

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ASSISTÊNCIA E
AVALIAÇÃO EM SAÚDE**

PEDRO HENRIQUE DIAS BOTELHO

**APLICAÇÃO DE UM ALGORITMO PARA AVALIAÇÃO DO
DESEMPENHO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DENGUE
DURANTE EPIDEMIA NO CENTRO-OESTE, BRASIL (2012-2013)**

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação


Nome completo do autor: **Pedro Henrique Dias Botelho**

Título do trabalho: Aplicação de um Algoritmo para Avaliação do Desempenho de Testes Diagnósticos para Dengue Durante Epidemia no Centro-Oeste, Brasil (2012-2013)

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Data: 19/05/2017

Assinatura do (a) autor (a) ²

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

PEDRO HENRIQUE DIAS BOTELHO

**APLICAÇÃO DE UM ALGORITMO PARA AVALIAÇÃO DO
DESEMPENHO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DENGUE
DURANTE EPIDEMIA NO CENTRO-OESTE, BRASIL (2012-2013)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Mestre em Assistência e Avaliação em Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Freitas Bara
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Valéria Christina Rezende Féres

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Botelho, Pedro Henrique Dias
APLICAÇÃO DE UM ALGORITMO PARA AVALIAÇÃO DO
DESEMPENHO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DENGUE
DURANTE EPIDEMIA NO CENTRO-OESTE, BRASIL (2012-2013)
[manuscrito] / Pedro Henrique Dias Botelho. - 2017.
80 f.

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara; co-orientadora
Dra. Valéria Christina Rezende Féres .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em
Assistência e Avaliação em Saúde, Goiânia, 2017.

1. Dengue. 2. Algoritmo Diagnóstico Laboratorial. 3. Antidengue IgM
ELISA. 4. RT-PCR. 5. NS1Ag. I. Bara, Maria Teresa Freitas, orient. II.
Título.

CDU 615.1



Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 12

Aos vinte dias do mês de abril do ano de 2017, às 14h: 30 min no Auditório do Museu da UFG, realizou-se a Defesa de dissertação, intitulada “**Avaliação de testes diagnósticos para dengue durante epidemia (2012-2013) no Centro-Oeste, Brasil**”, de autoria de Pedro Henrique Dias Botelho, aluno do Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde, nível: Mestrado. A Comissão Examinadora esteve constituída pelos professores: Maria Teresa Freitas Bara, Presidente, Keila Correia de Alcântara e Ângela Ferreira Lopes de Teive e Argolo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, cada avaliador emitiu um parecer sobre o desempenho do candidato, sendo o mesmo aprovado pela Comissão Examinadora. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17h: 00 min a presidência da mesa encerrou a sessão e para constar, eu, Maria Teresa Freitas Bara, lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da banca examinadora e pelo discente.

Parecer da Comissão Examinadora

Membro	Aprovado/
	Reprovado
Maria Teresa Freitas Bara	<u>aprovado</u>
Keila Correia de Alcântara	<u>aprovado</u>
Ângela Ferreira Lopes de Teive e Argolo	<u>aprovado</u>
Benigno Alberto Moraes da Rocha	

Goiânia, 20 de abril de 2017

Keila Correia de Alcântara

Profª. Drª. Keila Correia de Alcântara

Membro Titular

Ângela Ferreira Lopes de Teive e Argolo

Profª. Drª. Ângela F. L. de T. e Argolo

Membro Titular

Maria Teresa Freitas Bara

Profª. Drª. Maria Teresa F. Bara

Presidente

Pedro Henrique Dias Botelho

Pedro Henrique Dias Botelho

Discente



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde



Obs.: Caso haja mudança de título trazer imediatamente na Secretaria para alteração da Ata

Alterações compulsórias para obtenção do diploma:

- 1- Alterar o título para: Aplicação de um algoritmo para avaliar o desempenho de testes diagnósticos para dengue durante epidemia (2012-2013) no centro-oeste, Brasil.
- 2- Reescrever resumo, introdução, objeto, objetivos, metodologia, considerações finais ou conclusão, referências bibliográficas segundo orientações da banca.
- 3- Rever parágrafos da introdução, referenciando os autores específicos.
- 4- Entregar em 30 dias a partir de hoje, conforme normativa do programa PPGSAS.

