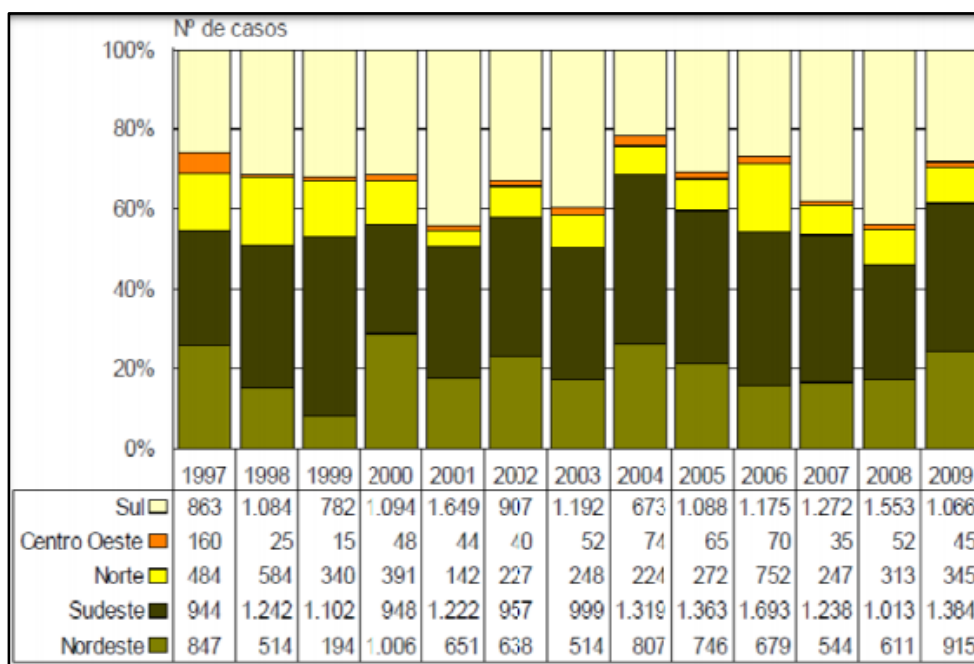
Esta zoonose tem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em áreas rurais e urbanas de regiões tropical, subtropical e temperada, devido principalmente à maior sobrevivência

de *leptospiras* em ambientes quentes e úmidos. Um padrão de sazonalidade da doença tem sido descrito com um pico de incidência que ocorre no verão ou no outono em regiões temperadas e durante a estação chuvosa em regiões de clima quente (KO *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). Entre as áreas endêmicas da doença, destacam-se o Sudeste Asiático, Oceania, Índia, Caribe e América Latina (EVERARD; EVERARD, 1993; RATNAM, 1994; PAPPAS *et al.*, 2008). Os países em desenvolvimento apresentam 500.000 casos registrados por ano e uma taxa de mortalidade variando de 5 a 10%. Nestas regiões, as mudanças climáticas e inundações, baixos níveis de saneamento e altas populações de hospedeiros de manutenção são importantes determinantes da infecção. A incidência anual nestas áreas é de 10-100 casos por 100.000 habitantes, e esta taxa aumenta durante os surtos e em populações de alto risco (VICTORIANO *et al.*, 2009). Particularmente, a incidência desta doença entre os homens é muito maior do que nas mulheres e este fato foi atribuído à exposição mais frequente de homens a profissões e fatores de risco (LECOUR *et al.*, 1989; SASAKI *et al.*, 1993, CICERONI *et al.*, 1995; KO *et al.*, 1999).

Durante a última década ocorreram algumas mudanças no padrão epidemiológico da leptospirose humana. Em regiões onde a doença não era comum, como o Canadá, EUA e Europa (Irlanda, Dinamarca e Itália), surtos esporádicos ocorreram associados com atividades de esportes aquáticos em ambientes naturais contaminados (PATE *et al.*, 2000; HOLK; NIELSEN; RENNE, 2000; CICERONI *et al.*, 2000; MORGAN *et al.*, 2002; PAPPAS *et al.*, 2008; STERN *et al.*, 2010) ou mudanças nos padrões climáticos (PAPPAS *et al.*, 2008). Os surtos de doenças nos países desenvolvidos são normalmente associados com exposição ocupacional (BENSCHOP *et al.*, 2009; DESAI *et al.*, 2009), o turismo ou eventos esportivos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1998; MORGAN *et al.*, 2002; STERN *et al.*, 2010).

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. Devido ao clima tropical úmido e pela vasta população de roedores, o agente transmissor é favorecido (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 9), no entanto, os dados obtidos pela vigilância são precários, tornando assim, não muito confiáveis (KO *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2007; CEARÁ, 2011). No Brasil, os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni são, com frequência, relacionados aos casos mais graves (BRASIL, 2009).

**Figura 9-** Gráfico com o número de casos confirmados de leptospirose no Brasil por região, entre 1997 e 2009.



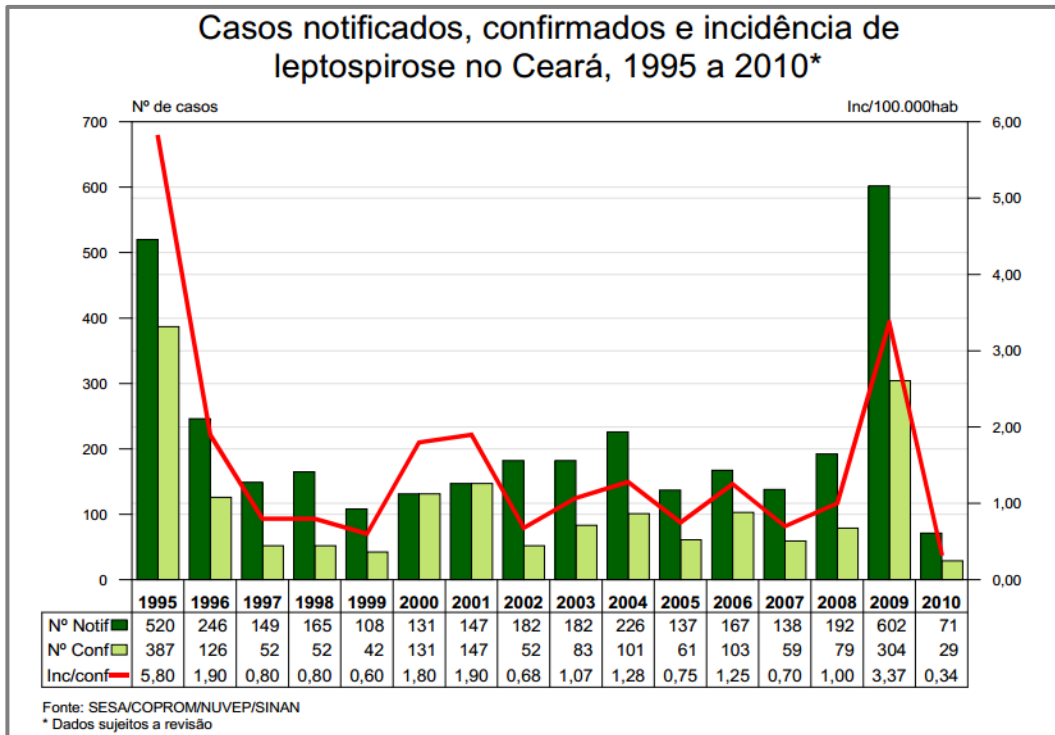
Fonte: SESA.

Os primeiros casos de leptospirose no Estado do Ceará foram descritos 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, 1974 *apud* CASTRO; CORRÊA, 1974). Apesar de 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 (Figura 10). Como nos demais Estados do país, a doença se manifesta com um maior destaque no primeiro semestre de cada ano (CEARÁ, 2011).

As medidas de prevenção e controle da doença baseiam-se na identificação das fontes de infecção, ou seja, dos reservatórios, requerendo um sistema de vigilância permanente. Uma forma de prevenir a transmissão pode ser conseguida através do uso de roupas de proteção (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Embora pouco possa ser feito em animais selvagens, os animais domésticos podem ser controlados através da vacinação (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007). Estas vacinas consistem de um limitado painel de sorovares locais e dão uma proteção sorovares-específicas por curto período de tempo. Atualmente, não existe nenhuma vacina disponível contra a leptospirose para humanos no Brasil, porém estas já estão disponíveis em determinados países, como a China (CHEN,

1985) e Cuba (MARTINEZ-SANCHES *et al.*, 1998; MARTINEZ-SANCHES *et al.*, 2000), França (LAURICHESSE *et al.*, 2007).

**Figura 10** - Casos confirmados de leptospirose no Ceará, entre 1995 e 2010.



Fonte: SESA/COMPROM/NUVEP/SINAN

### 1.2.2 Agente etiológico

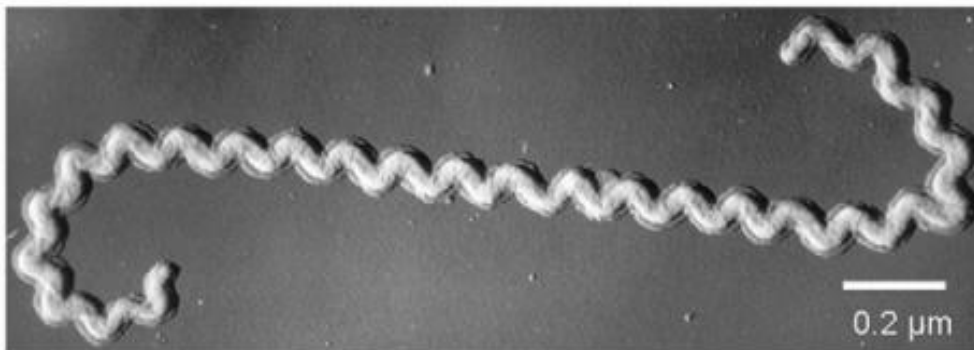
A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, sendo a principal espécie a *L. interrogans*. Esse patógeno apresenta-se em forma de espiroqueta com comprimento de 6-20  $\mu\text{m}$  e é um ser aeróbico obrigatório de ampla distribuição mundial (KO *et al.*, 1999; PLANK; DEAN, 2000; BHARTI *et al.*, 2003; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; Figura 11). O genoma deste patógeno é constituído por cerca de 3,9 - 4,6 Mbp, dependendo do sorovar ou da espécie, e é composto por 2 cromossomas circulares (PICARDEAU *et al.*, 2008). Estas bactérias possuem crescimento lento em cultura, com temperatura ótima de crescimento entre 28 e 30 °C em meio suplementado com ácidos graxos de cadeia longa e vitaminas B1 e B12 (LEVETT, 2001; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

As análises filogenéticas do gene 16S do rRNA sugerem que o aglomerado de espécies do gênero *Leptospira* seja dividido em 3 grupos designados patogênico, saprófitas e intermediário (PEROLAT *et al.*, 1998; LEVETT *et al.*, 2006).

A classificação em espécies decorre de acordo com a base genética e a semelhança no DNA, dividindo essas bactérias em pelo menos 19 espécies, sendo 13 patogênicas e 6 saprofiticas (PLANK; DEAN, 2000; BHARTI *et al.*, 2003; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Essa classificação é feita através de análises de hibridização de DNA (BRENNER *et al.*, 1999; LEVETT, 2001).

A classificação em sorovar decorre a partir das diferenças dos grupos antigênicos dessas bactérias. Todas as espécies reconhecidas de *Leptospira* são classificadas em 24 sorogrupos e 250 sorovares (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007), com base na semelhança da expressão de lipopolissacarídeo (LPS) na superfície (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). As diferenças estruturais na porção hidrocarboneto de LPS determinam a diversidade antigênica entre os numerosos sorovares.

**Figura 11-** Fotomicrografia de *Leptospira sp.*, demonstrando sua forma helicoidal.



Fonte: ADLER; MOCTEZUMA, 2010

As leptospiras têm estruturas de superfície que compartilham características de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A dupla membrana e a presença de LPS são características de bactérias Gram-negativas, enquanto a estreita associação entre a membrana citoplasmática com a parede celular é da arquitetura do envelope das Gram-positivas (HAAKE, 2000; LEVETT, 2001; VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008; KO; GOARANT; PICCARDEAU, 2009).

A motilidade dessas bactérias é dada pela função dos dois flagelos periplásmico ou endoflagelos, que surgem em cada extremidade da bactéria. Estudos sugerem que a rotação endoflagelar e consequente motilidade bacteriana pode ter papel na patogênese da infecção por *Leptospira* (LIAO *et al.*, 2009).



### **1.2.3 Transmissão**

Mamíferos selvagens e domésticos (bovinos, suínos e cães), bem como répteis e anfíbios servem como uma fonte de manutenção permanente de mais de 250 sorovares conhecidos do gênero *Leptospira* (WHO, 2003). Em geral, cada sorovar é mais adaptado a um determinado hospedeiro, enquanto que um hospedeiro pode levar vários sorovares distintos (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Os ratos e outros roedores são as fontes mais importantes para a infecção do ser humano (WHO, 2003). Várias espécies de roedores estão fortemente associadas à doença, incluindo *Rattus rattus*, *R. norvegicu* e *Mus musculus*, secretando  $10^7$  bactérias por ml de urina (MATHIAS; LEVETT, 2002). Os seres humanos, por outro lado, são considerados como hospedeiros acidentais, sofrendo de infecções agudas, mas às vezes fatais (ELLIS *et al.*, 1985; MCBRIDE *et al.*, 2005).

Em geral, um animal infectado pode permanecer sem sintomas e dispensar organismos infecciosos na urina por toda a vida (LEONARD; QUINN; ELLIS, 1992). Além disso, os animais infectados transferem o agente infeccioso para sua prole durante o período neonatal. Leptospiras patogênicas vivem nos rins de seus hospedeiros naturais, albergando-se nos túbulos renais proximais dos rins. As vias genitais dos animais domésticos podem agir também como sítios de persistência (ELLIS *et al.*, 1985; ELLIS *et al.*, 1986a; ELLIS *et al.*, 1986b). Estas bactérias são excretadas pela urina do animal infectado no ambiente, onde elas podem sobreviver por vários meses, dependendo das condições ambientais favoráveis. A infecção por cepas patogênicas geralmente ocorre através do contato direto com urina de animal infectado (através de abrasões na pele e cortes ou através das mucosas dos olhos e nariz) ou indiretamente através de água contaminada (REILLY; HANSON; FERRIS, 1970), sendo o período de incubação de 1 a 30 dias (BRASIL, 2009).

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

### **1.2.4 Manifestações clínicas**

O período de incubação até o início dos sintomas é, em média, 15 dias após a exposição (PLANK; DEAN, 2000). A leptospirose humana apresenta manifestações clínicas muito variáveis, com diferentes graus de severidade. As manifestações clínicas variam desde formas assintomáticas e subclínicas até quadros clínicos graves associados a manifestações

fulminantes. A severidade dependerá do sorovar envolvido, tamanho do inóculo, idade, saúde e estado imune do indivíduo infectado (WHO, 2003; MCBRIDE *et al.*, 2005). As apresentações clínicas da leptospirose são divididas em 2 fases evolutivas: fase precoce ou fase leptospirêmica e fase tardia ou fase imune (BRASIL, 2010).

A fase precoce da doença é caracterizada pelo início da febre, comumente acompanhada de cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos (DAHER *et al.*, 1999) e, frequentemente, não pode ser diferenciada de outras causas de doenças febris agudas, devido à similaridade sintomatológica. Portanto, muitas vezes é diagnosticada como uma dessas outras doenças com sintomas inespecíficos (SANDERS *et al.*, 1999; KO *et al.*, 1999). Isto contribui para manutenção do ciclo: subdiagnóstico, subnotificação, falta de consciência e negligência (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Existem alguns sinais e sintomas que podem ajudar a diferenciar a fase precoce da leptospirose de outras causas de doenças febris agudas, como a sufusão conjuntival e a mialgia em região lombar e nas panturrilhas. A fase precoce tende a ser autolimitada e regride em 3 a 7 dias, sem deixar sequelas (BRASIL, 2010).

Em aproximadamente 15% dos pacientes, após uma semana de doença, a leptospirose progride para a fase tardia da doença, que é associada com manifestações mais graves e potencialmente letais. A fase tardia ou imune caracteriza-se pela produção de anticorpos e excreção das leptospiros na urina (LEVETT, 2001; FARR, 1995). A manifestação clássica da leptospirose grave é a síndrome de Weil, caracterizada pela icterícia, insuficiência renal aguda (IRA) e hemorragias, mais comumente pulmonar (BRASIL, 2010).

No Brasil, a síndrome pulmonar e a IRA estão correlacionadas à alta mortalidade (BRASIL, 2011b). A IRA é uma importante complicação da fase tardia da leptospirose e ocorre em 16 a 40% dos pacientes e é caracterizada por nefrite intersticial aguda e 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 e infecção pelo HIV (DAHER *et al.*, 2008). IRA se apresenta frequentemente com rápida elevação da ureia e creatinina séricas e podem estar associadas com icterícia (SITPRIJA; LOSUWANRAK; KANJANABUCH, 2003).

O comprometimento pulmonar da leptospirose se expressa com tosse seca, dispneia, expectoração hemoptóica e, ocasionalmente, dor torácica e cianose. A hemoptise denota extrema gravidade e pode ocorrer de forma súbita, levando a insuficiência respiratória, síndrome da hemorragia pulmonar aguda, síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e óbito (GONÇALVES, 1992; BRASIL, 2010).

Outras manifestações frequentes na leptospirose grave são: miocardite, arritmias, pancreatite, anemia e distúrbios neurológicos, como confusão, delírio, alucinações e sinais de irritação meníngea. Além disso, tem sido frequentemente associada à meningite asséptica (LEVETT, 2001; BRASIL, 2009).

Os achados laboratoriais da leptospirose também são comuns a outras doenças, observando-se alterações como: plaquetopenia, leucocitose, neutrofilia, elevação das bilirrubinas totais e aumento da ureia e creatinina (DAHER *et al.*, 2010a; BRASIL, 2011b). O tratamento é feito através do uso de antibióticos, e quando precoce é benéfico para o curso da doença, enquanto o tratamento tardio pode apenas reduzir os períodos de recuperação e minimizar sequelas (WATT *et al.*, 1988).

### ***1.2.5 Patogênese***

Os mecanismos exatos da patogênese da leptospirose ainda não são bem compreendidos e necessitam de mais estudos, sendo o uso de modelos animais indispensável para a compreensão da biologia, transmissão, colonização e patogênese de *Leptospira* (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

A leptospirose é uma vasculite infecciosa que, na forma grave, os pacientes podem desenvolver alterações hemodinâmicas secundárias à hipovolemia devido à desidratação e aos efeitos diretos das toxinas que lesam o endotélio vascular e aumentam a permeabilidade (DAHER *et al.*, 1999).

O comprometimento renal é uma complicação frequente nos pacientes com a forma grave da leptospirose, caracterizado principalmente por uma associação de dano intersticial e tubular. Os principais fatores envolvidos na patogênese da IRA na leptospirose são ação nefrotóxica direta da leptospira e ação das toxinas com indução da resposta imune, desencadeando um processo de nefrite intersticial aguda (CERQUEIRA *et al.*, 2008).

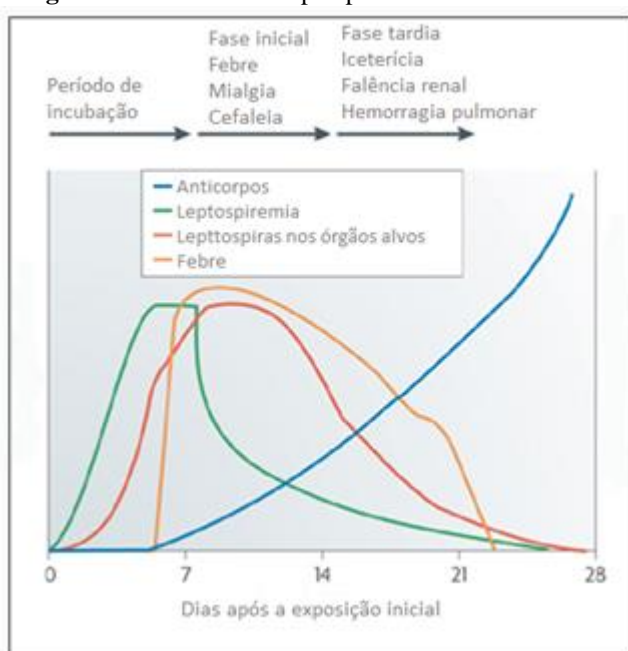
Os principais candidatos a fatores de virulência que contribuem para patogênese da leptospirose são o LPS (fator de virulência geral de bactérias gram-negativas), hemolisinas, proteínas da membrana externa e outras proteínas de superfície, bem como moléculas de adesão. A capacidade de hemolisinas para lisar os eritrócitos e outras membranas celulares torna potenciais fatores de virulência (EVANGELISTA; COBURN, 2010). O mecanismo de resistência à leptospirose é mediado em grande parte pela resposta humoral e os anticorpos produzidos são dirigidos principalmente contra o LPS da leptospira (LEVETT, 2001; KO; GOARANT; PICCARDEAU, 2009).

### 1.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se no quadro clínico e nos dados epidemiológicos, sendo confirmado por testes laboratoriais. O diagnóstico clínico pode ser difícil, havendo possibilidade de confusão com dengue, hantavírus, meningite viral ou bacteriana, malária ou hepatites virais (BRASIL, 2010).

O método laboratorial de escolha depende da fase evolutiva em que se encontra o paciente (Figura 12). Na fase precoce, as leptospirosas podem ser visualizadas no sangue por meio de exame direto, de cultura, inoculação em animais de laboratório ou detecção do DNA do microrganismo através do PCR. A cultura somente se finaliza (positiva ou negativa) após algumas semanas, o que garante apenas um diagnóstico retrospectivo e o PCR apesar de ser uma técnica precoce e sensível, possui custo muito elevado (BHARTI *et al.*, 2003).

**Figura 12** - Cinética da leptospirose.



Fonte: KO; GOARANT; PICCARDEAU, 2009 (adaptado)

Na fase tardia, as leptospiras podem ser encontradas na urina, cultivadas ou inoculadas em animais, porém, pelas dificuldades inerentes à realização destes testes, os métodos sorológicos são rotineiramente mais utilizados (BRASIL, 2010). Os anticorpos IgM anti-leptospira podem ser detectados por volta do 6º e 10º dia de doença e, geralmente, seus níveis atingem o pico máximo de produção dentro de 3 a 4 semanas de infecção, os quais gradualmente regridem, mas podem permanecer detectáveis por muitos anos (CHALAYON *et al.*, 2011).

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

### **1.3 Hantavírus**

#### ***1.3.1 Epidemiologia***

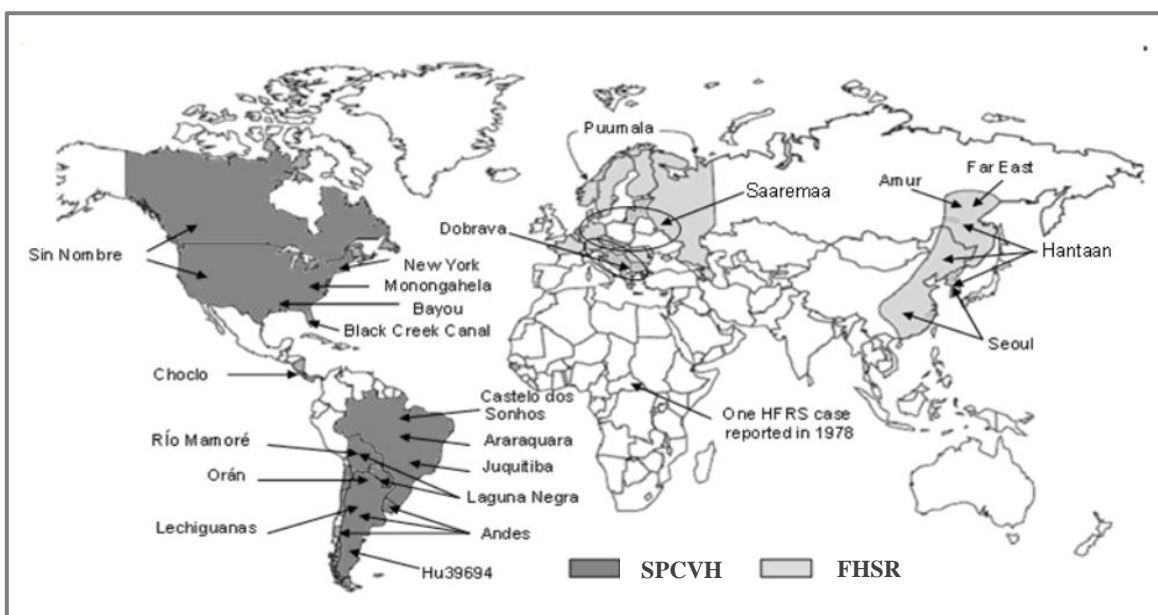
As hantaviroses são zoonoses que ocorrem em quase todo o mundo. Atualmente são conhecidas 2 formas clínicas da doença humana associadas à infecção por hantavírus: a febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR), que ocorre atualmente na Ásia e Europa, e a síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus (SPCVH), que ocorre nas Américas (FIGUEIREDO, 2004; FIGUEIREDO, 2006; Figura 13). Em alguns surtos, a FHSR e a SPCVH podem atingir taxas de mortalidade de até 12% e 60%, respectivamente (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

Esse vírus foi inicialmente descrito em 1934, na Suécia, causando acometimento renal. A primeira doença ligada a esses vírus foi a febre hemorrágica da Coreia, que acometeu soldados durante a guerra nos anos 50 (LEE, 1982). Em 1978, Lee e colaboradores isolaram o vírus Hantaan de ratos selvagens, sendo esse agente classificado entre os *Bunyavirus* (LEE, 1982). Em maio de 1993, casos de doença aguda foram reportados no Novo México, Arizona e Colorado, nos Estados Unidos.

Atualmente, a hantavirose está propagada globalmente, atingindo Europa, Ásia e Américas (Norte, Central e do Sul). Na América do Sul, além do Brasil, atinge também principalmente Argentina, Chile e Paraguai. Portanto, é uma zoonose emergente e amplamente distribuída em praticamente todo o mundo (SCHMALJOHN; HJELLE, 1997). Em todo o mundo, é possível que haja cerca de 150.000 casos de FHSR anualmente. Em contrapartida, cerca de 2.000 casos de SPCVH foram relatados em focos esporádicos nas Américas (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

A distribuição geográfica da hantavirose é consequência da distribuição e da história natural dos seus hospedeiros primários: os roedores (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010). Além disso, ambas as manifestações clínicas causadas pela infecção pelo hantavírus ocorrem principalmente nas áreas rurais devido a maior exposição aos roedores (NICHOL, 2001).

**Figura 13** - Distribuição global de hantavírus: FHSR e SPCVH.



Fonte: ZHENQIANG BI; FORMENTY, 2008 (adaptado).

Determinados profissionais possuem maiores chances de contrair a hantavirose, devido a maior proximidade com o agente infectante, como caçadores, trabalhadores florestais, fazendeiros e militares (ZEITZ *et al.*, 1997). Além disso, investigações epidemiológicas também demonstraram uma forte relação entre o índice de infecção com hantavírus e baixas condições econômicas (HART; BENNETT, 1999).

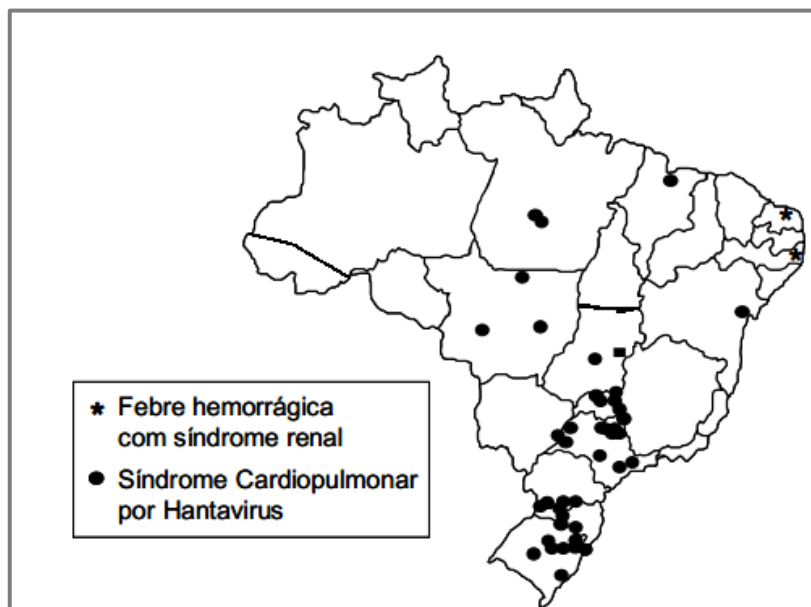
A hantavirose pode desencadear infecções assintomáticas ou com quadros leves e inespecíficos, resultando em uma subestimação do número de infecções por hantavírus (ZHENQIANG BI; FORMENTY, 2008).

No Brasil, o vírus do tipo Hantaan já foi isolado de ratos domésticos no Brasil em 1985 (LE DUC *et al.*, 1985). Além disso, evidência sorológica da doença pelo vírus Seoul foram comprovadas em Recife-PE em pacientes com suspeita inicial de leptospirose (HINRICHSEN *et al.*, 1993). Os primeiros pacientes portadores de SPCVH foram diagnosticados em 1993, em Jucituba-SP, quando 3 irmãos adquiriram a virose em área de desmatamento (SILVA *et al.*, 1997).

No Brasil, 1.195 casos de SPCVH foram relatados entre 1993 e 2009, com taxa de fatalidade de 40% (BRASIL, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2010). As regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste registraram quase 92% dos casos, sendo as principais regiões acometidas por esta doença. É uma doença de notificação compulsória e apesar da ocorrência da hantavirose em todas as regiões brasileiras, apenas 14 estados registraram casos: Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Distrito Federal, Pará, Goiás, Maranhão, Amazonas, Rondônia, Rio Grande do Norte e Bahia (BRASIL, 2010).

Ao contrário do que normalmente ocorre nas Américas onde a forma clínica usualmente encontrada é a SPCVH, em Natal-RN e em Recife-PE descreveram-se casos de FHSR, tendo sido a confirmação do diagnóstico obtida através de imunohistohistoquímica aplicada a tecidos retirados durante a necropsia (HINRICHSEN *et al.*, 1993; FERREIRA, 2003; Figura 14.).

**Figura 14** - Distribuição geográfica dos casos de hantavirose ocorridos no Brasil, entre 1993 e 2001.



Fonte: FUNASA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001

Desta forma, até o presente momento, nenhum caso foi notificado no Estado do Ceará. No entanto, estudo de soroprevalência de hantavirose realizado no Ceará mostrou a ocorrência de anticorpos anti-hantavírus em roedores (*Necromys lasiurus*) (CHIORATTO *et al.*, 2010). Outro importante relato na literatura foi a possível existência desta doença em humanos no Estado do Ceará, através da sorologia positiva em 3 pacientes com suspeita clínica de dengue (LIMA *et al.*, 2011).

Não existe vacina que previna infecção por hantavírus americanos, logo a profilaxia é de extrema necessidade. Dessa forma, recomenda-se evitar contato com roedores silvestres, especialmente, tomando medidas que não os atraiam às proximidades das habitações ou locais onde sementes são armazenadas (FIGUEIREDO *et al.*, 2000). Além disso, é necessário também buscar assistência médica no início do quadro, permitindo o diagnóstico precoce e consequente implementação de terapia precoce e eficaz, com o objetivo de evitar a evolução da doença para insuficiência respiratória e choque, diminuindo a letalidade dos casos.

As vacinas têm sido utilizadas na República da Coreia e na China por alguns anos, mas não fora da Ásia, apesar de ter sido demonstrada como segura e eficaz (CHEN; LUO; ZHANG, 2002; VAHERI *et al.*, 2013).

### **1.3.2 Agente etiológico**

Os vírus causadores das hantavirose pertencem a família Bunyaviridae, sendo reconhecidos 5 gêneros (DOS SANTOS; GARRETT, 2005). Essa família possui mais de 300 vírus que podem infectar plantas, animais, artrópodes e seres humanos, sendo que o hantavírus é o único bunyavírus que não é um arbovírus (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

Os hantavírus pertencem ao gênero *Hantavirus* que são vírus de RNA de fita simples, envelopados, esféricos, medindo de 80 a 120 nm de diâmetro. Seu genoma é trissegmentado e com polaridade negativa, possuindo projeções glicoproteicas em sua superfície (LEDNICKY, 2003; FIGUEIREDO, 2004).

Os segmentos são denominados de L (*large* – grande), M (*medium* – médio), S (*small* – pequeno) e eles codificam, respectivamente, RNA polimerase dependente de RNA viral (proteína L), precursor para as duas glicoproteínas de superfície (Gn ou G1 e Gc ou G2), relacionados ao reconhecimento de receptores celulares e à indução de imunidade, e o nucleocapsídeo viral (Figura 15). Em alguns hantavírus, o segmento S é também responsável

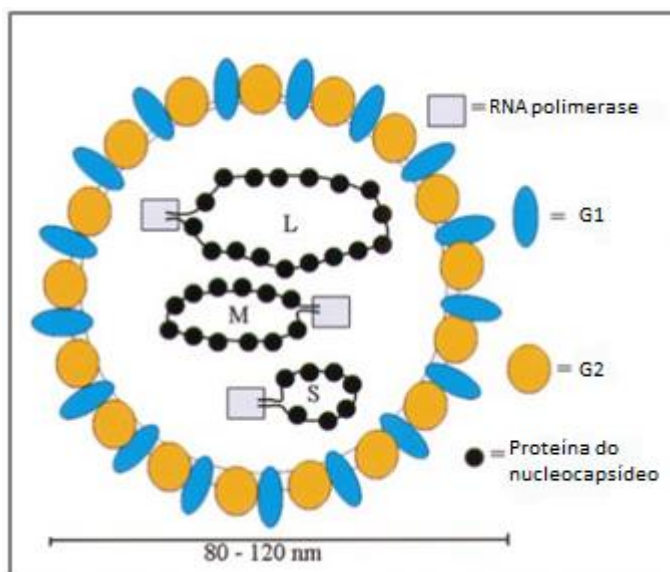


pela codificação de uma proteína não estrutural, chamada de NS, responsável por agir como um antagonista de IFN (SCHMALJOHN *et al.*, 1986; PINCELLI *et al.*, 2003; JAASKELAINEN *et al.*, 2007; JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

Nas Américas, existem 2 linhagens de hantavírus: uma patogênica, que está associada à ocorrência da doença, pois foram identificadas em roedores e em pacientes, e outra, que, até o momento, só foi detectada em roedores silvestres, ainda sem evidências de causar a doença em seres humanos (BRASIL, 2009).

Atualmente, são conhecidas 16 variantes de hantavírus associados à transmissão da SCPH nas Américas. No Brasil, foram identificadas 7 variantes, sendo 5 associadas com a SCPH (Araraquara, Juquitiba, Castelo dos Sonhos, Anajatuba e Laguna Negra) e 2 (Rio Mearim e Rio Mamoré), até o momento, só foram detectadas em roedores (BRASIL, 2009).

**Figura 15** - Representação esquemática de uma partícula de hantavírus. As letras L, M e S representam os segmentos grande, médio e pequeno, respectivamente, do genoma.



Fonte: LEDNICKY, 2003 (adaptado).

### 1.3.3 Transmissão

Roedores silvestres são os prováveis reservatórios de hantavírus. Cada tipo de vírus parece ter tropismo por uma determinada espécie de roedor e somente a ela, uma vez que esses vírus parecem ter antiga e estreita relação, provavelmente tendo coevoluído com seus reservatórios animais (BRASIL, 2009).

Os vírus associados à FHSR são transmitidos por roedores da subfamília Murinae, sendo os principais gêneros responsáveis pela transmissão: *Myodes*, *Rattus* e *Apodemus*. Os vírus causadores da SPCVH são transmitidos pelos roedores da ordem Rodentia, família Muridae e subfamília Sigmodontinae (ZHAO; HAY, 1997; FIGUEIREDO *et al.*, 2000). No Brasil, conhecem-se, até o momento, 7 espécies de roedores silvestres que são consideradas como prováveis reservatórios, entre elas o *Necromys lasiuru* e *Oligoryzomys nigripes* (BRASIL, 2009).

Nos roedores, a infecção pelo hantavírus é transmitida de forma horizontal e não é letal, mantendo a infecção persistente e tornando-o um reservatório por longo período. Os vírus podem ser detectados em diversos órgãos do animal, mesmo após meses do contágio (ZHAO; HAY, 1997).

Os hantavírus são eliminados, principalmente, pela urina, além das fezes e saliva dos roedores infectados. A infecção por hantavírus nos seres humanos acontece, mais frequentemente, pela inalação de partículas virais provenientes de aerossóis formados a partir da urina, fezes e secreções contaminadas de roedores silvestres. Outras formas de transmissão foram descritas, como mordedura de roedores (CHILDS *et al.*, 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 2010) e transmissão pessoa a pessoa, relatada, de forma esporádica, na Argentina e Chile, sempre associada ao hantavírus Andes (WELLS; ESTANI; YADON, 1997; PETERS, 1998; PADULA *et al.*, 1998).

O período de incubação do vírus dura, em média, de 2 a 3 semanas, com variação de 9 a 33 dias (YOUNG *et al.*, 2000b). Enquanto que o período de transmissibilidade do hantavírus no homem é desconhecido. Estudos sugerem que o período de maior viremia seria alguns dias que antecedem o aparecimento dos sinais/sintomas (DOS SANTOS; GARRETT, 2005; BRASIL, 2009).

#### **1.3.4 Manifestações clínicas**

As hantavirose podem se manifestar sob variadas formas, desde uma síndrome febril até quadros mais característicos, como a FHSR, que ocorre no território eurasiático, e a SCPVH, presente no continente americano (FIGUEIREDO; CAMPOS; RODRIGUES, 2001).

#### 1.3.4.1 Febre hemorrágica com síndrome renal

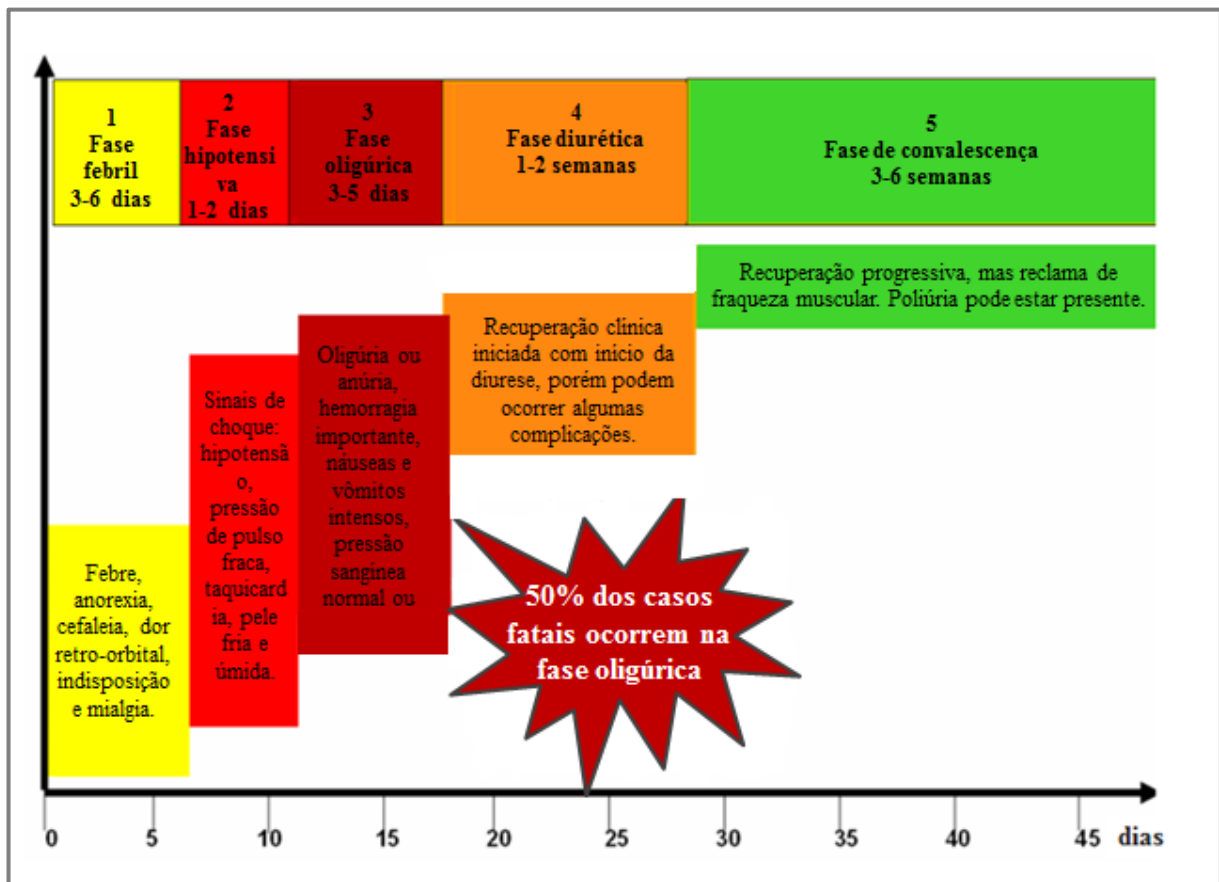
Classicamente, divide-se a evolução clínica da FHSR em 5 fases: febril, hipotensiva, oligúrica, diurética e de convalescência; esses períodos podem superpor-se e, nos casos leves, nem mesmo ocorrer (MCKEE; LE DUC; PETERS, 1991; Figura 16). O início desta doença mostra-se abrupto e manifesta-se com febre elevada, calafrios, cefaleia retroorbital, fotofobia, mialgias, dor abdominal, náuseas e vômitos (FERREIRA, 2003; KRAUTKRAMER; ZEIER; PLYUSNIN, 2012).

Muitos pacientes se recuperam lentamente a partir dessa fase, mas alguns evoluem para a hipotensão e choque que costuma ocorrer antes do 5º ou 6º dia. As hemorragias revelam-se comuns nessa fase. A função renal deteriora, em geral, 24 horas após a hipotensão, surgindo oligúria ou mesmo anúria, requerendo o uso de métodos dialíticos. A recuperação a partir daí pode ser rápida, com surgimento de diurese intensa e episódios de hipertensão arterial. A taxa de letalidade é baixa e varia de 1 a 10% (FERREIRA, 2003).

As anormalidades hematológicas mais comuns na fase tardia da FHSR são plaquetopenia e leucocitose (RABONI *et al.*, 2005).

Essa enfermidade deve ser diferenciada, clinicamente, da leptospirose e de outras febres hemorrágicas virais que ocorrem nas mesmas áreas de ocorrência das hantavirose (BRASIL, 2009).

Figura 16 - Curso clínico e sintomatológico da FHSR.



Fonte: ZHENQIANG BI; FORMENTY, 2008 (adaptado)

#### 1.3.4.2 Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus

A SCPVH é uma doença mais grave do que FHSR, com uma taxa de mortalidade de cerca de 40% (LEDNICKY, 2003). A SCPVH apresenta-se como doença febril aguda caracterizada pelo grave comprometimento cardiovascular e respiratório. O curso clínico desta forma clínica é dividido em 3 períodos: o febril ou pródromo, fase cardiopulmonar e fase de convalescência (HALLIN *et al.*, 1996; Figura 17).

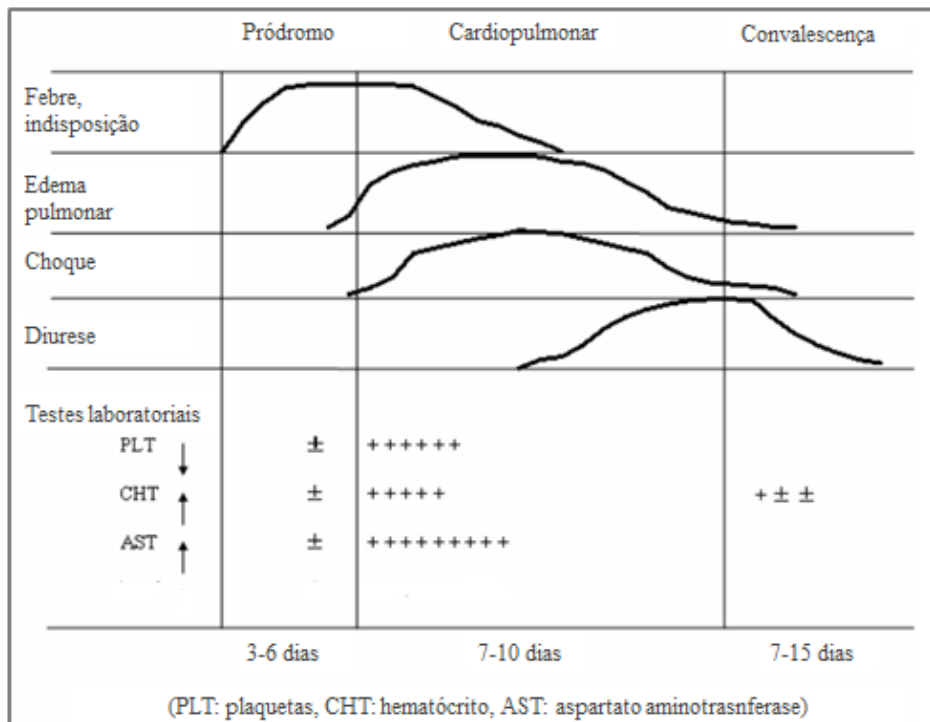
O reconhecimento precoce dessa doença, baseando-se nos sinais e sintomas iniciais, não é fácil de ser realizado e pode ser confundido com outras doenças endêmicas prevalentes nas mesmas áreas, tais como o dengue e a leptospirose (PETERS, 1998).

O início da doença é caracterizado por febre, mialgias, náuseas, diarreia e, menos frequentemente, cefaleia, vômitos, dor abdominal, dor torácica, sudorese e vertigem; tosse e dispneia podem estar presentes nessa fase. A fase febril é seguida por uma fase cardiopulmonar caracterizada pelo início agudo do edema pulmonar (HALLIN *et al.*, 1996). Nesta fase, a tosse está geralmente presente, e manifestações gastrointestinais podem dominar

as apresentações clínicas. A fase cardiorrespiratória da doença caracteriza-se pela progressiva infiltração de líquido e proteínas no interstício e alvéolos pulmonares, levando à taquipneia, hipoxemia e taquicardia. A hipotensão é comum nessa fase e pode evoluir para o choque (HALLIN *et al.*, 1996).

A radiografia do tórax habitualmente demonstra infiltrado intersticial difuso bilateral, que rapidamente evolui com enchimento alveolar, especialmente nos hilos e nas bases pulmonares (BRASIL, 2009). Também, eleva-se o hematócrito por extravasamento de fluidos do intravascular para o parênquima pulmonar. Observa-se leucocitose, linfócitos atípicos no sangue periférico e plaquetopenia (FIGUEREIDO, 2004).

**Figura 17** - Curso clínico e sintomatológico da SCPVH.



Fonte: ZHENQIANG BI; FORMENTY, 2008 (adaptado)

Atualmente, não há nenhuma terapia específica viável para FHSR ou SCPVH, portanto, o tratamento continua a ser a medida de suporte. O manejo deve incluir admissão precoce para uma unidade de terapia intensiva, onde a oxigenação do sangue e dos tecidos, o débito cardíaco, a pressão arterial e pressão cerebral podem ser monitorados (LÁZARO *et al.*, 2007).

### **1.3.5 Patogênese**

SCPVH tem uma patogênese complexa relacionada à presença da infecção pelo hantavírus e a uma intensa ativação da resposta imune que resulta em alterações na permeabilidade vascular (ENRIA *et al.*, 2001).

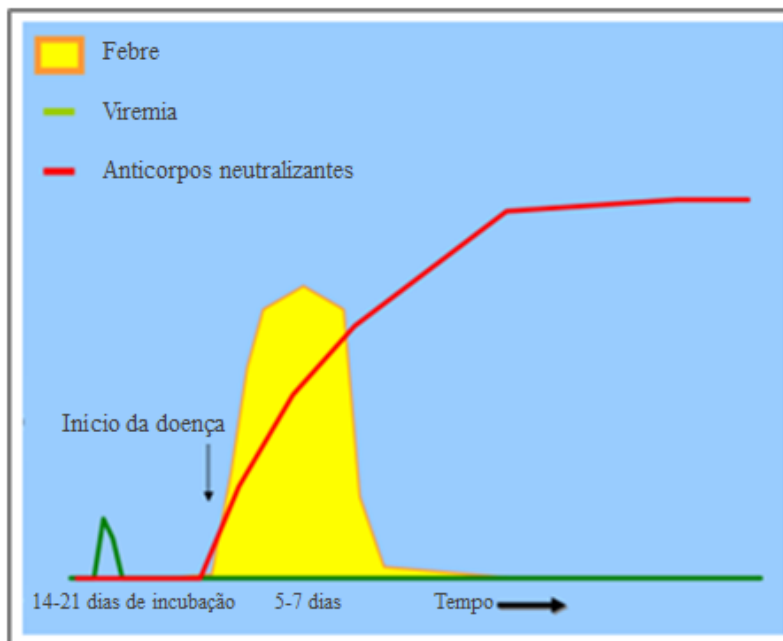
A infecção nos pulmões começa com a interação das glicoproteínas de superfície (Gn e Gc) do hantavírus com as células-alvo endoteliais e macrófagos (GAVRILOVSKAYA *et al.*, 1999a; GAVRILOVSKAYA *et al.*, 2002). Os hantavírus americanos utilizam  $\beta 3$  integrinas como receptores para infectar as células. Estas proteínas compõem as junções que unem as células endoteliais e fecham a barreira alvéolo-capilar (GRAVILOVSKAYA *et al.*, 1998). Estas células permitem a replicação do vírus, induzindo a ativação imune (GRAVILOVSKAYA *et al.*, 1999b). A ativação da resposta imune, especialmente por macrófagos e células T CD8, pode estar envolvida na patogênese que leva à insuficiência respiratória (ENNIS *et al.*, 1997; KILPATRICK *et al.*, 2004). A infecção viral, provavelmente, desencadeia agressão imunológica, humoral e celular, ao endotélio vascular, principalmente em nível pulmonar. Em consequência dessa agressão, ocorre extravasamento de líquidos e edema pulmonar, levando à insuficiência respiratória. As plaquetas, que também possuem  $\beta 3$  integrinas em sua membrana, são infectadas pelos hantavírus, ocorrendo plaquetopenia e redução da adesividade plaquetária, o que explica, em parte, fenômenos hemorrágicos que ocorrem nesses pacientes (FIGUEIREDO *et al.*, 2000).

### **1.3.6 Diagnóstico**

O diagnóstico das infecções por hantavírus baseia-se nas informações clínicas-epidemiológicas e nos testes laboratoriais. No entanto, torna-se quase impossível diagnosticar casos com sintomatologia leve a moderada por apenas dados clínicos, sendo de grande importância o diagnóstico laboratorial.

O diagnóstico laboratorial da infecção aguda por hantavírus é baseado primeiramente em sorologia, uma vez que os RNA virais não podem ser regularmente detectados no sangue ou urina dos pacientes em hospitais (PLYUSNIN *et al.*, 1999), embora o vírus seja facilmente detectável por RT-PCR durante a doença aguda, em laboratórios de pesquisa (KRAMSKI *et al.*, 2007). O diagnóstico sorológico é possível, mesmo na fase aguda da doença, porque os anticorpos na SPCVH surgem juntamente com o aparecimento dos sinais e sintomas (FIGUEIREDO *et al.*, 2000; Figura 18).