Mercyara
Keila Alcântara
Angelo Lopes

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO

Aluno(a): Pedro Henrique Dias Botelho

Orientador(a): Maria Teresa Freitas Bara

Co-Orientador(a): Valéria Christina Rezende Féres

Membros:

1. Maria Teresa Freitas Bara

2. Keila Correia de Alcântara

3. Angela Ferreira Lopes de Teive e Argolo

OU

4. Benigno Alberto Moraes da Rocha

Data: 20/04/2017

SUMÁRIO	VIII
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	X
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.2 Epidemiologia da dengue no Brasil	3
1.3 Sintomas e classificação clínica	5
1.4 Etiopatogenia	10
1.4.1 TRANSMISSÃO	10
1.4.2 AGENTE ETIOLOGICO	11
1.4.3 REPLICAÇÃO VIRAL	13
1.4.4 RESPOSTA IMUNE	15
1.5 Diagnóstico laboratorial	16
1.5.1. ISOLAMENTO VIRAL	17
1.5.2. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL	18
1.5.3. DETECÇÃO ANTIGENOS VIRAIS (NS1Ag)	19
1.5.4. DETECÇÃO DE ANTICORPOS	20
1.5.5. ALGORITMOS DIAGNOSTICOS	21
1.5.6. DIAGNOSTICO LABORATORIAL DE DENGUE NO BRASIL	24
2 OBJETO	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	29

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO	29
4.3 COLETA DE AMOSTRAS	31
4.4 ALGORITMO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO	31
4.5 TESTES LABORATORIAIS.....	32
4.6 CRITÉRIOS E DEFINIÇÕES	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 MANUSCRITO	35
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Quadro 1. Classificação de risco de acordo com os sinais e sintomas.	8
Figura 1. Fluxograma para classificação de risco de dengue.	9
Figura 2. Replicação do vírus da dengue.	12
Figura 3: Cinética de vírus, anticorpos e antígenos nas infecções primária e secundária do vírus Dengue.	15
Figura 4. Algoritmo de diagnóstico para confirmação laboratorial da infecção pelo vírus da dengue.	22
Tabela 1. Algoritmo de teste laboratorial de amostra de paciente com suspeita de dengue, por tipo de teste e dia após o início da doença.	23
Tabela 2. Métodos de Diagnóstico Laboratorial para a Detecção de Infecção por Dengue.	26
Capítulo 1:	
Table 1. Positivity of RT-PCR, NS1 and IgM dengue diagnostics tests according to the algorithm testing	37
Table 2. Sensitivity, specificity and diagnostic accuracy of RT-PCR, NS1 ELISA, IgM ELISA compared to each other, alone or in combination by the algorithm testing.	38
Figure 1: NS1 test results by type infection and by dengue virus serotyping.	39
Figure 2. A. Positivity of RT-PCR, NS1 ELISA, IgM ELISA by day 1-10 of onset of symptoms of dengue infection; B. Individual Positivity of RT-PCR, NS1 ELISA, IgM ELISA by day 1-10 of onset of symptoms of dengue infection; C. Association Positivity of RT-PCR, NS1 ELISA, IgM ELISA by day 1-10 of onset of symptoms of dengue infection.	40

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	Amplificação da infecção dependente/mediada por anticorpos (ADE) do inglês “ <i>Antibody Dependent-Enhancement</i> ”
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEME	Central de Medicamentos
CONASEMS	Conselhos Nacionais de Secretárias Estaduais
CONASS	Conselhos Nacionais de Secretárias Municipais
DC	Dengue Clássica
DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Sorotipo 1 do Vírus Dengue
DENV-2	Sorotipo 2 do Vírus Dengue
DENV-2	Sorotipo 3 do Vírus Dengue
DENV-3	Sorotipo 4 do Vírus Dengue
DG/SD	Dengue Grave, do inglês “ <i>Severe Dengue</i> ”
DNA	Ácido Desoxirribonucléico, do inglês “ <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ”
DOS	Dias após o início dos sintomas, do inglês “ <i>Days after onset symptoms</i> ”
DSA/DWS	Dengue com sinais de alarme, do inglês “ <i>Dengue with warning signs</i> ”
ELISA	Ensaio Imunoenzimático , do inglês Enzyme-linked immunosorbent assays
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
INF	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina G
IH	Ensaio de Inibição da Hemaglutinação
LACEN-GO	Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros – Goiás
MAC-ELISA	Anticorpos M Ensaio Imunoenzimático, do inglês M antibody - Enzyme-linked immunosorbent assays
NK	Células <i>Natural Killers</i>
NS1Ag	Antígeno NS1
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta do inglês “ <i>Open Read Frame</i> ”
PAHO/OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde do inglês “ <i>Pan-American Health Organization</i> ”

PRNT	Teste de Soroneutralização com Redução em Placa
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucléico, do inglês <i>“Ribonucleic Acid”</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
SES-GO	Secretaria de Estado da Saúde de Goiás
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
UTR	Regiões Não Transcritas do inglês <i>“Untranslated Regions”</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
WHO	Organização Mundial da Saúde do inglês <i>“World Health Organization”</i>

Introdução. Testes laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico da dengue, nesse sentido são propostos algoritmos, que propõe instruções para um diagnóstico laboratorial de dengue mais eficaz.

Objetivo. Avaliar o desempenho de testes laboratoriais na confirmação de casos suspeitos de dengue, no curso de duas epidemias (2012 e 2013) em Goiânia, Goiás, Centro-Oeste do Brasil.

Metodologia. Trata-se de um estudo observacional analítico que analisou uma base de dados clínicos e laboratoriais de uma coorte prospectiva de pacientes com suspeita clínica de dengue. O algoritmo aplicado baseou-se em três períodos da doença, 0-3, 4-7 e >7 dias após o início dos sintomas (DOS) e no uso de testes de detecção das imunoglobulinas M e G (IgM e IgG), do antígeno da proteína não-estrutural 1 (NS1Ag) e do RNA viral por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). Foram avaliadas a positividade dos testes individualmente e em associação de testes por dia de infecção; e a sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes. A análise estatística usou os programas SPSS Statistics 17.0, R software e OPENEPI.

Resultados. Dos 592 pacientes selecionados, 415 (70,1%) foram confirmados laboratorialmente. No período de 0-3 DOS, a RT-PCR e NS1Ag obtiveram 81,6% e 63,3% de positividade respectivamente. IgM obteve as positividade nos períodos de 4-7 e >7 DOS (85,5% e 93,3%, respectivamente). Individualmente, os testes de RT-PCR e IgM positividade ao diagnóstico no início e no final da fase aguda da infecção, respectivamente. Os resultados de sensibilidade foram semelhantes aos de positividade, enquanto os de especificidade de NS1Ag foram superiores à 90% em todos os períodos.

Conclusão. O algoritmo apontou qual teste laboratorial foi o melhor para o curso da doença. Até 3 DOS, o teste molecular é o mais sensível; Entre 4-7 DOS, duas técnicas podem ser necessárias para obter um diagnóstico preciso. O teste de NS1Ag apresenta menor detecção em casos de infecção secundária, no entanto, foi o teste mais específico, podendo ser utilizado no diagnóstico diferencial de dengue. Estes resultados contribuiriam para a decisão diagnóstica no contexto epidemiológico com a circulação concomitante de arbovírus.

Palavras-chave: Dengue; Diagnóstico Laboratorial; Algoritmo; RT-PCR; NS1Ag; Antidengue IgM ELISA.

Introduction. Laboratory tests are essential for dengue diagnosis, in that sense algorithms are proposed, which proposes instructions for a more effective laboratory dengue diagnosis.

Aim. To evaluate the performance of laboratory tests in the confirmation of suspected dengue cases, applying an algorithm, during a dengue epidemic in Goiânia, Central West Brazil 2012-2013.

Methodology. This is a retrospective analytical observational study in a database of a prospective cohort with suspected dengue cases. The algorithm applied was based on three periods in the acute phase of disease, 0-3, 4-7 and >7 days after onset of symptoms (DOS) and in detection of immunoglobulins M and G (IgM and IgG), non-structural 1 protein antigen (NS1Ag) and viral RNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Positivity was seen individually and in association of tests in the algorithm and per day of infection, and used to confirm cases. The tests performance was evaluated by the sensitivity, specificity and accuracy of each test when compared to the others association, also in the algorithm. The results were statistically analyzed using SPSS Statistics 17.0, R software and OPENEPI.

Results. 592 patients with suspected dengue were included, 415 (70.1%) were laboratory confirmed. In the 0-3 DOS period, the best positivities were by RT-PCR (81.6%) and NS1Ag (63.3%). While, IgM obtained the best positivities in 4-7 and >7 DOS periods (85.5% and 93.3%, respectively). Individually, RT-PCR and IgM tests were the most efficient to add positivity to diagnosis at the beginning and at the end of the acute phase of infection, respectively. Sensitivity results were similar to those of positivity, whereas NS1Ag specificities were greater than 90% at all periods.

Conclusion. The algorithm showed which laboratorial test was the best for the course of disease. Until 3 DOS, molecular is most sensitive test; between 4-7 DOS, two techniques may be required to obtain an accurate diagnostic. NS1Ag test, presented less detection in secondary infection cases, however, they was more specific test and can be used in differential diagnosis of dengue. These results contributed to diagnostic decision in the epidemiological context with concomitant arbovirus circulation.

Key-words: Dengue; Laboratory Diagnosis; Algorithm; RT-PCR; NS1Ag; Anti-dengue IgM ELISA.