**Figura 18** - Viremia e resposta imunológica em humanos com infecção por hantavírus.



Fonte: ZHENQIANG BI; FORMENTY, 2008 (adaptado)

Para sorologia, comumente utilizam-se como antígenos proteínas do nucleocapsídeo viral (N) ou as glicoproteínas Gn e Gc do envelope viral. O método mais utilizado é o ELISA indireto, porém outros métodos sorológicos, como a imunofluorescência indireta, podem ser utilizados (KRAUS *et al.*, 2005). Nos casos de óbito, a imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-hantavírus Puumala costuma ser utilizada para confirmar o diagnóstico (SAGGIORO *et al.*, 2007). A técnica ELISA-IgG é utilizada apenas em estudos epidemiológicos, para detectar infecção viral anterior, em roedores ou em seres humanos (BRASIL, 2009).

O diagnóstico virológico pode ser feito por IV em culturas de células de rim de macaco verde africano (VERO-E6) com posterior identificação do vírus isolado por imunofluorescência ou por RT-PCR. O grande problema no manuseio dos hantavírus é que existe risco de contaminação dos pesquisadores em laboratório e, por isso, recomenda-se que esse trabalho seja feito em laboratórios de segurança do tipo 3. O RT-PCR também pode ser feito após extração de RNA diretamente no sangue total ou soro de pacientes com a SPCVH, detectando o genoma viral (FIGUEIREDO *et al.*, 2000).

#### **1.4 Justificativa**

Apesar de existir uma quantidade considerada de testes de diagnóstico para dengue, o diagnóstico clínico ainda é muito limitado, devido ao seu amplo e inespecífico quadro clínico. Assim, baseado no fato de que, em epidemias, a confirmação dos casos de dengue pode ser realizada através de critérios clínicos e epidemiológicos, muitas doenças podem estar sendo subdiagnosticadas em função da superestimação dos casos de dengue. Diante da possibilidade de outros patógenos causarem doença com quadro clínico semelhante ao da dengue, a relevância desse estudo está centrada na pesquisa da possível ocorrência de leptospirose e hantavirose nos pacientes que apresentaram diagnóstico laboratorial negativo para dengue. A definição etiológica correta é de suma importância no combate dos vetores e/ou reservatórios e no auxílio na adoção de medidas preventivas e terapêuticas.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Identificar a etiologia dos pacientes com quadro dengue-símile atendidos em hospital de referência de doenças infecciosas.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1. Investigar os casos suspeitos de dengue, através de ELISA IgM, RT-PCR e imunocromatográfico NS1;

2.2.2. Detectar os pacientes com dengue secundária, através de ELISA IgG;

2.2.3. Investigar casos de leptospirose nos quadros de dengue-símile, através de ELISA IgM e PCR;

2.2.4. Investigar casos de hantavírus nos quadros de dengue-símile, através de RT-PCR;

2.2.5. Detectar possíveis casos de hantavirose nos pacientes suspeitos de dengue, através de ELISA-IgM e ELISA-IgG;

2.2.6. Descrever as características clínicas e epidemiológicas dos casos confirmados para dengue, leptospirose e hantavirose.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Delineamento do estudo

Estudo de corte transversal descritivo de etiologia febril em pacientes com síndrome febril aguda.

#### 3.2 População do estudo

Os pacientes foram recrutados durante Janeiro a Setembro de 2012 no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) (Fortaleza, Ceará, Brasil) por busca ativa nos ambulatórios e nas enfermarias e convidados a participar do estudo. Eles deveriam obedecer aos seguintes critérios para inclusão, ou não, no estudo:

- **Critérios de inclusão:** pacientes com quadro febril de até 5 dias de duração, associado a pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retroorbitária, mialgias, artralgias, prostração e exantema. Os pacientes internados nas enfermarias foram inclusos no estudo com até 12 dias de sintomatologia.
- **Critérios de exclusão:** pacientes com idade inferior a 18 anos, gestantes, com mais de 5 dias de sintomatologia, salvo os pacientes de enfermaria, ou com sinais de localização que sugeriam outra etiologia (ex: influenza, gastroenterite, etc.).

Todos os pacientes inclusos no estudo assinaram o termo de consentimento livre esclarecido – TCLE (APÊNDICE A) e responderam ao questionário clínico-epidemiológico (APÊNDICE B).

#### 3.3 Coleta e processamento das amostras

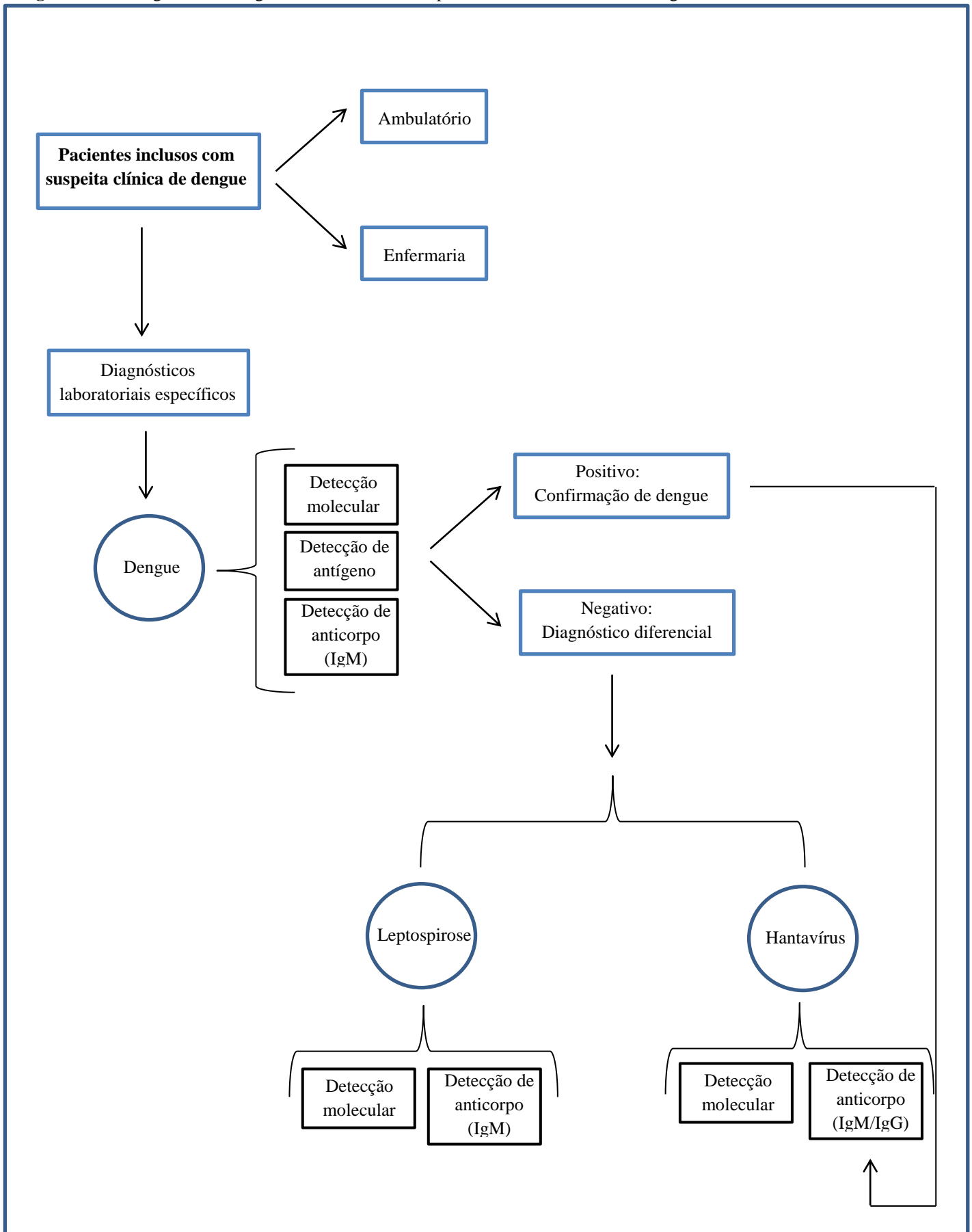
Aproximadamente 10 ml de sangue de cada paciente foram coletados em tubo vacutainer sem anticoagulante e encaminhados ao Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC) para processamento. O sangue foi submetido à uma centrifugação de 1.500g por 5 minutos a 4°C, para a obtenção do soro. As amostras de soro foram estocadas a -70°C e posteriormente submetidas aos testes de diagnósticos.

Foram realizadas duas coletas, a primeira até o 5º dia de febre, objetivando uma amostra com maior probabilidade de carga viral para realização dos testes virológicos, e a segunda após 2 dias, no mínimo, da data da primeira coleta, com o objetivo de se obter uma

provável maior concentração de anticorpos da classe IgM, assegurando a confiabilidade nos testes imunológicos. O pequeno intervalo de tempo foi adotado a fim de evitar evasão dos pacientes durante o retorno do projeto.

As amostras de soro da 1ª coleta foram testadas para detecção da proteína NS1, através de ensaio imunocromatográfico, do RNA viral de dengue e hantavírus, através do RT-PCR, do DNA bacteriano de *Leptospira* sp., através do PCR, de IgG anti-dengue e de IgM e IgG anti-hantavírus, por ELISA. As amostras de soro da 2ª coleta foram testadas para detecção de IgM anti-dengue e de IgM anti-leptospira, através do ELISA. Nos casos em que o diagnóstico de dengue foi negativo através dos métodos sorológicos e virológicos, os diagnósticos diferenciais para leptospirose e hantavirose foram adotados, com exceção das sorologias para hantavírus que foram realizadas em todos os pacientes, a fim de aumentar o número amostral (Figura 19).

**Figura 19** - Fluxograma dos diagnósticos realizados nos pacientes com síndrome febril aguda.



### **3.4 Local de estudo**

As técnicas de diagnóstico sorológico e imunocromatográfico foram realizadas no Laboratório de Parasitologia da UFC, sob a autorização das Profas. Dras. Maria Jania Teixeira e Cristina Chaves.

As sorologias para hantavírus foram realizadas no Centro de Virologia da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo.

As técnicas de diagnóstico molecular foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e de Desenvolvimento da Universidade de Fortaleza, sob a autorização dos Profs. Dra. Luciana Relly Bertolini e Dr. Marcelo Bertolini.

### **3.5 Definição de caso confirmado para dengue**

Foi adotada a definição de caso confirmado para dengue proposta pelo Ministério da Saúde. De acordo com esse manual, o indivíduo deve se encontrar com uma doença febril aguda, acompanhada de pelo menos 2 dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, prostração e/ou exantema. Além disso, o paciente deve ser confirmado laboratorialmente através da detecção do vírus, ou dos antígenos virais, ou da sorologia positiva (BRASIL, 2011a).

### **3.6 Técnicas laboratoriais**

#### ***3.6.1 Dengue***

##### ***3.6.1.1 Teste Imunocromatográfico NS1 Ag STRIP***

O teste dengue NS1 Ag STRIP<sup>®</sup> (Bio-Rad) é um teste de detecção qualitativa do antígeno NS1 do vírus dengue no soro ou plasma humano. É um teste rápido e descartável que utiliza a imunocromatografia de fluxo lateral. A fita dengue NS1 Ag STRIP é colocada na posição vertical dentro do tubo de vidro contendo 50 µl da amostra do paciente e uma gota de tampão de migração. A amostra migra ao longo da fita e os resultados são lidos após 15 minutos do início do teste. Quando o antígeno está presente na amostra, este se liga aos anticorpos anti-NS1 fixados nas partículas de ouro coloidal. Após a migração, os complexos são capturados pelos anticorpos anti-NS1 na linha teste, onde aparece uma coloração violeta. O teste foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.6.1.2 *IgM ELISA*

O dengue IgM ELISA test<sup>®</sup> (Bioeasy) é um ensaio imunoenzimático para detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-dengue em soro humano. O kit contém uma microplaca, marcada com anticorpos anti-IgM humano anti-dengue (captura). Durante a primeira incubação, os anticorpos IgM anti-dengue no soro do paciente ligam-se a anticorpos anti-IgM humano anti-dengue presente na microplaca, em seguida adiciona-se o conjugado anti-dengue HRP. Todos os materiais não ligantes foram removidos por lavagem. A atividade da enzima residual encontrada nas cavidades foi evidenciada pela incubação da fase sólida com uma solução do substrato tetrametilbenzidina (TMB). A leitura colorimétrica foi obtida usando-se um espectrofotômetro em 450nm e o teste foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.6.1.3 *IgG ELISA*

O dengue IgG ELISA test<sup>®</sup> (Bioeasy) é um ensaio imunoenzimático para detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-dengue em soro humano. O kit contém uma microplaca, marcada com anticorpos anti-IgG humano anti-dengue (captura). Durante a primeira incubação, anticorpos IgG anti-dengue no soro do paciente ligam-se a anticorpos anti-IgG humano anti-dengue presente na microplaca, em seguida adiciona-se o conjugado anti-dengue HRP. Todos os materiais não ligantes são removidos por lavagem. A atividade da enzima residual encontrada nas cavidades foi evidenciada pela incubação da fase sólida com uma solução do substrato tetrametilbenzidina (TMB). A leitura colorimétrica foi obtida usando-se um espectrofotômetro em 450nm e o teste foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.6.1.4 *Extração RNA*

A extração do material genético foi realizada através da utilização do Kit QIAamp<sup>®</sup>Viral RNA (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. O QIAamp<sup>®</sup>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. Após a etapa inicial de lise celular com o tampão AVL e a posterior precipitação do ácido nucléico com o etanol absoluto, o material foi transferido para a coluna sílica-gel de alta afinidade para RNA e submetida a centrifugações e lavagens. Após essas etapas, o RNA que ficou ligado à

membrana foi eluído através da adição da solução tampão AVE. O RNA extraído foi utilizado para realização das reações de RT-PCR.

#### 3.6.1.5 RT-PCR

A identificação da infecção viral a partir do método molecular foi realizada através do Kit QIAGEN<sup>®</sup> OneStep RT-PCR (QIAGEN) que contém enzimas Omniscript e Sensiscript que permitem a transcrição reversa, e a HotStarTaq<sup>®</sup> que é responsável pela amplificação do material genético. Para amplificação do material genético foram utilizados os iniciadores AD3 e AD4 (HENCHAL, 1991; Tabela 1) que reconhecem a região responsável pela transcrição da proteína NS1 e produzem um fragmento de 420pb. O volume final da reação consistia em 25µl, sendo 5µl de RNA (1pg - 2µg), 5µl da solução tampão One-Step RT-PCR (Tris·Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT; pH 8.7), 1µl de dNTPs (10mM), 1µl de cada iniciador (20 pmol), 0,5µl do QIAGEN One-Step RT-PCR Enzyme Mix e água destilada para completar o volume final da reação. O perfil térmico da reação consistiu de 30 minutos a 50°C para a fase RT e 15 minutos a 95°C para a ativação da Taq Polimerase e desnaturação das enzimas responsáveis pela transcrição reversa, seguidos de 35 ciclos de PCR: 95°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 1 minuto para extensão. Após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 10 minutos foi realizada. O controle da reação para a detecção do genoma do vírus dengue utilizado foi o RNA extraído de uma cultura de células C6/36 de *A. albopictus* infectada com vírus DENV-2, New Guinea (NGC) gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP).

#### 3.6.1.6 Eletroforese

O resultado do RT-PCR foi analisado através de eletroforese horizontal. Nesta reação, 10µL do produto foi adicionado a corrida, juntamente com o tampão Loading Dye (Fermentas) e o revelador Gel Red<sup>TM</sup> (Uniscience). O gel de agarose foi produzido na concentração de 2% com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e submetido a 80 volts por 1 hora. Em seguida o gel foi visualizado à luz ultravioleta e analisado através do equipamento FluorChem FC2<sup>®</sup> (Alpha Innotech). O fragmento foi de 420pb.

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

Iniciador	Sequência (5'-3')
<b>Dengue</b>	
AD3	CTGATTTCCATCCCGTA
AD4	GATATGGGTTATTGGATAGA
<b>Leptospirose</b>	
LP1	ATACAACCTTAGGAAGAGCAT
LP2	GCT TCTTTGATATAGATCAA
<b>Hantavírus</b>	
G1/HANGGn-C	GGGCAGTAAGTGCTGAAAC
G1/HANGGn-S	ACATTTAGCAGTTTGCCATGGG
SAHN-S	GATGAATCATCCTTGAACCTTAT
SAHN-C	CAAACCCAGTTGATCCAACAGGG

### 3.6.2 *Leptospirose*

#### 3.6.2.1 *IgM ELISA*

O Serion ELISA *classic* *Leptospira* IgM<sup>®</sup> (Virion\Serion) é um ensaio imunoenzimático quantitativo e qualitativo para detecção de anticorpos IgM anti-leptospira. As cavidades da microplaca do kit são revestidas com antígenos específicos da leptospira. A amostra é adicionada e todos os anticorpos específicos para o antígeno irão se ligar ao mesmo. Após remoção do material não ligado, um anticorpo secundário, anti-IgM humano, conjugado com fosfatase alcalina é deixado reagir com o complexo imune. Após a remoção do excesso de conjugado por lavagem, o substrato p-nitrofenilfosfato é adicionado, e a enzima conjugada reage produzindo um derivado corado deste substrato. A intensidade da cor é proporcional a concentração do analito na amostra e é quantificada por fotometria. A leitura colorimétrica foi obtida usando-se um espectrofotômetro em 450nm. O teste foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

#### 3.6.2.2 *Extração DNA*

A extração do material genético foi realizada através da utilização do Kit QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. O QIAamp<sup>®</sup> DNA



Mini proporciona a purificação do DNA total da amostra, utilizando uma membrana sílica-gel de alta afinidade. Após a etapa inicial de lise celular com a proteinase K e a posterior precipitação do ácido nucléico com o etanol absoluto, o material foi transferido para a coluna sílica-gel de alta afinidade para DNA e submetida a centrifugações e lavagens. Após essas etapas, o DNA que ficou ligado à membrana foi eluído através da adição da solução tampão AE. O DNA extraído foi utilizado para realização das reações de PCR.

### 3.6.2.3 PCR

A detecção do DNA bacteriano nas amostras foi realizada através da utilização do Kit Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), que contém a enzima Platinum® *Taq* DNA Polimerase responsável pela amplificação do material genético. Para amplificação do material genético foram utilizados os iniciadores LP1 e LP2 que reconhecem uma sequência conservada na região do 16S do RNA ribossomal da *Leptospira* e produzem um fragmento de 274pb (FONSECA *et al.*, 2006a; KEE *et al.*, 1994) (Tabela 1). O volume final da reação consistia em 50µl, sendo 10µl de DNA (aproximadamente 1ng), 5µl do tampão 10X sem Mg<sup>2+</sup>, 2 µl de Mg<sup>2+</sup> (50mM), 2µl de dNTPs (10mM), 1µl de cada iniciador (20 pmol), 1µl da *Taq* polimerase e água destilada para completar o volume final da reação. O perfil térmico da reação consistiu de 5 minutos a 94°C para a ativação da *Taq* Polimerase, seguidos de 40 ciclos de: 94°C por 1 minuto para desnaturação, 52°C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 1 minuto para extensão. Após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 10 minutos foi realizada. O controle da reação para a detecção bacteriana foi o DNA extraído de cultura de *Leptospira* M-20 congelada com SBF. Esta cultura foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis (Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz, Bahia).

### 3.6.2.4 Eletroforese

A eletroforese seguiu os mesmos parâmetros citados no tópico 3.6.1.6. O fragmento esperado correspondeu a 274pb.

## 3.6.3 *Hantavírus*

### 3.6.3.1 *IgM e IgG ELISA*

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

disponíveis para sorologia, a fim de se aumentar a probabilidade de detecção, visto que este vírus, de acordo com a literatura, não circula no estado do Ceará.

A sorologia para hantavírus seguiu o protocolo descrito por Figueiredo *et al.* (2009). O protocolo utiliza a proteína recombinante N do hantavírus Araraquara, produzido em *Escherichia coli*, como antígeno para pesquisa dos anticorpos IgM e IgG específicos.

Resumidamente, as placas de microtitulação de poliestireno foram sensibilizadas com os antígenos (2 µg/mL) durante 18 horas em câmara úmida a 4 ° C. Todas as outras incubações foram realizadas a 37 ° C durante 1 hora e as placas foram lavadas 6 vezes com tampão de lavagem (solução salina tamponada com fosfato [PBS] - 0,1% de Tween 20) entre cada etapa. Todos os controles e as amostras foram diluídos de 1:100 em tampão de diluição (10 % de leite desnatado em pó em PBS-Tween 0,1%). Posteriormente a adição das amostras diluídas na placa, os anticorpos anti-IgM ou anti-IgG humano marcado com peroxidase foram adicionados e a ligação específica foi detectada pela adição do substrato. A leitura colorimétrica foi obtida usando-se um espectrofotômetro em 405nm. Para determinação do ponto de corte utilizou-se a média das absorbâncias dos soros negativos e mais 3 desvios-padrão. Foram consideradas positivas as amostras cujas absorbâncias foram maiores que o valor do ponto de corte.

### 3.6.3.2 Extração RNA

A extração de RNA foi a mesma descrita anteriormente no tópico 3.6.1.4.

### 3.6.3.3 RT-PCR

A identificação da infecção viral foi realizada através do Kit QIAGEN® OneStep RT-PCR (QIAGEN). Para amplificação do material genético foram utilizados dois pares de iniciadores: G1/HANGGn-C/ G1/HANGGn-S (FIGUEIREDO, 2009) e SAHN-S/ SAHN-C (FIGUEIREDO, 2009) (Tabela 1) que reconhecem a região responsável pela transcrição da glicoproteína Gn do envelope e produzem um fragmento de 324pb e 264pb, respectivamente. O volume final da reação consistiu em 25µl, sendo 6µl de RNA (1pg - 2µg), 5µl da solução tampão One-Step RT-PCR (Tris·Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT; pH 8.7), 1µl de dNTPs (10mM), 0,4µl de cada iniciador (20 pmol), 1µl do QIAGEN One-Step RT-PCR Enzyme Mix e água destilada para completar o volume final da reação. O perfil térmico da reação consistiu de 30 minutos a 50°C para a fase RT e 15 minutos a 95°C para a ativação da Taq Polimerase, seguidos de 35 ciclos de PCR: 95°C por 30 segundos para desnaturação,

54°C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 2 minutos para extensão. Após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 15 minutos foi realizada. O controle da reação utilizado para a detecção do genoma de hantavírus foram células Vero E6 infectadas com o vírus Mamoré gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP).

#### 3.6.3.4 Eletroforese

A eletroforese seguiu os mesmos parâmetros citados no tópico 3.6.1.6. O fragmento esperado utilizando os iniciadores G1/HANGGn-C/ G1/HANGGn-S correspondeu a 324pb e utilizando os iniciadores SAHN-S/ SAHN-C correspondeu a 264pb.

### 3.7 Análise estatística

Para analisar as variáveis não pareadas com distribuição normal foi utilizado o teste T não pareado, enquanto que para as variáveis com distribuição não paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram analisadas por meio de tabelas de contingência através do teste de Fisher. O valor de  $p < 0,05$  foi adotado para resultados estatisticamente significantes. Todos os testes foram realizados por meio do software GraphPad PRISMA 5.0.

### 3.8 Considerações éticas

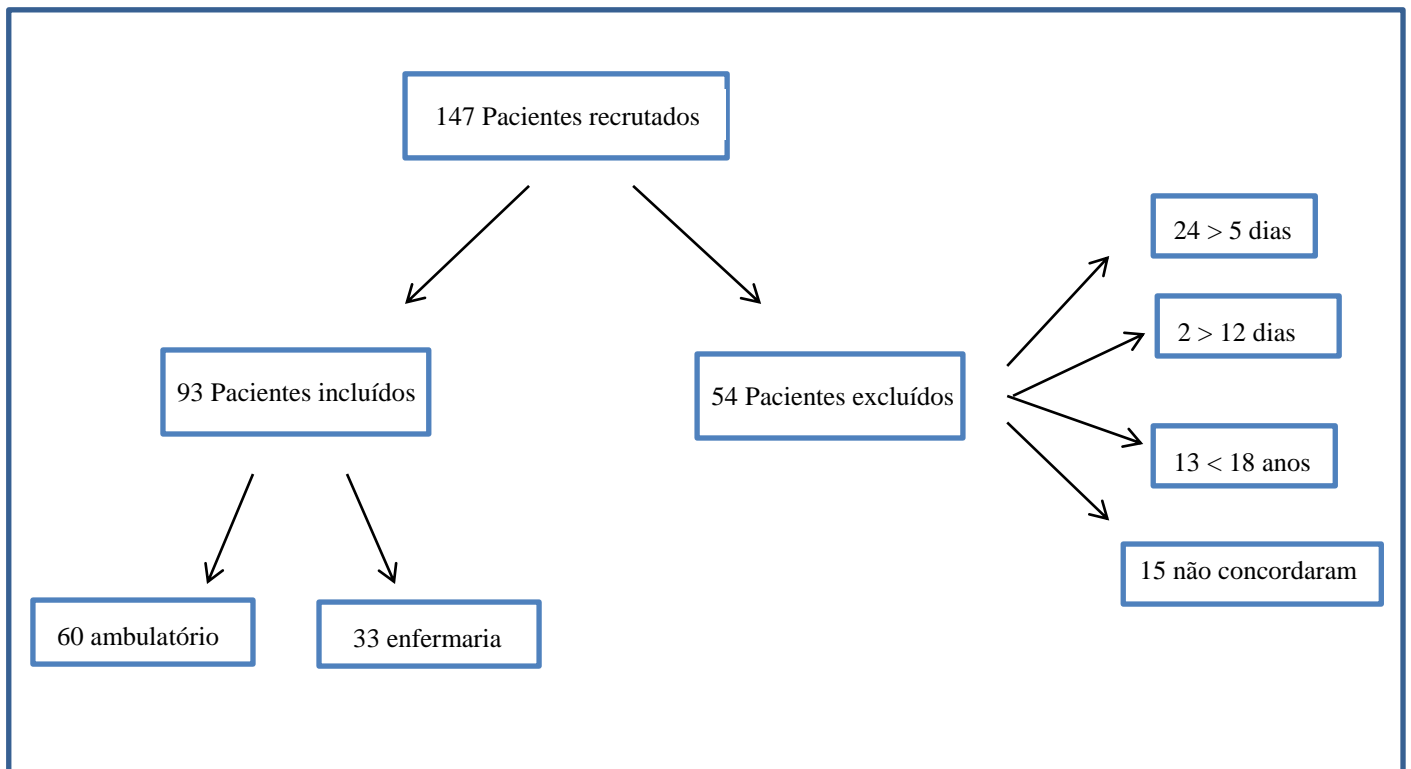
**Por se tratar de um estudo envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas para avaliação e parecer. Os pacientes foram informados adequadamente sobre os objetivos do trabalho e oferecido a participação voluntária. O estudo foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São José (nº do processo 064/2009) (ANEXO A e B).**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Total de pacientes

No período entre janeiro a setembro de 2012, 147 pacientes com síndrome febril foram recrutados para a participação no estudo. Entretanto, 54 pacientes foram excluídos do estudo, de acordo com os critérios de exclusão mencionados no item 3.2. Assim, 24 pacientes foram excluídos por serem de ambulatório e possuírem mais de 5 dias de sintomas, 2 pacientes por serem de enfermaria com mais de 12 dias de sintomas, 13 pacientes por serem menores de 18 anos e 15 pacientes por não concordarem em coletar sangue. Desta forma, apenas 95 pacientes foram incluídos na pesquisa, sendo 60 pacientes provenientes do ambulatório de emergência e 35 internados nas enfermarias do HSJ (Figura 20).

**Figura 20** - Fluxograma dos pacientes recrutados, excluídos e incluídos no estudo.



### 4.2 Dengue

#### 4.2.1 Diagnóstico

Dos 93 pacientes incluídos, 48 (51,6%) foram positivos para dengue por pelo menos um dos testes realizados (Tabela 2).

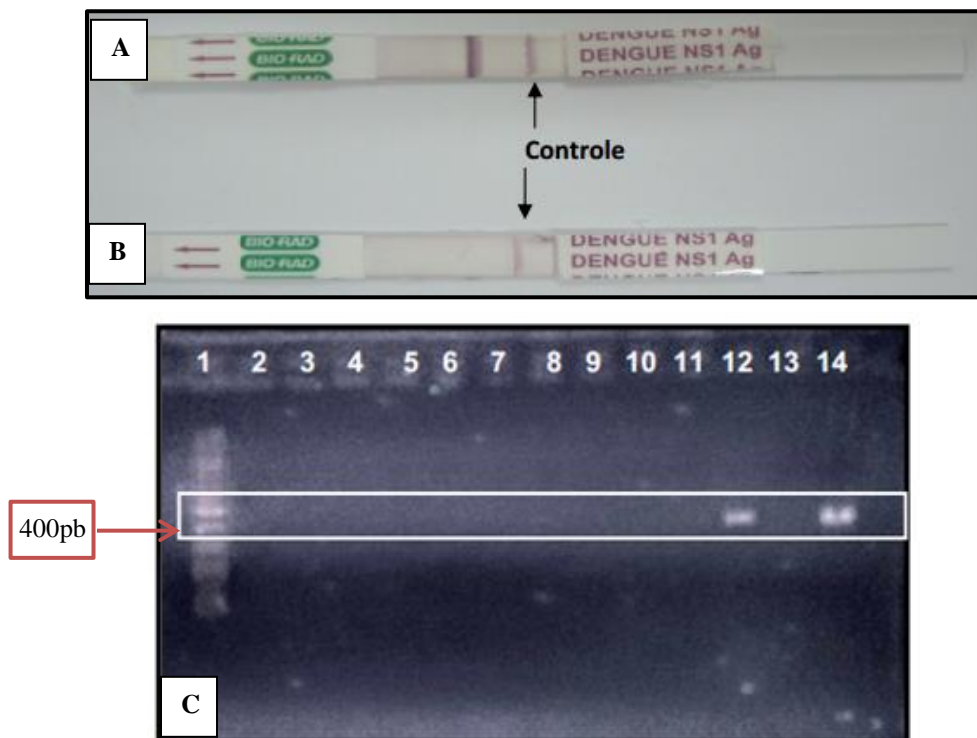
**Tabela 2-** Pacientes positivos para cada um dos testes para dengue

Técnicas empregadas para o diagnóstico de dengue	Número de pacientes positivos (N= 48)
Somente ELISA IgM	38
Somente NS1	5
Somente RT-PCR	1
ELISA + NS1	4

As amostras de 1ª coleta dos 93 pacientes foram testadas para dengue através do RT-PCR e do NS1, 1 (1,07%) paciente apresentou resultado positivo no diagnóstico molecular e 9 (9,7%) no imunocromatográfico (Figura 21).

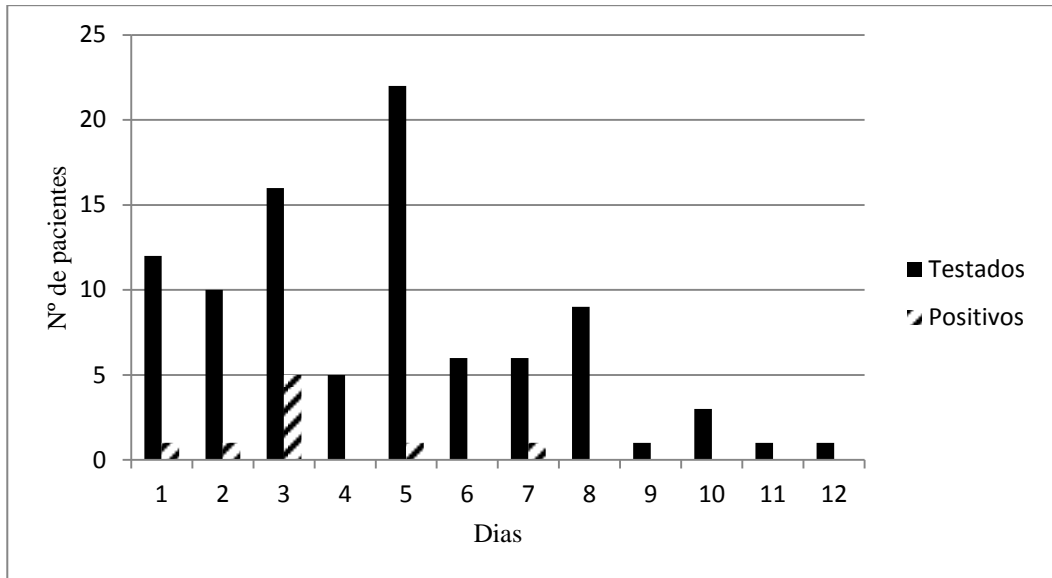
Dos 93 pacientes inclusos, 58 (62,4%) possuíam amostras de retorno de 2ª coleta para a realização da sorologia IgM para dengue. Assim, dos 58 pacientes testados, 42(72,4%) foram positivos por esta técnica.

**Figura 21 - A:** Imunocromatográfico de paciente positivo; **B:** Imunocromatográfico de paciente negativo; **C:** Eletroforese mostrando os produtos do RT-PCR para dengue. **Coluna 1:** Marcador de 100 pb; **Coluna 12:** paciente positivo; **Coluna 13:** controle negativo; **Coluna 14:** controle positivo (420 pb).



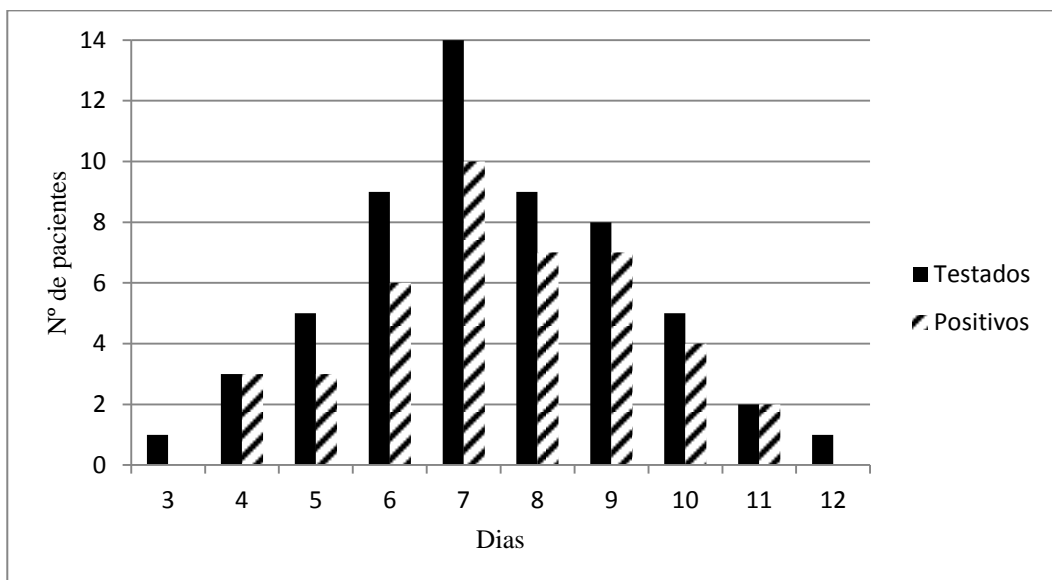
O imunocromatográfico NS1 conseguiu detectar infecção pelo DENV desde o 1º dia de sintomatologia até o 7º dia em um paciente internado (Gráfico 1).

**Gráfico 1** - Pacientes positivos pelo teste imunocromatográfico NS1 em comparação com o tempo decorrido do início dos sintomas.



O ELISA-IgM conseguiu detectar a doença a partir do 4º dia de sintomas até o 12º dia (Gráfico 2).

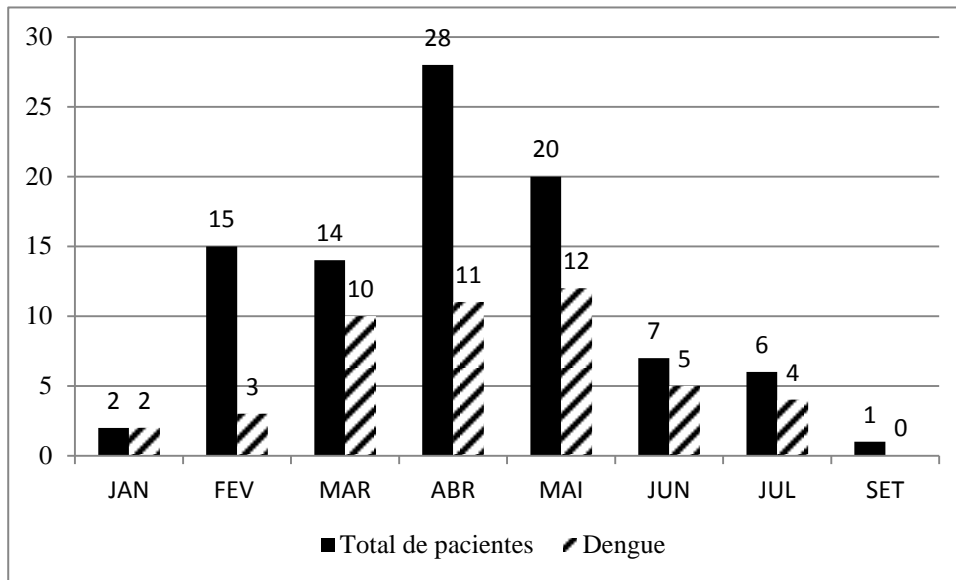
**Gráfico 2** - Pacientes positivos pelo ensaio de ELISA-IgM em comparação com o tempo decorrido do início dos sintomas.



#### 4.2.2 Características epidemiológicas

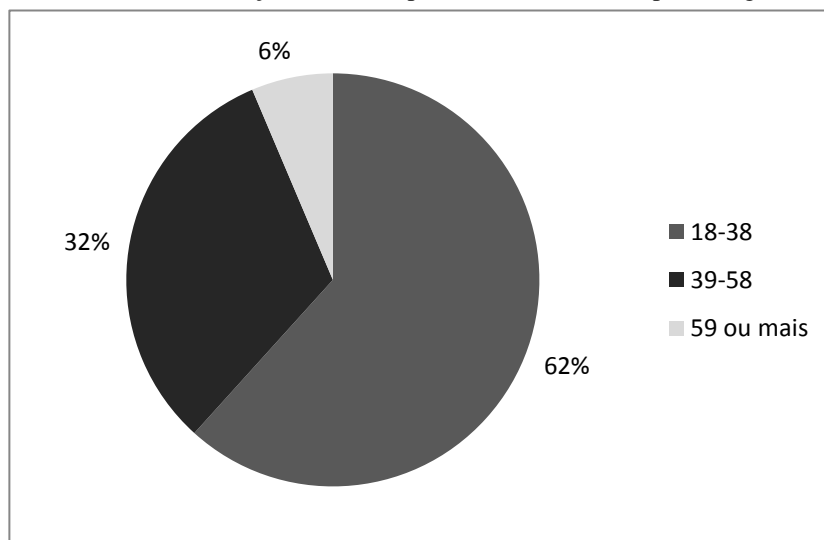
Foram detectados pacientes confirmados laboratorialmente para dengue em todos os meses em que foram realizadas as coletas, com exceção de setembro (Gráfico 3). Embora abril tenha sido o mês com maior número de casos suspeitos incluídos no trabalho, maio foi o mês com maior número de casos confirmados. Janeiro (2/2; 100%), março (10/14; 71,4%) e junho (5/7; 71,4%) foram os meses com o maior percentual de positivos para o diagnóstico de dengue.

**Gráfico 3** - Distribuição temporal dos casos incluídos e confirmados para dengue.



A faixa etária mais acometida entre os pacientes positivos para dengue foi a dos adultos mais jovens: 18-38 anos (Gráfico 4). Em relação ao gênero, 21 (43,8%) pertenciam ao sexo masculino, enquanto 26 (54,2%) eram do sexo feminino. Dos 45 pacientes positivos para dengue, 25 (52%) eram provenientes do ambulatório e 23 (48%) da enfermaria.

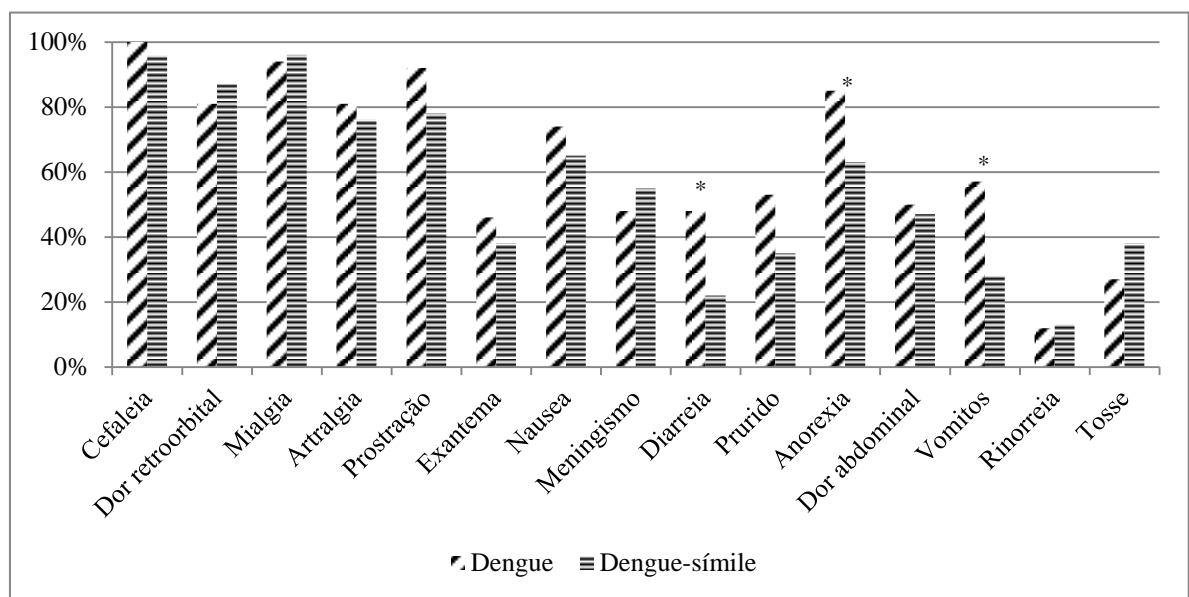
**Gráfico 4** - Distribuição etária dos pacientes confirmados para dengue.



#### 4.2.3 Características clínicas e laboratoriais

As características clínicas e laboratoriais inespecíficas, como o hemograma e os testes bioquímicos, foram comparadas entre os pacientes confirmados laboratorialmente para dengue e os pacientes negativos e, assim, classificados como dengue-símile. Em relação à sintomatologia, houve diferença estatística somente em relação à diarreia ( $p = 0,02$ ), à anorexia ( $p = 0,02$ ) e aos vômitos ( $p = 0,001$ ) entre os dois grupos, havendo predomínio destes sintomas nos pacientes positivos para dengue. Os sintomas mais relatados entre os pacientes com dengue foram: cefaleia (100%), mialgia (94%), prostração (92%), artralgia (81%), anorexia (85%) e dor retroorbital (81%) (Gráfico 5).

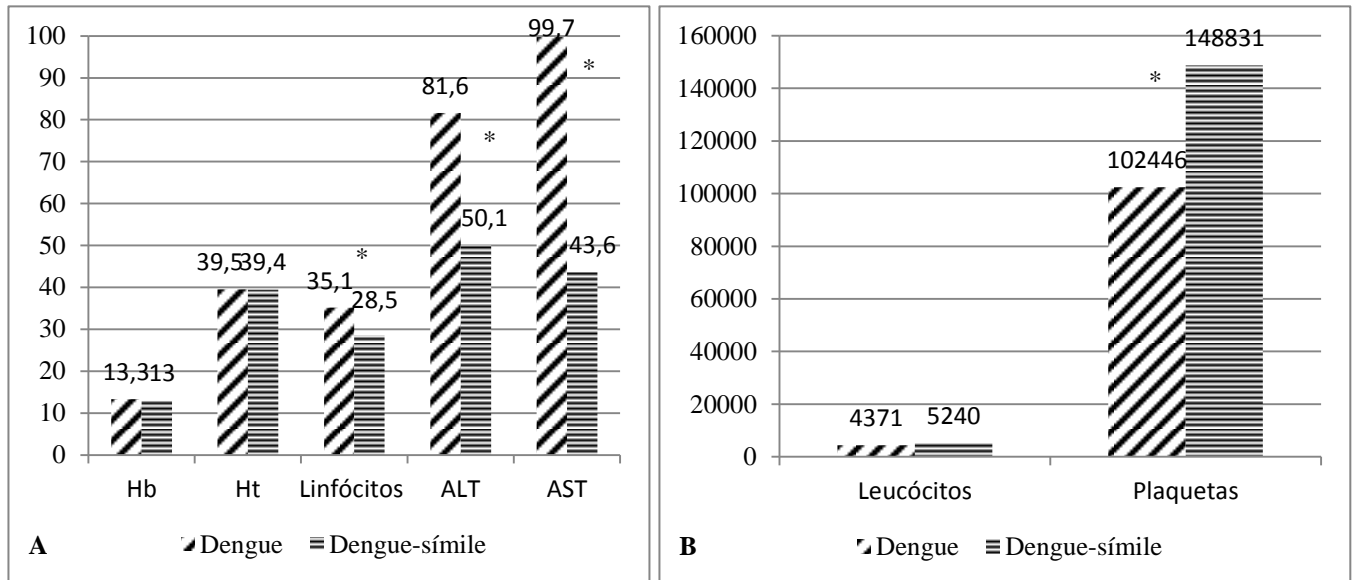
**Gráfico 5** - Comparação sintomatológica entre pacientes confirmados laboratorialmente para dengue e dengue-símile. (\*) estatisticamente significante



Em relação aos achados dos exames laboratoriais inespecíficos, foram comparados os seguintes parâmetros entre os dois grupos: hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos, linfócitos, plaquetas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). As médias destes parâmetros nos dois grupos estão representadas no gráfico 6. As plaquetas ( $p = 0,001$ ), os linfócitos ( $p = 0,04$ ), AST ( $p = 0,0006$ ) e ALT ( $p = 0,001$ ) apresentaram diferença estatística significativa entre o grupo dengue positivo e dengue negativo (dengue-símile), sendo a média dos linfócitos e das transferases mais elevadas no grupo dengue, enquanto as plaquetas estavam mais aumentadas no grupo dengue-símile.



**Gráfico 6** - Comparação dos achados laboratoriais inespecíficos entre os pacientes com dengue e dengue-símile. **A:** Hemoglobina, hematócrito, linfócitos, AST e ALT; **B:** Leucócitos e plaquetas. (\*) estatisticamente significante



As anormalidades encontradas nos exames laboratoriais inespecíficos dos pacientes positivos para dengue foram: 8 (16,6%) pacientes com queda da hemoglobina (<11,6g/dL), 10 (20,8%) com diminuição do hematócrito (<36%), 34 (69,7%) com plaquetopenia (<150.000/mm<sup>3</sup>), 6 (12,5%) com leucopenia (<3.600/mm<sup>3</sup>), 9 (18,7%) com linfopenia (<20%), 11 (22,4%) com linfocitose (>50%), 32 (66,6%) com elevação da AST (>37U/L) e 18 (36,7%) com elevação da ALT (>65U/L). Sete pacientes (14,3%) apresentaram uma diminuição da alanina aminotransferase (<30U/L).

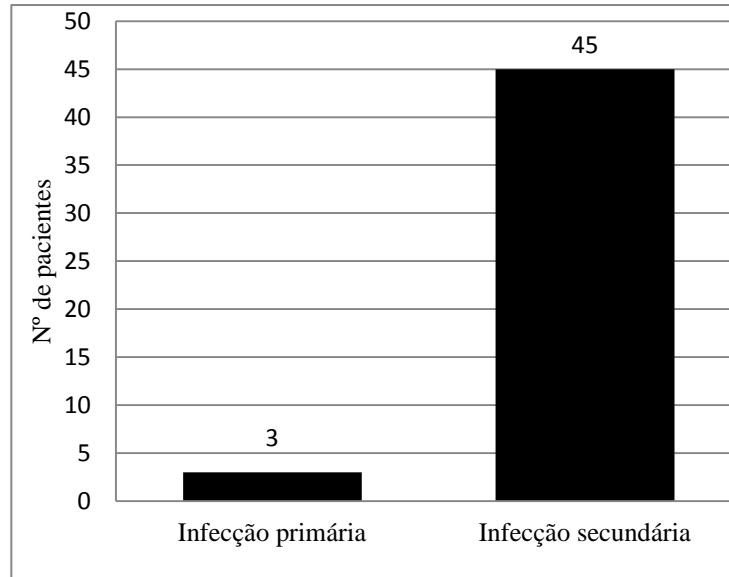
#### 4.2.4 Infecções secundárias

As amostras de 1<sup>a</sup> coleta dos 93 pacientes foram testadas quanto a infecção pregressa por dengue, através de sorologia IgG, sendo que 81 (87,1%) apresentaram positividade. No entanto, quando os pacientes positivos foram perguntados sobre infecções anteriores pelo DENV durante o questionário epidemiológico, apenas 21 (26%) mencionaram infecção pregressa por dengue.

Os 48 pacientes positivos para dengue foram classificados quanto a infecção primária ou secundária, sendo que 45 (94%) estavam num provável quadro de infecção secundária,

enquanto apenas 3 (6%) estavam apresentando uma possível infecção primária pelo DENV (Gráfico 7).

**Gráfico 7** - Pacientes apresentando uma possível infecção primária ou infecção secundária.



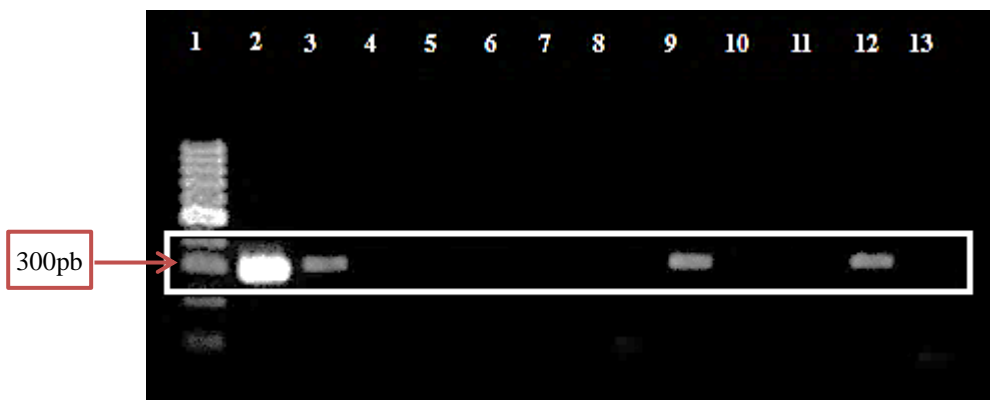
### 4.3 Leptospirose

#### 4.3.1 Diagnóstico

Após serem aplicados todos os testes diagnósticos para pesquisa de dengue, os pacientes negativos foram avaliados para detecção de leptospirose através da reação de PCR e da detecção de anticorpos anti-leptospira IgM.

As amostras de 1ª coleta dos 45 pacientes negativos para dengue foram utilizadas para a realização do PCR. Dos pacientes testados, 8 (17,7%) foram positivos (Figura 22).

**Figura 22** - Eletroforese mostrando os produtos do PCR para leptospirose. **Coluna 1:** Marcador de 100 pb; **Coluna 2:** controle positivo (274pb); **Coluna 3, 9 e 12:** pacientes positivos; **Coluna 13:** controle negativo.



As amostras de 2ª coleta foram utilizadas para a realização da sorologia, portanto apenas os pacientes que possuíam amostras de 2ª coleta e que foram negativos para dengue foram testados. Assim, apenas 15 pacientes foram avaliados para leptospirose através de ELISA-IgM e, dos pacientes testados, 5 (33,3%) foram positivos.

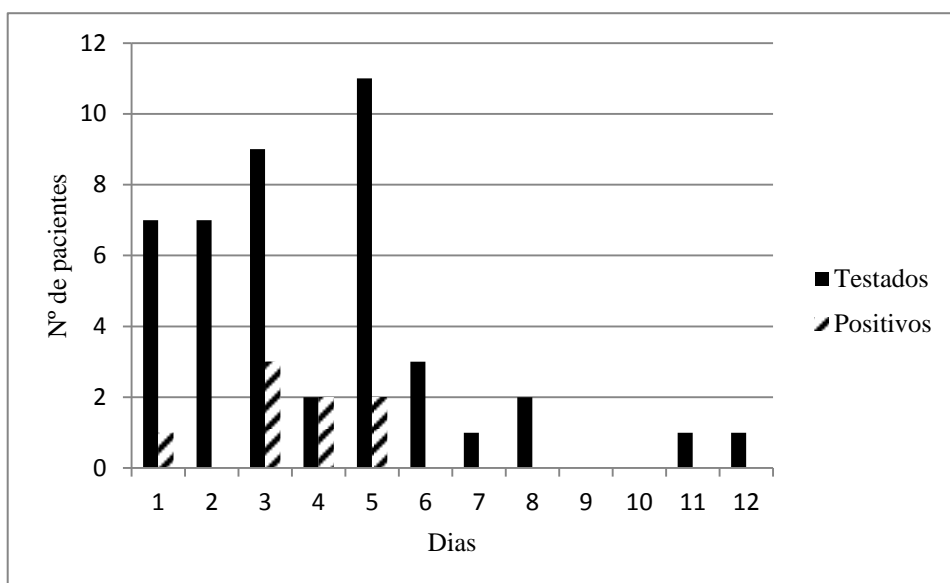
Desta forma, 13 (29%) pacientes foram positivos para leptospirose por pelo menos um dos testes realizados (Tabela 3).

**Tabela 3-** Pacientes positivos para cada um dos testes para leptospirose.

Técnicas empregadas para o diagnóstico de leptospirose	Número de pacientes positivos (N=13)
Somente ELISA	5
Somente PCR	8

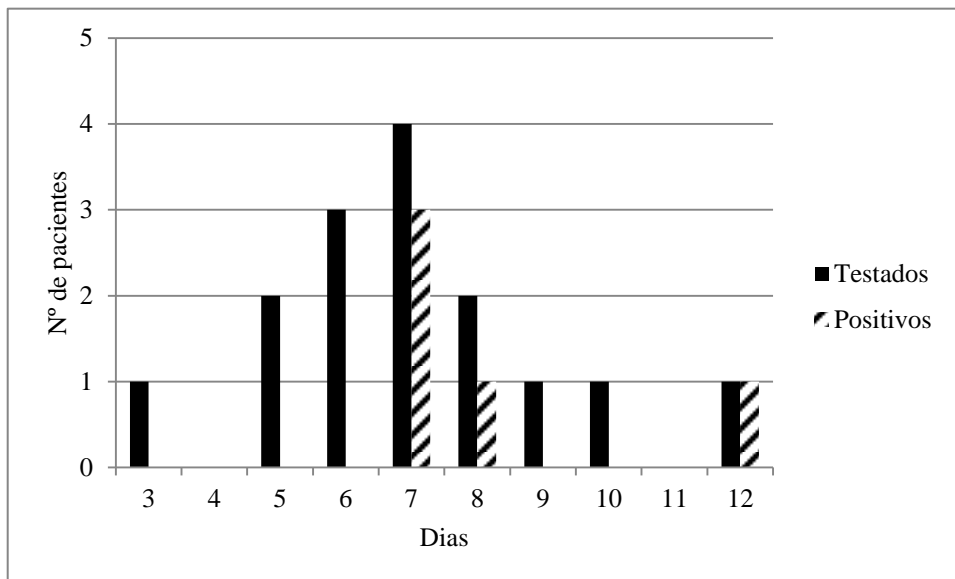
O PCR conseguiu detectar infecção pela *Leptospira sp.* desde o 1º dia de sintomatologia até o 5º dia nos pacientes com dengue-símile (Gráfico 8).

**Gráfico 8** - Pacientes positivos pelo PCR em comparação com o tempo decorrido do início dos sintomas.



A detecção do anticorpo anti-leptospira IgM através do ELISA conseguiu detectar a doença a partir do 4º dia de sintomas até o 15º dia (Gráfico 9).

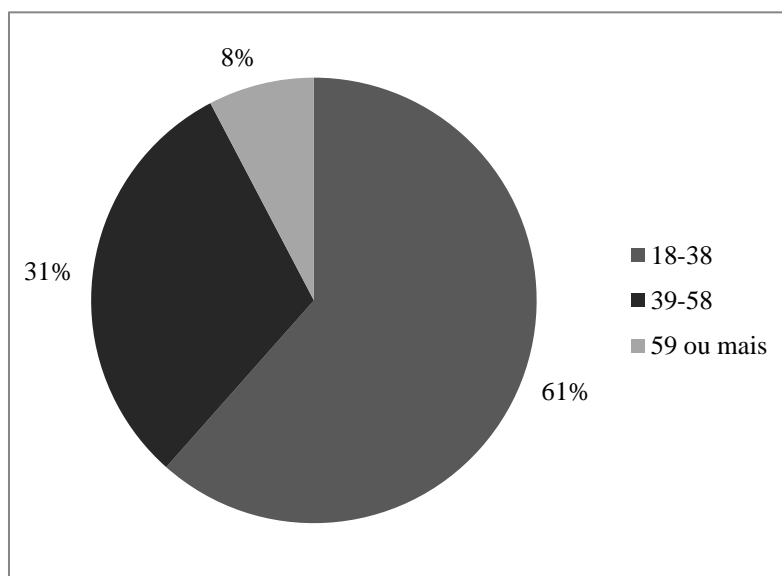
**Gráfico 9** - Pacientes positivos pelo ELISA em comparação com o tempo decorrido do início dos sintomas.

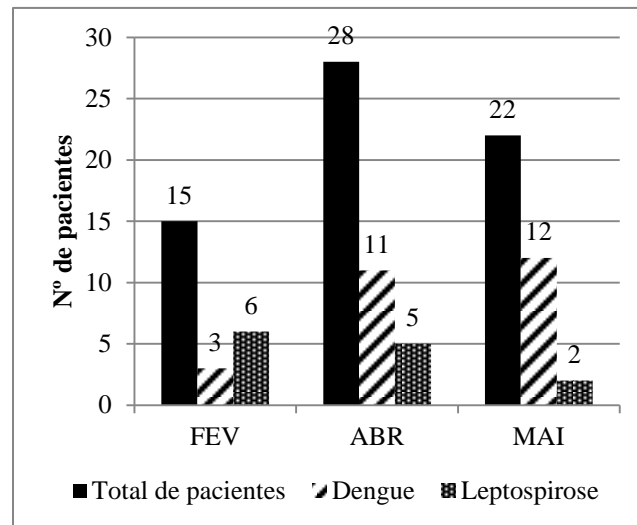


#### 4.3.2 Características epidemiológicas

De acordo com a distribuição dos gêneros, 7 (53,8%) pacientes eram do sexo feminino e 6 (46,2%) do sexo masculino. A faixa etária mais acometida entre os pacientes positivos para leptospirose foi a dos adultos mais jovens: 18-38 anos (Gráfico 10). As amostras positivas foram coletadas nos meses de fevereiro, abril e maio (Gráfico 11). Dez (77%) pacientes eram provenientes do ambulatório de emergência, enquanto 3 (23%) estavam internados nas enfermarias com quadros mais graves. Um paciente relatou contato prévio com ratos que habitavam as proximidades de sua residência e outro relatou contato com a água proveniente de enxurradas.

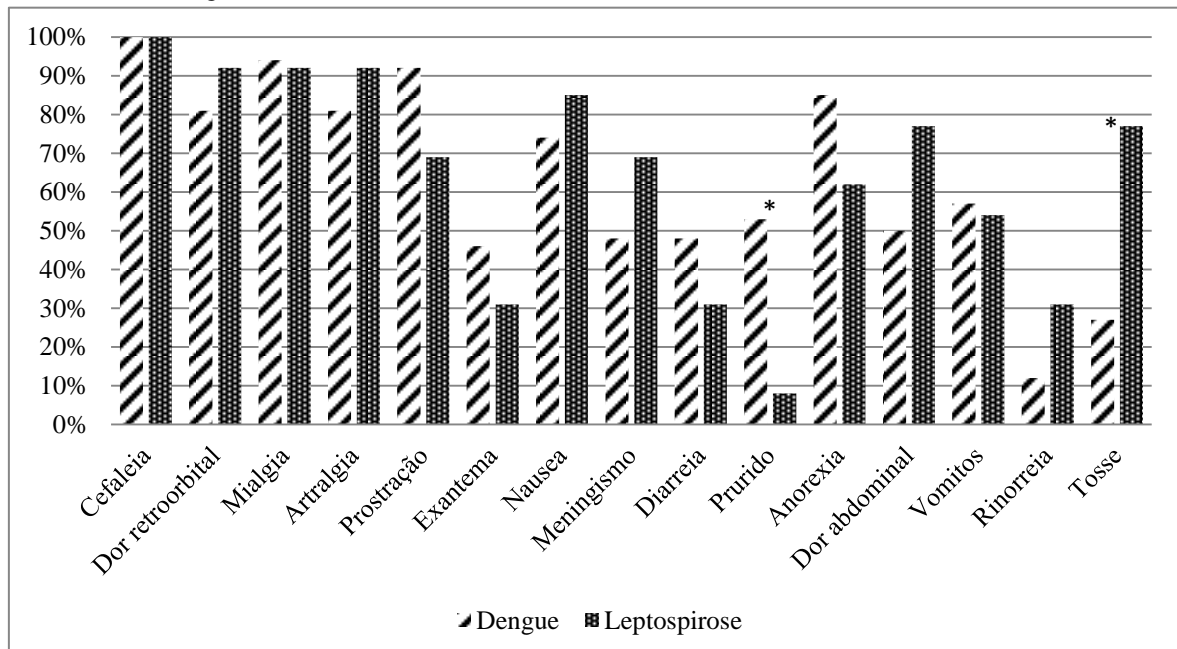
**Gráfico 10** - Distribuição etária dos pacientes positivos para leptospirose.



**Gráfico 11** - Gráfico de distribuição temporal dos pacientes incluídos, positivos para dengue e para leptospirose.

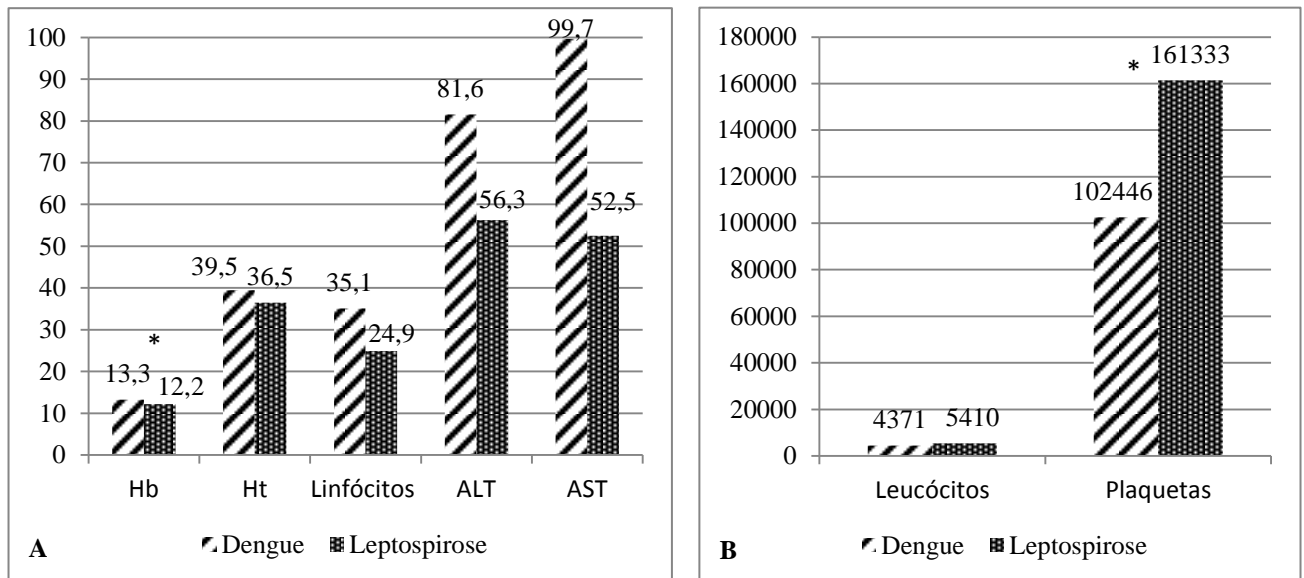
#### 4.3.3 Características clínicas e laboratoriais

As características clínicas e laboratoriais inespecíficas foram comparadas entre os pacientes confirmados para dengue e os pacientes confirmados para leptospirose. Em relação à sintomatologia, houve diferença estatística somente em relação ao prurido ( $p = 0,004$ ) e à tosse ( $p = 0,002$ ) entre os dois grupos, havendo predomínio do primeiro sintoma no grupo dengue; e do segundo no grupo dos pacientes positivos para leptospirose. Os sintomas mais relatados entre estes pacientes foram: cefaleia (100%), dor retroorbital (92%), mialgia (92%), artralgia (92%) e náusea (85%) (Gráfico 12). Alguns sintomas e sinais menos relatados, mas de grande importância entre estes pacientes foram: dispnéia (15%), icterícia (8%), ascite (8%) e queda da pressão arterial postural (8%).

**Gráfico 12** - Comparação sintomatológica entre pacientes positivos para dengue e leptospirose. (\*) estatisticamente significativa

Em relação aos achados dos exames laboratoriais inespecíficos, foram comparados os seguintes parâmetros entre os dois grupos: Hb, Ht, leucócitos, linfócitos, plaquetas, ALT e AST. Um dos pacientes com leptospirose não foi possível obter os resultados no banco de dados do HSJ. As médias destes parâmetros nos dois grupos estão representadas no gráfico 13. A hemoglobina ( $p = 0,04$ ) e as plaquetas ( $p = 0,006$ ) apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos dengue e leptospirose, havendo maiores níveis de Hb no grupo dengue; enquanto as plaquetas permaneceram mais elevadas nos pacientes positivos para leptospirose.

**Gráfico 13** - Comparação dos achados laboratoriais inespecíficos entre os pacientes com dengue e leptospirose. **A:** Hemoglobina, hematócrito, linfócitos, ALT e AST; **B:** Leucócitos e plaquetas.



As anormalidades encontradas nos exames laboratoriais inespecíficos dos pacientes com leptospirose foram: 5 (38,5%) pacientes com queda da hemoglobina ( $<11,6\text{g/dL}$ ) e do hematócrito ( $<36\%$ ), 4 (30,8%) pacientes com plaquetopenia ( $<150.000/\text{mm}^3$ ), 5 (38,5%) com leucopenia ( $<3.600/\text{mm}^3$ ), 5 (38,5%) com linfopenia ( $<20\%$ ), 6 (46,2%) com elevação da AST ( $>37\text{U/L}$ ) e 4 (30,8%) com elevação da ALT ( $>65\text{U/L}$ ). Sete pacientes (53,9%) apresentaram uma diminuição da alanina aminotransferase ( $<30\text{U/L}$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Exames laboratoriais inespecíficos dos pacientes com leptospirose. (\*) Resultados alterados.

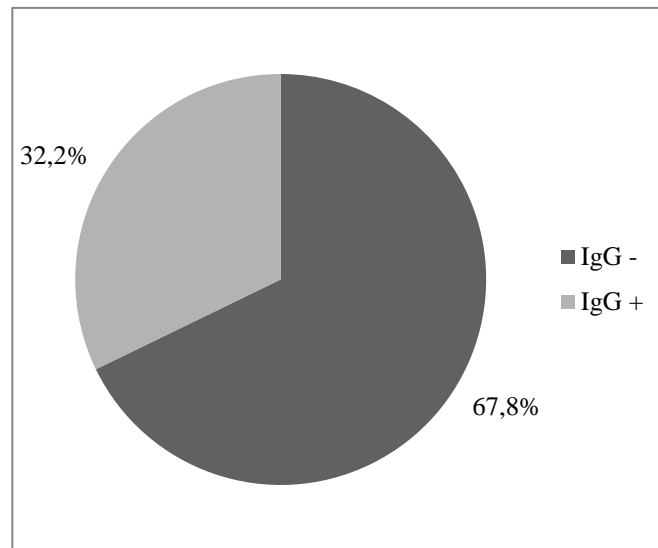
<b>Exames laboratoriais inespecíficos</b>	<b>Hb (11,6-17,8g/dL)</b>	<b>Ht (36-54%)</b>	<b>Plaquetas (150.000-450.000/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Leucócitos (3.600-11.000/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Linfócitos (20-50%)</b>	<b>AST (15-37U/L)</b>	<b>ALT (30-65U/L)</b>
<b>PFSE</b>	14,2	41,2	189.000	5.919	12,9*	23	10*
<b>ACS</b>	13,1	37,4	183.000	8.500	11*	75*	143*
<b>FEM</b>	13,8	39,8	157.000	3.380*	33,1	20	29*
<b>LMMM</b>	11,5*	32,8*	107.000*	2.640*	36,4	138*	126*
<b>MMCS</b>	10,5*	32,2*	179.000	3.570*	36,8	34	25*
<b>MVRN</b>	10,7*	31,5*	285.000	10.990	16,2*	17	17*
<b>FNO</b>	11,1*	32,7*	183.000	6.010	3,7*	16	16*
<b>FGGL</b>	13,1	39,3	97.000*	6.700	22,9	107*	89*
<b>MBSS</b>	12,6	40,2	38.000*	3.040*	28,6	46*	43
<b>LNCV</b>	12,1	36,4	221.000	6.870	10,8*	85*	140*
<b>FMS</b>	13,9	42,1	211.000	3.210*	39,3	22	18*
<b>DRFS</b>	10,3*	32,7*	86.000*	4.040	47,5	47*	19*

## 4.4 Hantavírus

### 4.4.1 Diagnóstico

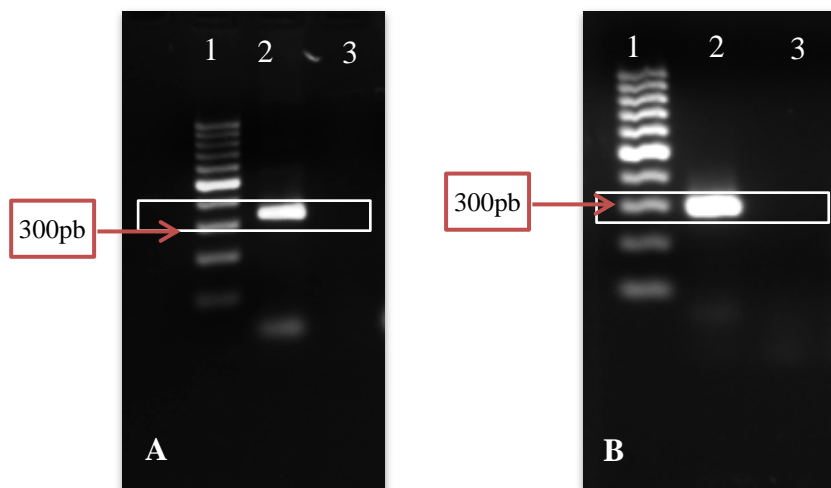
Os 93 pacientes incluídos neste trabalho foram testados para hantavírus através da sorologia IgM e IgG. Destes, apenas 1 (1,07%) paciente apresentou positividade para os anticorpos da classe IgM, com título de 1:400, mostrando uma infecção atual ou recente, enquanto 30 (32,2%) apresentaram positividade para os anticorpos da classe IgG, mostrando que mais de 30% da população estudada possivelmente entrou em contato com este vírus (Gráfico 14).

**Gráfico 14** – Sorologia IgG para hantavírus dos pacientes incluídos (n=93).



Apenas os pacientes negativos para dengue foram testados para hantavírus através de diagnóstico molecular. Assim, dos 46 pacientes testados, nenhum caso de hantavírus foi detectado (Figura 23).

**Figura 23** - Padronização do RT-PCR de hantavírus. **A:** G1/HANGGn-C/ G1/HANGGn-S. **Coluna 1:** Marcador de 100pb; **Coluna 2:** Controle positivo (324pb); **Coluna 3:** Controle negativo. **B:** SAHN-S/ SAHN-C. **Coluna 1:** Marcador de 100pb; **Coluna 2:** Controle positivo (264pb); **Coluna 3:** Controle negativo.





#### 4.4.2 Características epidemiológicas

Uma possível infecção aguda por hantavírus neste trabalho foi diagnosticada através do ELISA-IgM para hantavírus. Trata-se de um paciente do sexo feminino, 22 anos, natural de Fortaleza e residente do bairro Bom Jardim. A paciente procurou ajuda médica no ambulatório do HSJ no 5º dia de sintomatologia em abril de 2012. A paciente negou viagens pregressas. As principais características epidemiológicas desta paciente encontram-se na tabela 5.

Esta mesma paciente, anteriormente testada para dengue, apresentou também resultado positivo para dengue através do ELISA-IgM.

**Tabela 5** – Características epidemiológicas de paciente com sorologia positiva para hantavírus.

Paciente	Sexo	Idade	Bairro	Situação	Viagens	Atendimento	ELISA-IgM Dengue	ELISA-IgM Hantavírus
CMS	F	22	Bom Jardim	Ambulatório	Não	Abril/2012	Positivo	Positivo

#### 4.4.3 Características clínicas e laboratoriais

A paciente CMS relatou cefaleia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, prostração, exantema, náusea, vômitos, tosse, prurido, dor de garganta e anorexia. Além disso, relatou também manifestação hemorrágica com a presença de sangue nos vômitos.

Os dados laboratoriais inespecíficos da paciente encontram-se resumidos na tabela 6. Podemos observar que a mesma apresentou uma queda da hemoglobina (<11,6g/dL) e do hematócrito (<36%), plaquetopenia (<150.000/mm<sup>3</sup>), linfocitose (>50%) e uma elevação da AST (>37U/L).

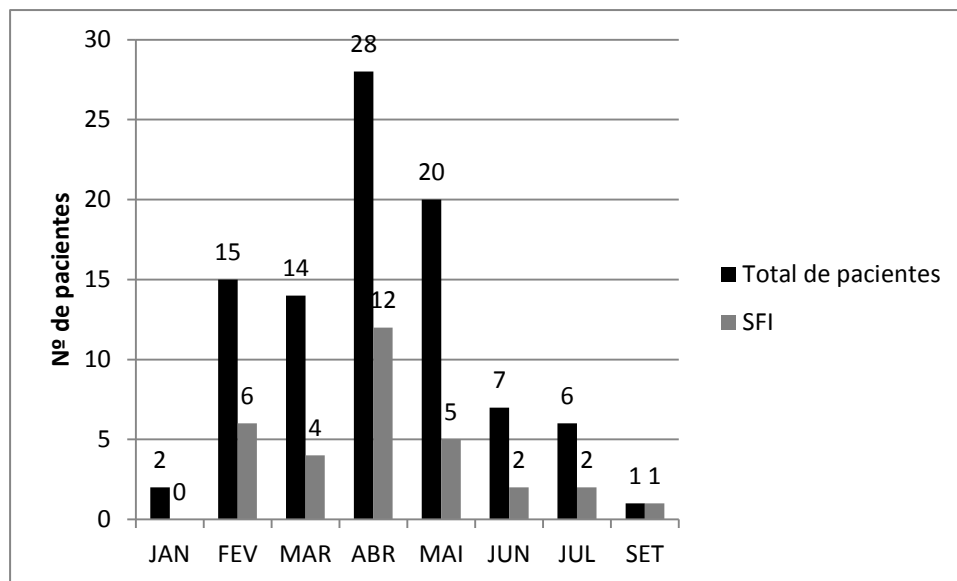
**Tabela 6** - Exames laboratoriais inespecíficos do paciente com sorologia positiva para hantavírus. (\*) Resultados alterados.

Exames laboratoriais inespecíficos	Hb (11,6-17,8g/dL)	Ht (36-54%)	Plaquetas (150.000-450.000/mm <sup>3</sup> )	Leucócitos (3.600-11.000/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (20-50%)	AST (15-37U/L)	ALT (30-65U/L)
CMS	11,2*	33,6*	77.000*	3.940	51,3*	42*	47

#### 4.5 Síndrome febril indiferenciada (SFI)

Ao final do estudo, 32 (34,7%) pacientes foram classificados como SFI por terem sido negativos nos testes realizados para dengue, leptospirose e hantavírus e assim, não terem sua etiologia revelada. Houve casos de SFI em quase todos os meses estudados, com exceção de janeiro (Gráfico 15).

**Gráfico 15** - Gráfico de distribuição temporal dos pacientes incluídos e com SFI.



## 5 DISCUSSÃO

O diagnóstico preciso da dengue é essencial para o tratamento correto dos pacientes, fornecendo medidas de controle específicas contra a evolução clínica da doença. A rigor, um caso suspeito de dengue só pode ser confirmado após diagnóstico laboratorial. Entretanto, devido a grande quantidade de casos suspeitos durante períodos epidêmicos, a confirmação pode ser realizada somente através dos critérios clínicos associados à epidemiologia (BRASIL, 2011a). Todavia, a utilização destes critérios como única base para o diagnóstico pode ser arriscada, uma vez que muitos sintomas inespecíficos da dengue se assemelham aos de outras doenças infecciosas, as quais requerem tratamento específico (CASTRO-JORGE *et al.*, 2010; BRASIL, 2011a). Desta forma, a confirmação laboratorial tem se tornado cada vez mais necessária para diferenciar a dengue de outras síndromes febris e também para o acompanhamento clínico dos pacientes que apresentam as formas mais graves da doença.

O diagnóstico molecular, baseado no RT-PCR e/ou no qRT-PCR tem substituído gradativamente o IV, tornando-se um forte candidato a ser considerado padrão-ouro para a detecção viral na fase aguda da doença (SHU; HUANG, 2004). Isso porque, além de demandar menos tempo que o IV, é mais sensível, pois é capaz de amplificar material genético até mesmo de vírus inativado. Além disso, alguns estudos têm mostrado que o RT-PCR pode permitir a detecção de dengue em amostras estocadas por longos períodos, mesmo naquelas com mais de 15 anos, quando estocadas adequadamente (LANCIOTTI *et al.*, 1992; POERSCH *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2008; DUTRA, 2009). Vários protocolos têm sido desenvolvidos, variando nas sequências-alvo, especificidades e sensibilidades dos mesmos (CHUA *et al.*, 2011; ROSEN *et al.*, 1999; JOHNSON; RUSSELL; LANCIOTTI, 2005).

Dentre as desvantagens e desafios desse método, é possível citar o curto período virêmico, a necessidade de estocagem das amostras em temperaturas extremamente baixas, devido a intrínseca termolabilidade do RNA viral, a necessidade de equipamentos de precisão e de profissionais bem-treinados, além do alto custo dos aparelhos e da sua complexidade (GUZMÁN; KOURI, 2004).

Apesar de ser um método de crescente aceitação e que tem mostrado bons resultados, o RT-PCR utilizado neste estudo foi positivo em 1 (1,07%) paciente, mostrando uma baixa sensibilidade na detecção dos casos, ao contrário dos estudos de Shu e Huang (2004) e Saxena *et al.* (2008), que afirmam que esta técnica seria uma possível substituta de melhor sensibilidade para o IV.

Um dos prováveis fatores determinantes foi a variabilidade genética a qual estes vírus estão expostos. Esta pode ter sido imposta a sequências de nucleotídeos da região do genoma viral que foi alvo do desenho dos iniciadores, realizado há mais de 10 anos (HENCHAL *et al.*, 1991). É válido ressaltar também que a sensibilidade do diagnóstico através do RT-PCR é variável não somente de acordo com o protocolo adotado, mas também devido a utilização de diversos outros reagentes, como por exemplo, iniciadores, enzimas, tampões, sequência-alvo do genoma e condições das reações (KAO *et al.*, 2005). Além disso, Raengsakulrach *et al.* (2002), descreveram uma baixa sensibilidade no protocolo de Henchal *et al.* (1991) para a detecção do DENV-4, sendo apenas 25% sensível. Desta forma, como no ano de 2012 o sorotipo circulante predominante isolado no Estado do Ceará foi o DENV-4, provavelmente o protocolo utilizado não foi capaz de detectar todos os casos (CEARÁ, 2014).

Outra importante ferramenta no diagnóstico da dengue é a detecção da glicoproteína NS1, pois essa proteína é bastante conservada e também abundante no soro de pacientes infectados logo durante o início da fase aguda da doença. Embora o diagnóstico através do uso desta técnica venha sendo amplamente utilizado para a detecção da infecção aguda por dengue (TEIXEIRA; BARRETO, 2009; WANG; SEKARAN, 2010), é uma técnica que ainda precisa ser aperfeiçoada, devido sua sensibilidade ser menor que o teste de ELISA (FRY *et al.*, 2011).

Neste estudo, apenas 9/93 (9,7%) pacientes foram positivos pelo teste imunocromatográfico NS1, discordando de Dussart *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2011), que apresentaram uma alta positividade para detecção de NS1 através deste teste.

Estudos realizados por Bessof *et al.* (2008) e Tricou *et al.* (2010) demonstraram que a eficiência do teste imunocromatográfico NS1 é variável em infecções secundárias, visto que os pacientes que apresentaram infecção secundária de dengue tiveram um resultado negativo para detecção desta proteína. Hang *et al.* (2009) sugerem que a negatividade pelo teste de NS1 em uma infecção secundária pode ser causada devido a ligação do anticorpo IgG com a proteína NS1, visto que durante a fase aguda em pacientes com infecção secundária, uma quantidade substancial da proteína NS1 pode ter se ligado aos anticorpos IgG específicos, produzidos a níveis elevados pela ativação das células B de memória da infecção anterior pelo DENV. Uma evidência de que esse fato ocorre é que a dissociação dos complexos Ag-anticorpos aumenta moderadamente a sensibilidade do teste, especialmente nas infecções secundárias (LAPPHRA *et al.*, 2008). Desta forma, como no ano de 2012 todos os sorotipos

havia circulado no Estado e visto que o Ceará é uma região endêmica para DENV, a população deste estudo tratava-se provavelmente de uma população que havia tido contato com o DENV, conseqüentemente, possíveis resultados falso-negativos poderiam ocorrer por esta técnica (CEARÁ, 2014).

Estudos também relataram diferença na sensibilidade do teste NS1 em relação ao sorotipo viral, sendo que o DENV-4 foi o que apresentou menor sensibilidade no teste (DENV-1, 93%, DENV-2, 82%, DENV-3, 87%, DENV-4, 71%) (BESSOF *et al.*, 2008; BESSOF *et al.*, 2010). Desta forma, como no ano de 2012 a epidemia no Ceará foi causada principalmente pelo DENV-4, a sensibilidade do teste para detecção destes casos foi inferior, justificando mais uma vez a baixa sensibilidade do teste neste trabalho (CEARÁ, 2014).

O teste imunocromatográfico NS1, neste estudo, conseguiu detectar casos até o 7º dia de sintomatologia, sendo que 88,9% dos casos detectados foram até o 5º dia, corroborando com os dados 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 1º e o 5º dia de sintomas. Porém, estudos anteriores demonstraram que o antígeno NS1 pode ser detectado até o 9º dia de doença (FALCONAR, 1997; SHU *et al.*, 2002; DUSSART *et al.*, 2006) e os picos de detecção foram do 6º ao 10º dia (XU *et al.*, 2006).

Dentre os testes sorológicos, o IgM-ELISA é o mais utilizado na rotina laboratorial. Este método 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 a realização do mesmo é a partir do 5º dia de sintomatologia da doença, período no qual a pessoa infectada pelo DENV passa a produzir anticorpos a níveis detectáveis (DE PAULA *et al.*, 2004; WHO, 2009; GUZMÁN *et al.*, 2010). Apesar de esta técnica ser a mais utilizada na rotina laboratorial para dengue, ela apresenta diversas desvantagens, como por exemplo, a baixa sensibilidade antes do 5º dia de sintoma, não diferencia o sorotipo e pode apresentar reações cruzadas geradas por certos epítomos, comuns a outras espécies do gênero *Flavivirus*, como a febre amarela. Porém, isso tem verdadeira importância somente em áreas onde 2 ou mais flavivírus co-circulam (GUBLER, 1998; PEELING *et al.*, 2010).

De todos os diagnósticos aplicados, o IgM-ELISA apresentou uma maior positividade, mostrando resultados satisfatórios ao detectar a presença de anticorpos específicos em 42/58

(72,4%). Entretanto, a positividade no IgM-ELISA em amostra única não diferencia uma infecção atual de uma infecção recente, visto que os anticorpos da classe IgM podem permanecer a níveis detectáveis durante até 3 meses no soro do paciente (HUNSPERGER *et al.*, 2009).

Os resultados do presente estudo corroboram com os achados de Velathanthiria *et al.* (2006), em um estudo realizado no Sri Lanka, que 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. Khan *et al.* (2009), durante um surto de dengue no Paquistão em 2006, compararam as técnicas de RT-PCR e IgM-ELISA. O teste molecular apresentou uma maior positividade quando confrontado com o teste sorológico, 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%). Khan *et al.* (2009), também enfatizaram que apesar do RT-PCR apresentar uma positividade maior, os testes sorológicos têm um papel importante no diagnóstico, pois são técnicas de baixo custo e facilmente disponíveis, principalmente nos países endêmicos. É válido ressaltar que as sensibilidades dos testes irão variar de acordo com o período no qual foi realizada a coleta do material biológico, visto que os testes virológicos apresentam melhor eficácia durante a fase virêmica e os testes sorológicos após o período de viremia (WHO, 2009; GUZMÁN *et al.*, 2010).

O IgM-ELISA neste estudo conseguiu detectar casos do 4º até o 12º dia de sintomatologia, com sensibilidade elevada em todos os dias pesquisados. Tontulawat *et al.*, (2011) detectaram casos positivos, através de IgM –ELISA, desde o 1º dia de sintomas até o 24º. Segundo alguns autores, o aumento da sensibilidade do teste é diretamente proporcional aos dias decorridos do início da doença (SHU; HUANG, 2004; TONTULAWAT *et al.*, 2011; SOLANKE *et al.*, 2013).

Os pacientes positivos para dengue apresentaram como a faixa etária mais acometida a dos adultos mais jovens (18-38 anos). Este resultado foi semelhante ao estudo realizado no Estado do Pará, onde os grupos mais vulneráveis foram na faixa etária com maior atividade produtiva (ARAÚJO *et al.*, 2002). Cavalcanti *et al.* (2011), relataram mudança no padrão de idade dos pacientes atingidos por dengue no Ceará, mostrando que desde 2007, a população mais atingida passou a ser crianças, provavelmente pelo fato da população mais velha já ter entrado em contato com os sorotipos circulantes e adquirido imunidade. Outro estudo também

relatou 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). Entretanto, é válido ressaltar que neste estudo foram estabelecidos critérios de inclusão e de exclusão, desta forma, só foram inclusos nesta pesquisa pacientes acima de 18 anos. Portanto, mesmo que esteja ocorrendo uma mudança na população atingida pelo DENV, este fato não foi observado no presente estudo, visto que estes indivíduos não foram recrutados. De qualquer forma, a população mais jovem inserida no estudo foi a mais atingida.

Neste estudo, foram pesquisados os casos suspeitos de dengue apenas de janeiro a setembro de 2012, não podendo caracterizar em qual semestre do ano teve maior incidência da doença, visto que o 2º semestre não foi totalmente analisado. Porém, de acordo com a SESA, a dengue apesar de estar presente no Ceará durante todo o ano, ocorre com mais intensidade durante o 1º semestre do ano (CEARÁ, 2014).

Os meses com maior número de casos confirmados para dengue neste estudo foram março, abril e maio, não corroborando com os achados de Vasconcelos *et al.* (1995), em um estudo realizado no Ceará, em 1994, que evidenciaram a presença da doença no 1º semestre, mas com o maior número de casos em junho. Magalhães (2011), em um estudo que avaliou a relação entre os elementos atmosféricos e a dengue em Fortaleza, entre os anos de 2001 a 2009, observou que quando ocorre o aumento das precipitações pluviométricas, percebe-se o aumento da infestação do mosquito transmissor e a maior concentração dos casos de dengue. Magalhães (2011) ainda relatou que esta elevação dos casos na quadra chuvosa pode ser verificado até 2 meses após os meses com maiores índices pluviométricos. As chuvas não só aumentam a quantidade de criadouros para o desenvolvimento das formas imaturas do vetor, como também geram condições para o desenvolvimento das formas adultas (REBÊLO *et al.*, 1999; SANDOVAL *et al.*, 2003; GLASSER; GOMES, 2002). No ano de 2012, no Ceará, os meses com maiores índices pluviométricos foram fevereiro e março (FUNCEME, 2014), assim, de acordo com Magalhães (2011), podia-se encontrar um pico da dengue até o mês de maio, como foi visto no presente estudo.

As manifestações mais comuns na prática clínica nos pacientes com dengue são febre acompanhada pelos seguintes sintomas: calafrios, dor retroorbital, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos e dor abdominal (GUZMAN; KOURI, 2002). Os sintomas mais relatados entre os pacientes com dengue neste estudo foram: cefaleia (100%), mialgia (94%), prostração (92%), artralgia (81%), anorexia (85%) e dor retroorbital (81%), corroborando com os achados de

Khan *et al.* (2008), que encontraram como as principais queixas dos pacientes com dengue: febre (100%), mialgia (81%), prostração (83%), cefaleia (75%) e anorexia (63%).

Em relação à sintomatologia, houve diferença estatística somente em relação à diarreia ( $p = 0,02$ ), à anorexia ( $p = 0,02$ ) e aos vômitos ( $p = 0,001$ ) entre os grupos dengue e dengue-símile, havendo predomínio destes sintomas nos pacientes positivos para dengue. Em dois estudos que incluíram apenas crianças, a frequência de anorexia foi maior entre os pacientes com dengue do que nos pacientes com as demais síndromes febris estudadas (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997; PHUONG *et al.*, 2004). Os achados deste estudo não corroboram com os de Ahmed *et al.* (2008), onde não houve diferença estatística entre os grupos confirmados e não confirmados para dengue quanto à diarreia ou aos vômitos, apresentado diferença significativa apenas para cefaleia e mialgia, sintomas que predominaram nos pacientes confirmados para dengue.

Nos pacientes com dengue são comuns alterações no hemograma, como hemoconcentração, leucopenia, plaquetopenia e alterações de homeostasia sanguínea com presença frequente de manifestações hemorrágicas. Algumas dessas alterações estão relacionadas com a gravidade da doença e indicam a necessidade de intervenção terapêutica com finalidade de reduzir a mortalidade (WHO, 2009).

No presente estudo, os achados laboratoriais inespecíficos mais encontrados nos pacientes confirmados para dengue corroboram com os achados de Oliveira *et al.* (2009) e Ayyub *et al.* (2006) que revelaram a plaquetopenia como principal exame laboratorial alterado. Contrariamente, estes resultados diferem dos encontrados no Pará, em 2008, no qual a presença de plaquetopenia (24,3%) foi bastante reduzida (BARROS *et al.*, 2008).

A ocorrência de leucocitose na dengue pode ser considerada como um fator prognóstico associado ao desenvolvimento de complicações, contudo, nenhum dos pacientes do presente estudo apresentou esta alteração (Ayyub *et al.*, 2006).

Quando os achados dos exames laboratoriais inespecíficos foram comparados entre o grupo confirmado para dengue e o grupo dengue-símile, apenas as plaquetas ( $p = 0,001$ ), os linfócitos ( $p = 0,04$ ), AST ( $p = 0,0006$ ) e ALT ( $p = 0,001$ ) apresentaram diferença estatística significativa, sendo a média dos linfócitos e das transferases mais elevadas no grupo dengue, enquanto as plaquetas estavam mais aumentadas no grupo dengue-símile. Diferenças nas características laboratoriais entre dengue e outras doenças febris tem sido relatadas na



literatura (POTTS; ROTHMAN, 2008). No presente estudo, a média dos linfócitos nos pacientes com dengue foi maior do que nos demais pacientes, não corroborando com estudos anteriores que mostraram que os pacientes com dengue geralmente apresentavam níveis mais baixos de linfócitos do que as demais síndromes febris (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997; DEPARIS *et al.*, 1998; PHUONG *et al.*, 2004; WILDER-SMITH *et al.*, 2004; HAMMOND *et al.*, 2005; KARANDE *et al.*, 2005; CHADWICK *et al.*, 2006; LOW *et al.*, 2006). Os níveis mais elevados das transaminases hepáticas foram encontrados em pacientes com dengue neste estudo e também em outros trabalhos quando comparado com outras síndromes febris (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997; WILDER-SMITH *et al.*, 2004; CHADWICK *et al.*, 2006).

Para a avaliação de possíveis infecções pregressas pelo DENV, foi realizado, neste estudo, o IgG-ELISA para detecção de anticorpos específicos da classe IgG nas amostras de 1ª coleta dos pacientes. Dos 93 pacientes testados, 81 (87,1%) apresentaram positividade, no entanto, quando perguntados, durante questionário epidemiológico, sobre infecções anteriores pelo DENV, apenas 21 mencionaram ter tido diagnóstico de dengue, apesar da maioria não referir a realização de diagnóstico laboratorial específico para confirmação da doença pregressa. Os demais pacientes provavelmente apresentaram quadros clínicos assintomáticos ou leves durante quadro de dengue pregressa e, desta forma, não procuraram atendimento médico, não diagnosticando a doença. Vasconcelos *et al.* (1998) mostraram em um inquérito sorológico realizado no Ceará, em 1994, que 41% das infecções pelo DENV foram assintomáticas.

Os 48 pacientes com sorologia IgM positiva para dengue foram classificados quanto a infecção primária ou secundária, sendo que 45 (94%) estavam num quadro de infecção secundária, enquanto apenas 3 (6%) estavam apresentando uma infecção primária pelo DENV. A grande quantidade de pacientes com IgG positivo revela a situação endêmica encontrada no Estado do Ceará, mostrando que as epidemias ocorrem anualmente e uma parte significativa da população entrou em contato com o vírus. Esses dados corroboram com um estudo realizado em 1994, no Estado do Ceará, que de 588 soros IgM reagentes, 495 (84,2%) pacientes apresentavam infecção secundária pelo DENV (VASCONCELOS *et al.*, 1998). Além disso, a confirmação da quantidade exorbitante de pacientes com infecção secundária por DENV pode justificar a baixa sensibilidade no teste NS1, visto este ter uma baixa sensibilidade em pacientes com infecções secundárias, como descrito anteriormente (HANG *et al.*, 2009).

A dengue apresenta uma série de sintomas inespecíficos, bem como alterações laboratoriais comuns a uma série de patologias, incluindo a leptospirose (BRASIL, 2011a). A leptospirose apresenta quadro clínico inespecífico, tornando difícil distingui-la de outras doenças febris, especialmente aquelas que também se manifestam com sintomas inespecíficos como dor de cabeça e mialgia tais como dengue, influenza e outras doenças febris (BAJANI *et al.*, 2003). Por isto, em vários países em desenvolvimento, a leptospirose é a causa mais comum de síndrome febril indiferenciada, podendo ser responsável por 20 a 40% dessas infecções (KO *et al.*, 1999).

Neste estudo, 13 pacientes com suspeita clínica de dengue foram positivos para leptospirose. Diversos trabalhos têm evidenciado confusão diagnóstica entre dengue e leptospirose e, dentre eles, alguns, realizados em áreas endêmicas para ambos, indicam a leptospirose como etiologia de síndrome febril indiferenciada em pacientes com sintomatologia de dengue, mas com diagnóstico laboratorial específico negativo (SANDERS *et al.*, 1999; BROWN *et al.*, 2010; BRUCE *et al.*, 2005).

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 (5%) apresentaram positividade para leptospirose. Souza, Nogueira e Pereira (2007), identificaram 34 (15,9%) casos de leptospirose em 215 pacientes com suspeita clínica de dengue em um estudo realizado em Mato Grosso do Sul. Bruce *et al.* (2005), estudando 730 casos com suspeita de dengue em Porto Rico, encontraram leptospirose como etiologia de 36 (5%) casos. Outro estudo de diagnóstico diferencial, realizado no Havaí, identificou 54 (4,5%) casos de leptospirose em 1206 pacientes dengue-símile (ELLIS *et al.*, 2008). Da mesma maneira, casos de dengue têm sido detectados em pacientes com suspeita de leptospirose. Levett, Branch e Edwards (2000), em estudo realizado em Barbados, detectaram 38/92 (41%) casos de dengue entre os casos suspeitos de leptospirose, mas sem confirmação laboratorial. Em estudo de casos de óbitos realizados no Ceará, de 6 casos suspeitos de leptospirose, 2 foram positivos para dengue (ARAÚJO, 2011). O presente estudo corrobora com os dados dos autores acima, mostrando a ocorrência de confusões diagnósticas entre os pacientes com dengue-símile.

O diagnóstico preciso e precoce é imprescindível para a conduta clínica da leptospirose, uma vez que o tratamento apropriado dos pacientes acometidos por dengue e leptospirose difere substancialmente, e também para que se tomem medidas de vigilância e

controle epidemiológicos. No caso da leptospirose, por exemplo, a antibiótico-terapia confere melhor resultado, tanto na gravidade, quanto na duração da doença, quando administrada precocemente no curso da infecção (ELLIS *et al.*, 2008).

O diagnóstico clínico da leptospirose baseia-se no quadro clínico e epidemiológico, sendo confirmado por técnicas laboratoriais específicas. Existem diferentes testes utilizados 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 MAT, IgM-ELISA e PCR (DAHER; ABREU; JÚNIOR, 2010; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Neste estudo foram aplicadas as técnicas de PCR e IgM-ELISA.

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 requer laboratórios bem equipados (PEREZ; GOARANT, 2010; VILLUMSEN *et al.*, 2010; THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011). O DNA de leptospira pode ser amplificado a partir de diferentes amostras, como: sangue, urina, líquido, humor aquoso e tecido (LEVETT, 2001). Além disso, foi demonstrado que tanto o PCR convencional quanto o qPCR são úteis para o diagnóstico precoce da doença, durante o qual a produção de anticorpos ainda é baixa para ser detectado nos testes sorológicos. A sensibilidade da detecção do DNA pelo PCR diminui com o curso da doença (FONSECA *et al.*, 2006b; SLACK *et al.*, 2007).

Dos 45 pacientes dengue-símile avaliados por PCR para leptospirose neste estudo, 8 (17,7%) foram positivos, detectando casos do 1º ao 5º dia de sintomatologia. Em outro estudo, realizado em 70 pacientes com suspeita clínica de leptospirose durante a 1ª semana de sintomatologia clínica, o PCR detectou 24 (34,3%) casos (HONARMAND; KHORAMIZADEH; ESHRAGHI, 2010).

A maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada por sorologia e os anticorpos IgM são detectados no sangue cerca de 5 a 7 dias após o início dos sintomas (LEVETT, 2001). Estudos que realizaram a comparação entre o MAT e ELISA demonstraram que a detecção de anticorpos pelo ELISA tem se tornado cada vez mais eficaz, detectando casos antes mesmo do MAT (LEVETT; BRANCH, 2002; BAJANI *et al.*, 2003).

Dos 15 pacientes avaliados para leptospirose por IgM-ELISA, 5 (33,3%) foram positivos, detectando casos do 7º ao 12º dia de doença. Bajani *et al.* (2003), relataram que,

quando utilizado na fase aguda, o ELISA tem sua sensibilidade reduzida, sendo esta de 95% durante a fase de convalescência e de 52,7% na fase inicial da infecção, demonstrando que este teste apresenta uma maior eficácia a partir do 6º e 7º dia de sintoma. Além disso, os anticorpos IgM anti-*Leptospira* podem permanecer circulantes durante anos após a exposição inicial, dificultando a diferenciação entre infecções atuais e recentes (MCBRIDE *et al.*, 2005).

Neste estudo, os pacientes foram positivos para leptospirose ou por PCR ou por ELISA IgM. Este dado enfatiza o fato de que os anticorpos, na leptospirose, só começam a ser detectáveis no fim da leptospiremia, como descrito na literatura (KO; GOARANT; PICCARDEAU, 2009).

A faixa etária mais acometida entre os pacientes positivos para leptospirose foi de 18-38 anos. Nossos achados corroboram com os descritos pela SESA, na qual a faixa etária mais atingida é a de 20 a 49 anos, correspondendo a faixa etária economicamente mais ativa e que, conseqüentemente, se expõe mais aos riscos de contaminação com a bactéria (CEARÁ, 2011).

Em relação a distribuição mensal dos pacientes positivos para leptospirose, os mesmos encontraram-se distribuídos entre os meses de fevereiro e maio, corroborando com os dados da SESA que revela o período de fevereiro a junho como 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.

Os principais sintomas dos pacientes positivos para leptospirose neste estudo foram cefaleia (100%), dor retroorbital (92%), mialgia (92%), artralgia (92%) e náusea (85%), corroborando com os achados de Daher *et al.* (2010b), em um estudo retrospectivo no Ceará, no qual demonstraram que os principais sinais e sintomas dos pacientes com leptospirose foram febre (96,5%), cefaleia (74,6%), mialgia (92,5%), icterícia (94,5%), vômitos (71,6%) e desidratação (63,5%). Em estudos realizados em outros países, a febre, mialgia e cefaleia são os sintomas mais relatados entre os pacientes com leptospirose (ELLIS *et al.*, 2008; BRUCE *et al.*, 2005).

Alguns sinais e sintomas menos relatados, mas de grande importância clínica entre os pacientes com leptospirose deste estudo foram: dispneia (15%), icterícia (8%), ascite (8%) e queda da pressão arterial postural (8%). O paciente que apresentou icterícia pode estar relacionado a um quadro mais grave da doença, sugerindo uma possível evolução do quadro

da paciente para a síndrome de Weil, quadro caracterizado pelo acometimento renal (BRASIL, 2011b).

Neste estudo, os principais sinais e sintomas entre os pacientes positivos para dengue foram febre (100%), cefaleia (100%), mialgia (94%), prostração (92%), artralgia (81%), anorexia (85%) e dor retroorbital (81%). Observa-se que estes mesmos sintomas foram também relatados pelos pacientes positivos para leptospirose, demonstrando a similaridade de sintomas. O presente estudo corrobora com os achados de Brown *et al.* (2010) que também observaram a paridade de sintomas entre pacientes positivos para dengue e leptospirose.

Ainda em relação aos sintomas dos pacientes, houve diferença estatística entre os pacientes com dengue e leptospirose apenas em relação ao prurido ( $p = 0,004$ ) e à tosse ( $p = 0,002$ ), havendo predomínio do primeiro sintoma no grupo dengue; e do segundo no grupo dos pacientes positivos para leptospirose. Em estudo comparando a sintomatologia entre pacientes com dengue e leptospirose, os pacientes com dengue apresentaram mais diarreia, enquanto os com leptospirose apresentaram mais garganta inflamada ( $p < 0,05$ ; CONROY *et al.*, 2014).

Estudos relatam que as anormalidades laboratoriais mais frequentes em pacientes com leptospirose são plaquetopenia, leucocitose, elevação das transaminases e queda no hematócrito e na hemoglobina (DAHER *et al.*, 2010b). Com exceção da leucocitose, essas anormalidades também foram observadas neste estudo. Além destas, 5 pacientes apresentaram leucopenia ( $< 4,000/\text{mm}^3$ ), característica esta muito comum nos pacientes com dengue, dificultando ainda mais o diagnóstico clínico na rotina médica (MEHTA *et al.*, 2013).

A hemoglobina ( $p = 0,04$ ) e as plaquetas ( $p = 0,006$ ) apresentaram diferença estatística significativa quando comparados os grupos dengue e leptospirose, havendo maiores níveis de Hb no grupo dengue; enquanto as plaquetas permaneceram mais elevadas nos pacientes positivos para leptospirose. Em estudo comparando os achados laboratoriais entre pacientes com dengue e leptospirose, os pacientes com leptospirose apresentaram níveis mais elevados de leucócitos, hematócrito e plaquetas ( $p < 0,05$ ; CONROY *et al.*, 2014).

Além da leptospirose, a dengue faz diagnóstico diferencial com várias outras patologias, de acordo com a situação epidemiológica da região a ser analisada (BRASIL, 2011a). No Ceará, pouco se sabe sobre a real situação do hantavírus no Estado, dessa forma

esta etiologia, que apresenta grande semelhança clínica com a dengue e leptospirose, foi investigada no presente estudo.

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

O diagnóstico da infecção por hantavírus baseia-se nas informações clínica e epidemiológica e nos testes laboratoriais. No entanto, é quase impossível no caso de um indivíduo com sintomas leve a moderado diagnosticar infecção por hantavírus apenas com os dados clínicos. O diagnóstico laboratorial da infecção aguda por hantavírus é baseado primeiramente na sorologia, pois a viremia no humano é muito curta, embora o vírus ainda consiga ser detectável por RT-PCR durante a fase aguda da doença (ZHENQIANG BI; FORMENTY; ROTH, 2008). Neste estudo utilizamos o ELISA-IgM e 2 protocolos diferentes de RT-PCR para detecção dos possíveis casos de hantavirose.

No presente estudo foi detectado 1/93 (1,07%) caso de hantavirose entre os pacientes com dengue-símile, através do IgM-ELISA. Este pequeno resultado pode estar relacionado ao pequeno número amostral testado, visto ser uma doença nunca notificada no Estado, com exceção de pequenos casos relatados na literatura recentemente (LIMA *et al.*, 2011). Silva e Evangelista (2010), em um estudo realizado no Distrito Federal/Brasília, pesquisaram casos de hantavírus em 122 pacientes com suspeita clínica de dengue, porém nenhum caso foi encontrado.

A presença dos anticorpos IgM surge precocemente na hantavirose, juntamente com o início dos sintomas, e mantem-se detectável por 60 a 90 dias, sendo sua detecção relacionada a infecção recente ou atual pelo vírus (FIGUEIREDO, 2004). O soro do paciente com positividade no teste de ELISA-IgM apresentou título de 1:400. Esse dado corrobora com um trabalho de Campos *et al.* (2003), cujo títulos máximo de anticorpos encontrado foi de 1:400.

Assim como no presente estudo, pesquisa realizada na Indonésia por Suharti *et al.* (2009) demonstraram que 58/118 dos pacientes suspeitos de dengue foram confirmados

sorologicamente, enquanto nos outros 60/118 pacientes, foi encontrada evidência sorológica de outra infecção recente como: hantavírus (5/60), vírus da rubéola (3/60) e leptospira (2/60). Outro estudo, realizado no Ceará em 2008, com pacientes com suspeita clínica de dengue, evidenciou 1/72 (1,4%) caso de hantavírus através de IgM-ELISA (LIMA *et al.*, 2011). Dessa forma, enfatiza-se o fato de que com base apenas em critérios clínicos não é fácil diagnosticar a dengue, sendo necessária a realização de testes laboratoriais específicos para diferenciá-la de outras doenças febris.

Quanto à técnica de RT-PCR, utilizada para identificação de RNA viral em casos suspeitos, verificou-se que os 46 pacientes avaliados, para ambos os iniciadores testados, foram negativos para amplificação do genoma do vírus. Sendo importante observar que diferenças significativas entre os vírus isolados de cada região ou país, comprometem a sensibilidade da técnica e dificultam seu uso rotineiro no diagnóstico das hantaviroses (TERAJIMA *et al.*, 1999).

Os anticorpos da classe IgG persistem por toda a vida do indivíduo e podem ser utilizados em inquéritos sorológicos, visando diagnosticar infecções passadas sintomáticas ou assintomáticas (FERREIRA, 2003). Desta forma, em busca de mais informações sobre a hantavirose no Estado, foi realizada a sorologia IgG em todos os 93 pacientes inclusos neste trabalho, encontrando positividade em 30 pacientes. A presença de anticorpos IgG contra hantavírus no soro de 30/93 (32,2%) dos pacientes sugere que eles foram recentemente ou previamente infectados por hantavírus, entretanto, esse resultado não permite determinar se o hantavírus foi o agente causador da síndrome febril apresentada por esses pacientes. Nossos dados corroboram com os achados de LIMA *et al.* (2011), em estudo com pacientes dengue-símile no Ceará em 2008, que encontraram 2/72 (2,8%) pacientes positivos na sorologia IgG para hantavírus.

Todos os pacientes que participaram deste estudo foram interrogados quanto a realização de viagens recentes e nenhum alegou ter saído do Ceará nos últimos meses. É válido ressaltar que para um Estado que possui apenas um registro na literatura para este patógeno em humanos a porcentagem de pessoas com contato prévio com o mesmo foi muito alta (32,2%), mostrando a necessidade de maiores investimentos e pesquisas a respeito desta doença no Ceará (LIMA *et al.*, 2011). Esses dados complementam e corroboram com os dados de Chioratto *et al.* (2010), que encontraram anticorpos contra o vírus em roedores

reservatórios na Serra de Ibiapaba/Ceará em 2005, sugerindo que a população humana estava em risco de contrair a doença desde então.

O paciente IgM positivo para hantavírus, descrito neste estudo por suas iniciais CMS, tratava-se de um paciente do sexo feminino, 22 anos, natural de Fortaleza e residente do bairro Bom Jardim. A paciente procurou ajuda médica no ambulatório do HSJ no 5º dia de sintomatologia em abril de 2012, com posterior melhora do quadro clínico. Estes dados corroboram com os achados de LIMA *et al.* (2011), onde o único paciente IgM positivo para hantavírus encontrado também apresentou recuperação clínica.

Infecções por hantavírus são caracterizadas por início súbito, com sintomas semelhantes aos da gripe, tais como febre, cefaleia, dor abdominal, náusea, vômitos e diarreia (KRAUTKRAMER; ZEIER; PLYUSNIN, 2012; BRASIL, 2009).

A paciente CMS relatou cefaleia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, prostração, exantema, náusea, vômitos, tosse, prurido, dor de garganta e anorexia. Além disso, relatou também manifestação hemorrágica com a presença de sangue nos vômitos. Esses dados corroboram com os achados iniciais da hantavirose que podem progredir para a cura ou para sintomas mais graves, dependendo da variante do hantavírus em questão e da resposta imunológica do indivíduo (MCCAUGHEY; HART, 2000; VAPALAHTI, LUNDKVIST, VAHERI, 2001).

Os achados laboratoriais mais comuns durante as fases iniciais dos pacientes acometidos pela hantavirose são plaquetopenia, hemoconcentração, elevação nos níveis séricos de ALT e AST e leucocitose (KRAUTKRAMER; ZEIER; PLYUSNIN, 2012; BRASIL, 2009).

As anormalidades laboratoriais encontradas na paciente CMS deste estudo foram: queda da hemoglobina (<11,6g/dL) e do hematócrito (<36%), plaquetopenia (<150.000/mm<sup>3</sup>), linfocitose (>50%) e uma elevação da AST (>37U/L). Figueiredo, Campos e Rodrigues (2001), em um estudo realizado em Ribeirão Preto em pacientes com diagnóstico confirmado de hantavírus, relataram a presença de plaquetopenia, hemoconcentração e leucocitose na fase inicial da doença nestes pacientes, sendo que no presente estudo apenas a plaquetopenia, dentre estes, pôde ser evidenciada.



O presente estudo sustenta ainda a hipótese de que casos moderados ou atípicos de hantavirose devem estar ocorrendo no Estado e que o hantavírus que circula no Ceará pode ser o Anatajuba ou o Rio Mearim, os quais foram associados a infecções humanas leves no Estado vizinho, Maranhão (ROSA *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2010).

A ocorrência de duas ou mais infecções simultâneas não é rara, e a apresentação clínica destes quadros pode ser bastante desafiadora, da mesma forma que as possibilidades terapêuticas e a evolução do paciente co-infectado podem ser bastante complexas, conforme relatado em diversos trabalhos (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2003). A paciente CMS apresentou resultado positivo para dengue e hantavírus através do ELISA-IgM, tratando-se talvez de uma possível co-infecção ou infecções sequenciais, visto que ambos os diagnósticos foram positivos somente pela sorologia e estes anticorpos podem permanecer circulantes por um período prolongado. Entretanto, mesmo não realizando outras técnicas de diagnóstico, Santos *et al.* (2010) consideraram como uma co-infecção de hantavirose e dengue um paciente que possuiu positividade nos testes de ELISA e imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti-hantavírus e anti-dengue, respectivamente.

Trinta e dois pacientes permaneceram sem nenhum diagnóstico etiológico específico e, portanto, foram classificados como pacientes com 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, leptospirose ou hantavirose e que não foram estudados neste trabalho, ou até mesmo pelos agentes aqui estudados, mas que não conseguiram ser detectados pelas metodologias adotadas. Trabalhos têm mostrado confusão diagnóstica da dengue com outras patologias, como rubéola, hepatites, influenza A e melioidose os quais podem estar sendo responsáveis por parte das síndromes febris e que aqui não foram diagnosticadas (LISTA, 2010; SOUZA; NOGUEIRA; PEREIRA, 2007; MACEDO *et al.*, 2012).

Neste estudo, observamos testes laboratoriais positivos para leptospirose e hantavirose em pacientes com suspeita de dengue, demonstrando desta forma a necessidade do uso de técnicas laboratoriais específicas para diagnosticar precocemente estas infecções, permitindo que o paciente seja conduzido de forma correta e impedindo que o mesmo evolua para formas mais graves.

Outras síndromes dengue-símiles podem estar circulando no Ceará, porém por ainda não terem sido estudadas, pensa-se não serem prevalentes no Estado e, assim, podem estar

sendo confundidas com a dengue. Mais investigações de vigilância de síndromes febris precisam ser realizadas para se conhecer as reais prevalências dessas patologias e seu impacto na população cearense.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados no presente estudo podemos concluir que:

- Dentre os testes diagnósticos para detecção de dengue, o IgM-ELISA apresentou uma maior positividade quando comparado ao RT-PCR e ao imunocromatográfico NS1;
- A maior parte da população estudada (87,4%) entrou em contato anteriormente com o DENV;
- Dentre a população inserida no estudo, a dengue, no Ceará, está atingindo a faixa etária mais jovem, causando sintomatologia inespecífica nos pacientes;
- Dentre os meses inseridos no estudo, a dengue, no Ceará, está ocorrendo durante os meses com maiores índices pluviométricos;
- Em períodos epidêmicos, a dengue está sendo confundida com outras patologias, como leptospirose e hantavirose, quando a mesma é confirmada apenas por critérios clínico-epidemiológicos;
- Dentre os testes diagnósticos para detecção de leptospirose, o PCR apresentou uma maior positividade quando comparado ao IgM-ELISA;
- Os pacientes com leptospirose apresentam sintomatologia e achados laboratoriais inespecíficos muito semelhantes aos pacientes com dengue;
- A sorologia positiva para hantavírus demonstra que é possível que quadro leve ou moderado dessa patologia ocorra no Estado;
- A hantavirose é uma doença que pode estar ocorrendo no Ceará, visto que 32,2% da população estudada entrou em contato com o vírus;
- Outras síndromes febris podem estar circulando no Ceará, visto que 34,7% dos pacientes permaneceram sem diagnóstico revelado.

## REFERÊNCIAS

- ABELA-RIDDER, B.; SIKKEMA, R.; HARTSKEERL, R.A. Estimating the burden of human leptospirosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. S5-S7, 2010.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. de laPeña. Leptospira and Leptospirose. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-296, 2010.
- AGUIAR, D.B. *et al.* Primeiro registro de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em Roraima, Brasil. **Acta Amazônica**, v.38, p.357-360, 2008.
- AHMED, S. *et al.* Dengue Fever Outbreak: A Clinical Management Experience. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v.18, p.8-12, 2008.
- ALCON, F. *et al.* 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**, v.40, p. 376–381, 2002.
- ALEXANDER, N. *et al.* Multicentre Prospective Study on Dengue Classification in Four South-East Asian and Three Latin American Countries. **Tropical Medicine and International Health**, v.16, p.936-948, 2011.
- ALMEIDA, A.P. *et al.* Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the autonomous region of Madeira, Portugal. **Eurosurveillance**, v.12, 2007.
- ANDRADE, S.M.O. *et al.* A New Approach to Reducing Mortality from Dengue. **Open Journal of Clinical Diagnostics**, v.4, p.12-16, 2014.
- ARAÚJO, F.M.C. **Vigilância virológica e sorológica de dengue no estado do Ceará nos anos de 2002 e 2003**. 2006. 140p. Dissertação (Mestrado em Patologia). Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, 2006.
- ARAÚJO, F.M.C. *et al.* Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods**, v.177, p.128–31. 2011.
- ARAÚJO, F.M.C. **Diagnóstico laboratorial para o vírus dengue em líquido cefalorraquidiano: a detecção do antígeno NS1 como uma nova abordagem**. 2011. 151p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Ceará, 2011.
- ARAÚJO, F.M. *et al.* Dengue in Patients with Central Nervous System Manifestations, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, 2012.
- ARAÚJO, J.M. *et al.* A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 155, p.34–38, 2009.
- ARAÚJO, T.P. *et al.* Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos do Estado do Pará, Brasil, 1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p.579-584, 2002.

- ARUNACHALAM, N. *et al.* Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. **Indian Journal Medical Research**, v.127, p. 395-397, 2008.
- AVIRUTNAN, P. *et al.* Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1078–1088, 2006.
- AYYUB, M. *et al.* Characteristics of dengue fever in a large public hospital, Jeddah, Saudi Arabia. **Journal Ayub Medical College**, v. 18, p. 9-13, 2006.
- BAJANI, M.D. *et al.* Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 803- 809, 2003.
- BALESTRA, R.A. *et al.* Ocorrência de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em área urbana do Estado do Tocantins. **Neotropical Entomology**, v.37, p.233-235, 2008.
- BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 53-72, 2008.
- BARROS, L.P.S. *et al.* Análise crítica dos achados hematológicos e sorológicos de pacientes com suspeita de dengue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p.363-366, 2008.
- BENSCHOP, J. *et al.* Sero-prevalence of leptospirosis in workers at a New Zealand slaughterhouse. **New Zealand Medical Journal**, v.122(1307), p.3947, 2009.
- BENTE, D.A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 3, p. 97–103, 2006.
- BESSOFF, K. *et al.* 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**, v.15, p.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**, v.17, p.949–953, 2010.
- BHARTI, A.R. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Disease**, v.3, p.757–771, 2003.
- BOUNLU, K. *et al.* Acute jaundice in Vientiane, Lao People’s Democratic Republic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 717-721, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: **Casos e óbitos de hantavirose no Brasil de 1993 a 2009**. Brasília, DF. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1558](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1558). Acesso em: 09 nov.2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ª ed. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. rev. – Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico– Adulto e Criança** – 4. ed. – Brasília, DF, 2011a.

BRASIL. Ministério da saúde. **Guia Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico**. 7. ed.- Brasília, DF, 2011b.

BRENNER, D.J. *et al.* Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genome species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.839–858, 1999.

BROWN, M.G. *et al.* Leptospirosis in suspected cases of dengue in Jamaica, 2002- 2007. **Tropical Doctor**, v.40, p. 92-94, 2010.

BRUCE, M.G. *et al.* Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. **Acta Tropica**, v.96, p. 36- 46, 2005.

CAMPOS, G.M. *et al.* Serological survey of hantavirus in Jardimópolis county, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.71, p.417-422, 2003.

CASTRO, J.R. *et al.* 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**, v. 44, p. 217-222, 2011.

CASTRO-JORGE, L.A.; *et al.* Clinical Evaluation of the NS1 Antigen-Capture ELISA for Early Diagnosis of Dengue Virus Infection in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1400–1405, 2010.

CAVALCANTI, L.P. *et al.* Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p.355-358, 2010.

CAVALCANTI, L.P. *et al.* Change in age pattern of persons with dengue, Northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p.132-134, 2011.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. Informe Epidemiológico de Leptospirose, 2011.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado. **Boletim Eletrônico Epidemiológico de Dengue**. Disponível em: <http://salasituacao.saude.ce.gov.br/index.php/menu-principal/dengue>. Acessado em: 10 mar. 2014.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL. Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in triathlons – Wisconsin and Illinois, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.47, p.585–588, 1998.

CERQUEIRA, T.B. *et al.* Renal involvement in leptospirosis – new insights into pathophysiology and treatment. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.248-252, 2008.

- CHADWICK, D. *et al.* Distinguishing dengue fever from other infections on the basis of simple clinical and laboratory features: application of logistic regression analysis. **Journal of Clinical Virology**, v.35, p.147–153, 2006.
- CHALAYON, P. *et al.* Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p.289-297, 2011.
- CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649–688, 1990.
- CHATURVEDI, U.C.; DHAWAN, R.; MUKERJEE, R. Immunosuppression and cytotoxicity of dengue infection in the mouse model. In: **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Wallingford, UK: CAB International, p.291–311, 1997.
- CHEN, H.X.; LUO, Z.Z.; ZHANG, J.J. Hantavirus Vaccine Efficacy Evaluation Working Group. Large scale field evaluation on vaccines of hemorrhagic fever with renal syndrome in China. **Chinese Journal of Epidemiology**, v.23, p.145-147, 2002.
- CHEN, T.Z. Development and situation of, and techniques for production of leptospirosis vaccine in China. **Japanese Journal of Bacteriology**, v. 40, p. 755–762, 1985.
- CHIEN, L. J. *et al.* Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1295–1304, 2006.
- CHILDS, J.E. *et al.* Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. **Journal of Infectious Disease**, v.169, p.1271-1280, 1994.
- CHIORATTO, G.T.S. *et al.* Soroprevalência da infecção por hantavírus em roedores do estado do Ceará, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.39, p.1-6, 2010.
- CHUA, K.B. *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**, v.33, p.13-20, 2011.
- CICERONI, L. *et al.* Human leptospirosis in Italy, 1986-1993. **European Journal of Epidemiology**, v. 11,p. 707-710, 1995.
- CICERONI, L. *et al.* Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. **European Journal of Epidemiology**, v. 16, p.79-86, 2000.
- COBRA, C. *et al.* Symptoms of dengue fever in relation to host immunologic response and virus serotype, Puerto Rico, 1990–1991. **American Journal of Epidemiology**, v.142, p. 1204-1211, 1995.
- CONROY, A.L. *et al.* Host biomarkers distinguish dengue from leptospirosis in Colombia: a case–control study. **Infectious Diseases**, p. 14:35, 2014.
- COSTA, M. C. N.; TEIXEIRA, M. G. A concepção de “espaço” na investigação epidemiológica. **Cadernos de Saúde Pública**, v.15, p.271-9, 1999.

- CROOKS, A.J. *et al.* The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. **Journal of General Virology**, v.75, p.3453-3460, 1994.
- CUNHA, R.V. *et al.* Retrospective study on dengue in Fortaleza State of Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.155-159, 1998.
- DAHER, E.F. *et al.* Risk factors for death and changing patterns in acute renal failure of leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p.630-634, 1999.
- DAHER, E.F. *et al.* Acute kidney injury in an infectious disease intensive care unit – an assessment of prognostic factors. **Swiss Medical Weekly**, v.138, p. 128-133, 2008.
- DAHER, E.F. *et al.* Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.14, p.3- 10, 2010a.
- DAHER, E.F. *et al.* Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.14, p.3- 10, 2010b.
- DAHER, E.F.; ABREU, K.L.S.; JÚNIOR, G.B.S. Insuficiência renal aguda associada à leptospírose. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.32, p.408- 415, 2010.
- DEPARIS, X. *et al.* Changing clinical and biological manifestations of dengue during the dengue-2 epidemic in French Polynesia in 1996/97 – description and analysis in a prospective study. **Tropical Medicine and International Health**, v.3, 859–865, 1998.
- 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**, v.8, p.390-398, 2004.
- DESAI, S. *et al.* Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 691–697, 2009.
- DIAS, J.P. *et al.* Factors associated with *Leptospira sp* infection in a large urban center in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 499-504, 2007.
- DOS SANTOS, E.D.; GARRETT, D.O. Avaliação do Sistema de Vigilância de Hantavírus no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** , v.14, p.15 – 31, 2005.
- DUSSART, P. *et al.* Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, p. 1185–1189, 2006.
- DUSSART, P. *et al.* Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. **Neglected Tropical Disease**, v. 2, p.280, 2008.



- DUTRA, N.R. *et al.* The laboratorial diagnosis of dengue: Applications and implications. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.1, p.38-44, 2009.
- ELLIS, W.A. *et al.* Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. **Research in Veterinary Science**, v.39, p.296–298, 1985.
- ELLIS, W.A. *et al.* Boars as carriers of leptospires of the Australis serogroup on farms with an abortion problem. **Veterinary Record**, v.118, p.563, 1986a.
- ELLIS, W.A. *et al.* Isolation of leptospires from the genital tract and kidneys of aborted sows. **Veterinary Record**, v.118, p.294–295, 1986b.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, v. 10, p. 463–478, 1994.
- ELLIS, T. *et al.* Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001–2002. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, p.541- 547, 2008.
- ENNIS, F. A. *et al.* Hantavirus pulmonary syndrome: CD8 and CD4 cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness. **Virology**, v.238, p.380–390, 1997.
- ENRIA, D. A. *et al.* Clinical manifestations of New World hantaviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.256, p.117–134, 2001.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Dengue worldwide: an overview of the current situation and the implications for Europe. **Eurosurveillance**, v.12, 2007.
- EVANGELISTA, K.V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, p. 1413-1425, 2010.
- EVERARD, J.D.; EVERARD, C.O.R. Leptospirosis in the Caribbean. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 4, p.114-122, 1993.
- FALCONAR, A.K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Archives of Virology**, v. 142, p. 897-916, 1997.
- FARR, R.W. Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.21, p. 1–6, 1995.
- FERREIRA, M.S. Hantaviruses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.81-96, 2003.
- FERREIRA, M.L.B. *et al.* Manifestações Neurológicas de Dengue. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.63, p. 488-493, 2005.
- FIGUEIREDO, G.G. *et al.* Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p.348-354, 2010.

FIGUEIREDO, L.T.M. *et al.* Contribuição ao diagnóstico, ao tratamento, à epidemiologia e ao controle da síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.9, p.167-178, 2000.

FIGUEIREDO, L.T.M.; CAMPOS, G.M.; RODRIGUES, F. B. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavirus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, p.13-23, 2001.

FIGUEIREDO, L.T.M. Hantavirose. In: CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Manual de condutas em infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2004, p.123-132.

FIGUEIREDO, L.T.M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.203-210, 2006.

FIGUEIREDO, L.T.M. *et al.* Hantavirus Pulmonary Syndrome, Central Plateau, Southeastern, and Southern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, 2009.

FIGUEIREDO, R. *et al.* Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emergent Infectious Diseases**, v. 14, p.667-669, 2008.

FLAMAND, M. *et al.* Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of Virology**, v.73, p. 6104-6110, 1999.

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

FONSECA, C.A. *et al.* Leptospira DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Infection**, v.52, p.15–22, 2006a.

FONSECA, C.A. *et al.* Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. **Tropical Medicine and International Health**, v.11, p. 1699–1707, 2006b.

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

FRY, S.R. *et al.* The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. **Neglected Tropical Disease**, v.5, p.1199, 2011.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS (FUNCEME). Ceará. Disponível em: <http://www.funceme.br/index.php/areas/tempo/grafico-de-chuvas-dos-postos-pluviometricos>. Acesso em: 09 nov.2013.

GADELHA, D.P.; TODA, A.T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia de Doença Tropical**, v. 37, p. 29-36, 1985.

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

GLASSER, C.M.; GOMES, A.C. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p. 166-172, 2002.

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

GONÇALVES, A.J. *et al.* Hemoptise e síndrome de angústia respiratória do adulto como causas da morte da leptospirose: mudanças de padrões clínicos e anatomopatológicos. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, p.261, 1992.

GONZALEZ, D. *et al.* Classical dengue hemorrhagic fever resulting from two dengue infections spaced 20 years or more apart: Havana, Dengue 3 epidemic, 2001-2002. **International Journal of Infectious Diseases**, v.9, p. 280–285, 2005.

GRAVILOVSKAYA, I.N. *et al.* B3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.95, p.7074-7079, 1998.

GRAVILOVSKAYA, I.N. *et al.* Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. **Journal of Virology**, v.73, p.3951–3959, 1999a.

GRAVILOVSKAYA, I.N. *et al.* New York 1 and Sin Nombre viruses are serotypically distinct viruses associated with hantavirus pulmonary syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.122–126, 1999b.

GRAVILOVSKAYA, I.N. *et al.* Pathogenic hantaviruses selectively inhibit beta3 integrin directed endothelial cell migration. **Archives of Virology**, v.147, p.1913–1931, 2002.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International, p.1-22,1997.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 480-496, 1998.

GURUKUMAR, K.R. *et al.* Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. **Virology Journal**, v.6, p. 1-8, 2009.

GUZMAN, M.G. *et al.* Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, p. 118–124, 2002.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.33-42, 2002.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G., Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, v.27, p. 1-13, 2003.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 69–80, 2004.

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

- GUZMÁN, M.G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews**, v. 8, p. 7-16, 2010.
- HAAKE, D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v.146, p.491–1504, 2000.
- HALLIN, G.W. *et al.* Cardiopulmonary manifestations of hantavirus pulmonary syndrome. **Critical Care Medicine**, v.24, p.252-258, 1996.
- HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. **Science**, v.239, p. 476- 480, 1988.
- HALSTEAD, S.B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.6, p.407-15, 2006.
- HALSTEAD, S.B. Dengue. **The Lancet**, v.370, p.1644-1652, 2007.
- HAMMOND, S.N. *et al.* Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, p.1063–1070, 2005.
- HANG, V.T. *et al.* Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **Neglected Tropical Diseases**, v.3, p.360, 2009.
- HARRINGTON, L.C.; EDMAN, J.D.; SCOTT, T.W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Journal of Medical Entomology**, v. 38, p. 411-422, 2001.
- HARRIS, E. *et al.* Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2634–2639, 1998.
- HART, C.A.; BENNETT, M. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. **Microbes and Infections**, v.1, p.1229-1237, 1999.
- HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, 2011.
- HEMUNGKORN, M.; THISYAKORN, U.; THISYAKORN, C., Dengue infection: A growing global health threat. **BioScience Trends**, v. 1, p. 90-96, 2007.
- HENCHAL, E. A. *et al.* Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 164–169, 1983.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.376-396, 1990.
- HENCHAL, E.A. *et al.* Sensivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.45, p. 418-428, 1991.

- HILTON, R. Acute renal failure. **British Medical Journal**, v.333, p. 786- 790, 2006.
- HINRICHSEN, S.M.L. *et al.* Evidence of hantaviral infection in Brazilian patients from Recife with suspected leptospirosis. **Lancet**, v.341, p.50, 1993.
- HOLK, K.; NIELSEN, S.V.; RENNE, T. Human leptospirosis in Denmark 1970-1996: an epidemiological and clinical study. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 32, p.533-538, 2000.
- HONARMAND, H.R.; KHORAMIZADEH, M.R.; ESHRAGHI, S.S. Evaluation of patients sera for early diagnosis of Leptospirosis by PCR. **Journal of Ardabil University of Medical Sciences**, v.9, p.359-353, 2010.
- HU, D. *et al.* Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. **Virology Journal**, v.8, p.47, 2011.
- HUNSPERGER, E.A. *et al.* Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.436- 440, 2009.
- INNIS, B.L. Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: **Kass handbook of infectious diseases: exotic virus infections**. London: Chapman and Hall Medical, p.103-46, 1995.
- ISTURIZ, R.E.; GUBLER, D.J.; BREA DEL CASTILLO, J. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, p. 121-140, 2000.
- JAASKELAINEN, K.M. *et al.* Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. **Journal of Medical Virology**, v.79, p.1527–1536, 2007.
- JAHAN, F. Dengue Fever (DF) in Pakistan. **Asia Pacific Family Medicine**, v.10, p.1, 2011.
- JESSIE, K. *et al.* Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1411–1418, 2004.
- JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4977–4983, 2005.
- JONSSON, C.B.; FIGUEIREDO, L.T.M.; VAPALAHTI, O. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, p. 412–441, 2010.
- JOSHI, V.; MOURYA, D.; SHARMA, R. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, p.158-161, 2002.
- JUNJHON, J. *et al.* Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. **Virology Journal**, v. 84, p. 8353- 8358, 2010.
- KALAYANAROOJ, S. *et al.* Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176 p. 313- 321, 1997.

KAO, C. L. *et al.* Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3672–3677, 2001.

KAO, C.L. *et al.* Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical and public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 38, p.5-16, 2005.

KARANDE, S. *et al.* Concurrent outbreak of leptospirosis and dengue in Mumbai, India 2002. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.51, p. 174–181, 2005.

KEE, S.H. *et al.* Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1035–1039, 1994.

KHAN, E. *et al.* 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**, v.59, p.390-394, 2009.

KHAN, N.A. *et al.* Clinical profile and outcome of hospitalized patients during first outbreak of dengue in Makkah, Saudi Arabia. **Acta Tropica** v.105, p. 39–44, 2008.

KILPATRICK, E. D. *et al.* Role of specific CD8 T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome. **Journal of Immunology**, v.172, p.3297–3304, 2004.

KO, A.L.; *et al.* Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **The Lancet**, v. 354, p. 819-825, 1999.

KO, A.L; GOARANT, C.; PICCARDEAU, M. Leptospira: the dawn of molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.736–746, 2009.

KONG, Y. Y. *et al.* Rapid detection, serotyping and quantification of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 138, p. 123–130, 2006.

KORTING, K.S. *et al.* Hantavírose: patologia e registro no Brasil. **Revista de Ciências da Saúde**, v.20, 2008.

KRAMSKI, M. *et al.* Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing. **Clinical Chemistry**, v. 53, p.1899-1905, 2007.

KRAUS, A.A. *et al.* Inactivation of Hantaan virus-containing samples for subsequent investigations outside biosafety level 3 facilities. **Intervirology**, v.48, p.255-261, 2005.

KRAUTKRAMER, E.; ZEIER, M.; PLYUSNIN, A. Hantavirus infection: an emerging infectious disease causing acute renal failure. **Kidney International**, v. 83, p.23–27, 2012.

- KUMARASAMY, V. *et al.* Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. **Singapore Medical Journal**, v. 48, p. 669, 2007.
- KUNO, G. Review of the factors modulating dengue transmission. **Epidemiologic Reviews**, v.17, p.321-35, 1995.
- KUNO, G. Research on dengue and dengue-like illness in East Asia and the Western Pacific during the first half of the 20th century. **Reviews in Medical Virology**, v.17, p.327–341, 2007.
- KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, v.11, p.301-311, 2001.
- KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 30, p. 329-340, 2007.
- LAFLEUR, C. *et al.* HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, v.63, p. 1039–1044, 2002.
- LANCIOTTI, R.S. *et al.* Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p. 545-551, 1992.
- LAPPHRA, K. *et al.* Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.60, p.387–391, 2008.
- LAURICHESSE, H. *et al.* Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p.395–403, 2007.
- LÁZARO, M.E. *et al.* Clusters of hantavirus infection, southern Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.104-110, 2007.
- LE DUC, J.W. *et al.* Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.34, p.810-815, 1985.
- LECOUR, H. *et al.* Human leptospirosis- a review of 50 cases. **Infection**, v. 17, p.8-12, 1989.
- LEDNICKY, J.A. Hantavirus: a short review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.127, p.30-35, 2003.
- LEE, H.W. Korean hemorrhagic fever. **Progress of Medical Virology**, v.28, p.96-113, 1982.
- LEI, H.Y. *et al.* Immunopathogenesis of dengue virus infection. **Journal Biomedical Science**, v. 8, p.377-388, 2001.
- LEONARD, F.C.; QUINN, P.J.; ELLIS, W.A. Duration of urinary excretion of leptospire by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **The Veterinary Record**, v.131, p.435-439, 1992.

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**, v.62, p.112- 114, 2000.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p. 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**, v.66, p.745- 748, 2002.

LEVETT, P.N. *et al.* *Leptospira broomi* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.671–673, 2006.

LIAO, S. *et al.* Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiology**, v.9, p.253, 2009.

LIMA, D.M. *et al.* Hantavirus infection in suspected dengue cases from Ceará State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p.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**, v.16, p.259-264, 1974.

LIN, C. F. *et al.* Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. **Viral Immunology**, v. 19, p. 127–132, 2006.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott William, p.1101-1151, 2007.

LINDOSO, J.A.L.; LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 247-253, 2009.

LODEIRO, M.F.; FILOMATO, C.V.; GAMARNIK, A.V. Structural and Functional Studies of the Promoter Element for Dengue Virus RNA Replication. **Journal of Virology**, v. 83, p. 993-1008, 2009.

LOW, J.G. *et al.* Early Dengue infection and outcome study (EDEN) – study design and preliminary findings. **Annals of the Academy of Medicine**, Singapore, v.35, p. 783–789, 2006.

MACEDO, R.N. *et al.* Severe coinfection of melioidosis and dengue fever in Northeastern Brazil: first case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p.132-133, 2012.

MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; YOUNG, P.R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, p. 232-240, 1996.

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, 2011.

MAGALHÃES, G.B.; ZANELLA, M.E.; SALES, M. C. L. A ocorrência de chuvas e a incidência de leptospirose em Fortaleza-CE. **Revista Brasileira de Geografia**



**Médica e da Saúde**, v.5, p.77-87, 2009.

MALAVIGE, G.N. *et al.* Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v.80, p.588-601, 2004.

MARTINEZ-SANCHES, R. *et al.* Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 8, p. 385–392, 2000.

MARTINEZ-SANCHES, R. *et al.* The reactogenicity and immunogenicity of the first Cuban vaccine against human leptospirosis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 50, p. 159–166, 1998.

MARTINEZ-TORRES, M. E. **Dengue hemorrágico em crianças**: editorial. Havana: José Martí, 180p, 1990.

MARTINS, V.E.P. *et al.* Primeiro registro de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* no Estado do Ceará, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 737-739, 2006.

MARTINS, V.E.P. *et al.* Distribuição espacial e características dos criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p.73-77, 2010.

MARTINS, V.P. *et al.* *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. **Entomotropica**, v.28, p.75-86, 2013.

MATHIAS, M.A.; LEVETT, P.N. Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. **The West Indian Medical Journal**, v. 51, p.51:10-13, 2002.

MCBRIDE, A. *et al.* Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, p.376–386, 2005.

MCCAUGHEY, C.; HART, C.A. Hantaviruses. **Journal of Medical Microbiology**, v.49, p.587-599, 2000.

MCKEE, K.; LEDUC, J.; PETERS, C. Hantaviruses. In: **Textbook of human virology**, St Louis: Mosby Year Book, p.615-632, 1991.

MEHTA R.C. *et al.* Importance of complete blood count and peripheral smear examination in early diagnosis of Dengue patients. **Journal of Infectious Diseases Letters**, v. 2, p. 22-24, 2013.

MEIRA, R. “**Urucubaca**” gripe ou dengue? **Dengue**. In: Clínica médica. São Paulo: Gráfica O Estado de S. Paulo, p.273-85, 1916.

MILLER, J.L. *et al.* The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 17, 2008.

MORENS, D.M.; FAUCI, A.S. Dengue and hemorrhagic fever: a potential threat to Public Health in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 299, p. 214-216, 2008.

- MORGAN, J. *et al.* Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clinical Infectious Diseases*, v. 34, p.1593–1599, 2002.
- MORITA, K.; TANAKA, M.; IGARASHI, A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 2107–2110, 1991.
- NAVARRO-SANCHEZ, E. *et al.* Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *European Molecular Biology Organization Journal*, v.4, p.723-728, 2003.
- NICHOL, S.T. Bunyaviruses. In: **Field's Virology**, v.2, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p.1603–1633, 2001.
- OLIVEIRA, E.C.L. *et al.* Alterações hematológicas em pacientes com dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42(6), p. 682-685, 2009.
- PADULA, P.J. *et al.* Hantavirus Pulmonary Syndrome Outbreak in Argentina: Molecular Evidence for Person-to-Person Transmission of Andes Vírus. *Virology*, v.24, p.323-330, 1998.
- PALANIAPPAN, R.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.20, p.284–292, 2007.
- PAMPLONA, L.G.C. *et al.* Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de cimento do Município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 400-404, 2004.
- PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. **PAHO Scientific Publication**, n. 548, p.3–20, 49–58, 69–70, 1994.
- PAPPAS, G. *et al.* The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **International Society for Infectious Diseases**, v.12, p. 351-357, 2008.
- PATE, G.E. *et al.* A review of the epidemiology of leptospirosis in the Republic of Ireland. **Irish Medical Journal**, v. 93, p.114-117, 2000.
- PEDRO, A. O dengue em Nictheroy. **Brazil-Médico**, v.1, n.13, p.173-7, 1923.
- PEELING, R.W. *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 30-38, 2010.
- [PERERA, R.; KUHN, R.J. Structural proteomics of dengue virus.](#) **Current Opinion in Microbiology**, v.11, p. 369–377, 2008.
- PEREZ, J.; GOARANT, C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. **Microbiology**, v.10, p.325, 2010.
- PEROLAT, P. *et al.* *Leptospira faine* sp. nov., isolated from pigs in Australia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.851-858, 1998.

PETERS, C.J. HPS in the Americas. *In: Emerging Infections 2*. Washington, DC , ASM Press, p.17-64, 1998.

PHUONG, C.X. *et al.* Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p. 172–179, 2004.

PICARDEAU, M. *et al.* Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v.3, p.1607, 2008.

PINCELLI, M.P. *et al.* Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.29, p.309-324, 2003.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, v.2, p.1265-1276, 2000.

PLATT, K.B. *et al.* Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57, p. 119-125, 1997.

PLYUSNIN, A. *et al.* Analysis of Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemica and rodent carriers from the sites of infection. **Journal of Medical Virology**, v.59, p.397-405, 1999.

POERSCH, C.O. *et al.* Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *Journal of Clinical Virology*, v.32, p.272–277, 2005.

POTTS, J.A.; ROTHMAN, A.L. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations. **Tropical Medicine and International Health**, v. 13, p. 1328-1340, 2008.

PRAEWILAI, T. Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.42, 2011.

RABONI, S.M. *et al.* Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, p.800-804, 2005.

RACE, M. W.; WILLIAMS, M. C.; AGOSTINI, C. F. Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, p. 18–22, 1979.

RAENGSAKULRACH , B. *et al.* Comparison of four reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. **Journal of Virological Methods**, v.105, p. 219-232, 2002.

RATNAM, S. Leptospirosis: an Indian perspective. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 12, p.228-239, 1994.

REBÊLO, J.M.M. *et al.* Distribuição do *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saude Publica**, v.15, p.477-486, 1999.

REILLY, J.R.; HANSON, L.E.; FERRIS, D.H. Experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira grippotyphosa* from rodents to wild marsupials and carnivora. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.1443–1448, 1970.

RIGAU-PÉREZ, J.G. The clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990–91. **Pan American Journal of Public Health**, v.1, p. 381–388, 1997.

ROSA, E.S. *et al.* Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.5, 2005.

ROSA, E.S.T. *et al.* Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome, Maranhão, Brazil. **Emergent Infectious Diseases**, v.16, p.1952–1955, 2010.

ROSEN, L.L.; DROUET, M.M.; DEUBEL, V.V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p.720–724, 1999.

RUDNICK, A.; MARCHETTE, N.J.; GARCIA, R. Possible jungle dengue – recent studies and hypothesis. **Japanese Journal Medical Science and Biology**, v. 20, p. 69–74, 1967.

SAGGIORO, F.P. *et al.* Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in hantavirus pulmonary syndrome. **Journal of Infectious Disease**, v.195, p.1541-1549, 2007.

SAN MARTÍN, J.L. *et al.* The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 128-135, 2010.

SANDERS, E.J. *et al.* Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, p.935–941, 1999.

SANDOVAL, J.J.F. *et al.* Controle do dengue na cidade de Manaus – Amazonas, 2001-2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, 2003.

SA-NGASANG, A. *et al.* Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Epidemiology and Infection**, v.134, p.820-825, 2006.

SANTOS, H.W.G. *et al.* A Simple One-Step Real-Time RT-PCR for Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Journal of Medical Virology**, v.80, p.1426-1433, 2008.

SANTOS, R.L.C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 671-673, 2003.

SANTOS, V.M. *et al.* Hantavirus Pulmonary Syndrome Coexistent with Dengue. **The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences**, v.52, 2010.

SASAKI, D.M. *et al.* Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 48, p.35-43, 1993.

- SAXENA, P. *et al.* Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. **Virology Journal**, v.5, p. 20-25, 2008.
- SCHILLING, S. *et al.* Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, p.179–184, 2004.
- SCHLESINGER, J.J. *et al.* Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 593-599, 1990.
- SCHMALJOHN, C. S. *et al.* Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. **Virology**, v.155, p.633–643, 1986.
- SCHMALJOHN, C.S.; HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.95-104, 1997.
- 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**, v.100, p. 608-614, 2006.
- SHAHID, A. *et al.* Dengue Fever Outbreak: A Clinical Management Experience. **Journal of The College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 18 (1), p. 8-12, 2008.
- SHU, P.Y. *et al.* Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 1840-1844, 2002.
- SHU, P.Y.; HUANG, J.H. Current advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p.642–650, 2004.
- SIERRA, B.D. *et al.* Ethnicity and Difference in Dengue Virus-Specific Memory T Cell Responses in Cuban Individuals. **Viral Immunology**, v.19, p. 662–668, 2006.
- SILVA, A.D.; EVANGELISTA, M.S.N. Suspicious cases with negative serology. Brazil, Federal District, 2008. Syndromic surveillance: etiologic study of acute febrile illness in dengue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.52, p.237-242, 2010.
- SILVA, F.G. *et al.* Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue - São Paulo. **Bepa**, v.8, p.14-26, 2011.
- SILVA, M.V. *et al.* Hantavirus pulmonary syndrome: report of the first three cases in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, p.231-234, 1997.
- SINGH, K. R. P; PAUL, S. D. Multiplication of arboviruses in cell lines from *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Current Science**, v. 37, p. 65–67, 1968.
- SITPRIJA, V.; LOSUWANRAK, K.; KANJANABUCH, T. Leptospirosis nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 23, p.42-48, 2003.
- SLACK, A. *et al.* Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a

clinical environment. **Diagnosis in Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, p. 361–366, 2007.

SOLANKE, V.N. *et al.* Utility of Battery of Tests for Accurate Serodiagnosis of Dengue. **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 4, p.3629 – 3632, 2013.

SOUSA C.A. *et al.* Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. **Eurosurveillance**, v.17, p.8-11, 2012.

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**, v. 40, p. 431-435, 2007.

SOUZA, R.V. *et al.* An outbreak of dengue in the state of Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.345-346, 1995.

STEPHENS, H. A. *et al.* HLA-A and –B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. **Tissue Antigens**, v. 60, p.309–318, 2002.

STERN, E.J. *et al.* Outbreak of leptospirosis among adventure race participants in Florida, 2005. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, p. 843–849, 2010.

SUHARTI, C. *et al.* Hantavirus infection during dengue virus infection outbreak in Indonesia. **Acta Medica Indonesiana**, v. 41, p. 75-80, 2009.

SULLIVAN, N.J. Antibody-mediated enhancement of viral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 260, p.145-169, 2001.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.1, p.122-35, 1996.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.8, p.5-33, 1999.

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

TEMPORÃO, J.G. *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p.938–940, 2001.

TERAJIMA, M. *et al.* High Levels of Viremia in Patients with the Hantavirus Pulmonary Syndrome. **Journal Infectious Disease**, v.180, p. 2030-2034, 1999.

THAIPADUNPANIT, J. *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**, v.6, p.1-6, 2011.

THEIN, S. *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 56, p.566-572, 1997.

- TONTULAWAT, P. *et al.* Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 42, 2011.
- TRICOU, V. *et al.* Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infectious Diseases*, v.10, p.142, 2010.
- TROFA, A.F. *et al.* Dengue in US military personnel in Haiti. *Journal of American Medical Association*, v.277, p.1546–1548, 1997.
- VAHERI, A. *et al.* Hantavirus infections in Europe and their impact on public health *Reviews in Medical Virology*, v.23, p.35–49, 2013.
- VAPALAHTI, O.; LUNDKVIST, A.; VAHERI, A. Human Immune Response, Host Genetics, and Severity of Disease. [Current Topics in Microbiology and Immunology](#), v.256, p.153-169, 2001.
- VASCONCELOS, P.F.C. *et al.* A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceara state, Brazil, 1994. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.37, p.253-255, 1995.
- VASCONCELOS, P.F.C. *et al.* Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito sorológico epidemiológico aleatório. *Revista de Saúde Pública*, v. 32, p. 447-454, 1998.
- VAUGHN, D.W. *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *Journal of Infectious Disease*, v.181, p. 2-9, 2000.
- VELATHANTHIRIA, G.N.S. *et al.* Comparison of Serology, Virus Isolation and RT-PCR in the Diagnosis of Dengue Viral Infections in Sri Lanka. *Dengue Bulletin*: 30, 2006.
- VERDEAL, J.C.R. *et al.* Recomendações para o manejo de pacientes com formas graves de dengue. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v.23, p.125-133, 2011.
- VICTORIANO, A. *et al.* Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infectious Diseases*, v.9, p.147, 2009.
- VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; SHRIRAM, A.N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences*, v.33, p.557–569, 2008.
- VORNDAM, A.V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infection. In: **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International, 1997.
- 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*, v.48, p.2793-2797, 2010.
- WATT, G. *et al.* Placebo-controlled trial of intra-venous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet*, v.1, p.433–435, 1988.
- WATTS, D. M. *et al.* Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 36, p. 143–152, 1987.

WELLS, R.M.; ESTANI, S.S.; YADON, Z.E. An unusual outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.171-174, 1997.

WHITEHORN, J.; FARRAR, J. Dengue. **British Medical Bulletin**, v. 95, p. 161-173, 2010.

WILDER-SMITH, A.; EARNEST, A.; PATON, N.I. Use of simple laboratory features to distinguish the early stage of severe acute respiratory syndrome from dengue fever. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p. 1818–1823, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva, Switzerland, 1997.

WHO. **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva, Switzerland, 2003.

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

WONGSRICHANALAI, C. *et al.* Co-infection with Malaria and Leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p.583-595, 2003.

WU, S. J. *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, p. 816–820, 2000.

XU, H. *et al.* Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2872-2978, 2006.

YOUNG, P.R. *et al.* 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**, v.38, p.1053-1057, 2000a.

YOUNG, J.C. *et al.* The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.714-717, 2000b.

ZEITZ, P.S. *et al.* Assessment of occupational risk for hantavirus infection in Arizona and New Mexico. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v.39, p.463-467, 1997.

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

ZHENQIANG BI, P. B.H.; FORMENTY, C. E. R. Hantavirus Infection: a review and global update. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.2, p.3-23, 2008.

ZOU, G. *et al.* Funcional Analysis of two cavities in flavivirus NS5 polymerase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 14362-14372, 2011.



## 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

### 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 está doando iremos fazer o diagnóstico de dengue e conseguiremos quantificar com exatidão quantos vírus dengue estarão presentes no seu sangue. Para que com isso, tome 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. Há 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 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

Data da consulta ___ / ___ / _____	Número _____
MÉDICO: Dr.(a) _____	
<b>Projeto Dengue 2012</b>	
<b>Ficha de Avaliação Inicial (1º ao 5º dia)</b>	
Nome: _____	Idade: _____ Sexo: _____
Endereço: _____	Bairro: _____
Cidade: _____ Estado: _____	Telefone: ( ) _____
OBS: Autoriza a ligação para sua residência para informar os resultados dos exames: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<b>Crítérios de inclusão:</b>	
• Febre ≤ 5 dias? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Data início da febre: ___ / ___ / ___
• Internado no HSJ? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Data início da febre: ___ / ___ / ___
• Mínimo de 2 dos critérios abaixo (assinale):	
<input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Dor retroorbitária <input type="checkbox"/> Mialgias <input type="checkbox"/> Artralgias <input type="checkbox"/> Prostração <input type="checkbox"/> Exantema	
<b>Crítérios de exclusão:</b>	
<input type="checkbox"/> Gestante <input type="checkbox"/> < 18 anos <input type="checkbox"/> Uso de imunossupressores <input type="checkbox"/> Não concordou <input type="checkbox"/> Possuir sinais de localização que sugiram outra etiologia (ex: influenza, gastroenterite, amigdalite, etc)	
<b>Manifestações clínicas adicionais:</b> <input type="checkbox"/> Sim. Quais? <input type="checkbox"/> Não	
<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: _____	
<b>Manifestações hemorrágicas:</b> <input type="checkbox"/> Sim. Quais? <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"/> Melena <input type="checkbox"/> Hematêmese <input type="checkbox"/> Outras: _____	
> Prova do laço: <input type="checkbox"/> Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/> Não realizada. Porque?	
<b>Antecedentes:</b>	
<input type="checkbox"/> Dengue. Período: _____ Internação? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não    Data: ___ / ___ / ___ <input type="checkbox"/> Familiares/vizinhos com sintomas semelhantes <input type="checkbox"/> Contato com ratos/enxurradas <input type="checkbox"/> Viagem nos últimos 30 dias    Local: _____ Período: _____ <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> Cardiopatia <input type="checkbox"/> IRA/IRC <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> DPOC <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Anemia falciforme <input type="checkbox"/> HIV/Aids <input type="checkbox"/> Doença péptica <input type="checkbox"/> Auto-ímmunes <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/> RG HSJ: _____ <input type="checkbox"/> AINE <input type="checkbox"/> Anti-agregantes <input type="checkbox"/> Anticoagulantes <input type="checkbox"/> Anti-hipertensivos	
<b>Sinais de alarme:</b> <input type="checkbox"/> Sim. Quais? <input type="checkbox"/> 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.	
<b>Sinais de choque:</b> <input type="checkbox"/> Sim. Quais? <input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> Hipotensão (PA <sub>max</sub> < 90mmHg) <input type="checkbox"/> PA convergente (diferencial < 20mmHg) <input type="checkbox"/> Pulso rápido e fino <input type="checkbox"/> Extremidades frias/cianose <input type="checkbox"/> Enchimento capilar lento (> 2 seg)	

**Complicações:**  Sim. Quais?       Não.

- Neurológicas    Disfunção cardio-respiratória    Hepáticas    Hemorragias  
 Leucopenia (GB<1000)    Plaquetopenia (Plaq<50000)    Outras: \_\_\_\_\_

**Tabela de achados clínicos e laboratoriais:**

Dados/Data							
Peso (Kg)							
Pulso							
Temp							
PA <sub>decúbito</sub>							
PA <sub>ortostase</sub>							
Capilar (s)							
Freq. Resp							
Hb (g/dL)							
Ht (%)							
GB (x10 <sup>3</sup> )							
Bastões (%)							
Seg (%)							
Linfo (%)							
Plaq (x10 <sup>3</sup> )							
TGO/AST							
TGP/ALT							
BT							
BD							
BI							
Albumina							
Uréia							
TAP (INR)							
TPTA							
Creatinina							
Sódio							
Potássio							
pH (A ou V)							
pO <sub>2</sub> (FIO <sub>2</sub> )							
pCO <sub>2</sub>							
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>							
BE							

**Raio X de tórax:**  normal    não realizado    alterado \_\_\_\_\_

**US abdome:**  normal    não realizado    alterado \_\_\_\_\_

**Outros exames:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Classificação inicial (Ministério da Saúde):**

Grupo A    Grupo B    Grupo C    Grupo D

Observações: \_\_\_\_\_

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 INFECCIOSAS
<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)</b>		
Protocolo N° 031/2009	CAAE:0033.0.042.000-09	
Título do Projeto: "Diagnóstico alternativo 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		
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO</b>		
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 Balma 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-orbitaria, artralgia, mialgia e exantema, atendidos no HSJ. O projeto foi submetido ao edital do "Programa Primeiro Projetos" – PPP/FUNCAP/CNPq, EDITAL FUNCAF 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 <b>APROVADO</b> .		
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.		
 <b>Dr. Roberto Dias Leite</b> Coordenador do CEP/HSJ		
Rua Nestor Barbosa, 315 – Parquiêndia – Fortaleza / Ceará CEP 40.455-610 FAX (85) 3101.2363 FAX (85) 3151.2318 e-mail: hq@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 INFECCIOSAS
--	---	--

**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 alternativos 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 São José - Fortaleza / Ceará  
 CEP 60.455-410 FAX (85) 3331.2263 FAX (85) 3331.2319  
 e-mail: hsj@hsj.ce.gov.br