Dengue é uma infecção viral aguda sistêmica, transmitida aos humanos por mosquitos do gênero *Aedes*. Dentre as arboviroses, a dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo, com grande impacto econômico (Simmons et al. 2012). Esse cenário é resultante de uma série de fatores, pela própria característica da doença por infectar milhares de pessoas durante as epidemias, a falta de medicamentos e tratamentos específicos contra o vírus dengue, programas ineficientes de combate aos mosquitos vetores da dengue e a difícil acessibilidade de vacinas e de testes laboratoriais eficazes para uso na rotina em todos os sistemas de saúde (Bhatt et al. 2013).

A confirmação laboratorial de dengue como diagnóstico diferencial de outras flaviviroses ou doenças exantemáticas ou hemorrágicas é relevante para um adequado manejo clínico, avaliação dos casos graves, suporte à vigilância, estudos de patogênese e pesquisa de medicamentos e vacinas. O diagnóstico laboratorial de dengue, de forma precoce e precisa, proporciona à vigilância epidemiológica e às autoridades em saúde informações úteis sobre período, localização, sorotipo circulante e gravidade da doença (Guzmán and Kourí 2004).

1.1 Histórico

Os primeiros relatos de uma doença associada a insetos voadores e água, na China foram publicados durante a Dinastia Chin (265 a 420 dC). Descrições de epidemias de uma doença que se assemelha clinicamente a dengue aconteceram

nos anos de 1779 e 1780 em três continentes (Ásia, África e América do Norte) (Gubler 1998 Burke & Monath 2002).

Epidemias intermitentes de dengue ocorreram na Ásia, América do Norte, Caribe e África durante os séculos XVIII e XIX. A segunda metade do século XX foi caracterizada pela expansão geográfica da doença, acredita-se que fatores como as transformações ocorridas no mundo, a necessidade de água armazenada e o transporte de suprimentos e outros materiais de guerra durante e após a segunda guerra mundial conduziram ao aumento da transmissão da dengue (Gubler 1998; Guzman et al. 2008).

Já em 1944, Albert B. Sabin e colegas isolaram DENV de soldados americanos na Índia, na Nova Guiné e no Havaí (Sabin and Schlesinger 1945). Estes primeiros isolamentos foram posteriormente classificados como DENV-1 e DENV-2 (Hotta and Kimura 1952; Sabin 1952), respectivamente, enquanto DENV-3 e DENV-4 foram isolados por Hammon e colaboradores durante a epidemia de Manila, Filipinas, em 1956 (Hammon et al. 1960 apud Gubler, 1998).

Na década de 1950, um programa de controle do vetor da febre amarela eliminou em muitos países o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), principal vetor da dengue, provocando uma diminuição ou eliminação das epidemias de dengue. Antes de 1970, apenas nove países passaram por epidemias severas de dengue. Contudo, na década de 1970 com o fim dos programas de controle de mosquitos, o *A. aegypti* voltou a reinfestar o mundo e se espalhar geograficamente durante os anos 80 e 90 (Guzman et al. 2008).

1.2 Epidemiologia da dengue no Brasil

No Brasil, as primeiras epidemias de dengue foram registradas entre 1846-1848 e 1851-1853. A partir de então, até a década de 1980, foram relatados apenas dois surtos, nos anos de 1916 e 1923 (Pimentel 1923; Pinheiro and Corber 1997). A próxima epidemia no Brasil ocorreu em 1982 no norte e foi associada aos sorotipos 1 e 4 (Osanai et al. 1983). Em 1986, o DENV-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, causando surtos importantes (Schatzmayr et al. 1986), e sendo disseminado para maioria dos estados brasileiros. Na década de 1980 ocorreram diversas epidemias de dengue causadas pelo DENV-1 em cinco países da América do Sul (Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador e Peru) que não haviam apresentado ou já estavam livres de surtos há muitos anos (Pinheiro and Nelson 1997).

A introdução do DENV-2, detectada no estado do Rio de Janeiro no ano de 1990 (Nogueira et al. 1990), levou a um aumento expressivo no número de casos de dengue no país. No ano de 1998 ocorreu a maior epidemia da década, na qual foram notificados mais de 700 mil casos de dengue no país. Nesse mesmo ano foi detectado um caso isolado alóctone de DENV-3 em Limeira-SP (Rocco et al. 2001), mas foi somente em 2000, que a introdução do sorotipo foi confirmada com a presença de casos autóctones no Rio de Janeiro (Nogueira et al. 2001).

A partir dos anos 2000, cinco grandes epidemias ocorreram no Brasil com predominância de diferentes sorotipos nos anos de 2002 (DENV-3), 2008 (DENV-2), 2010 (DENV-1), 2013 (DENV-4) e 2015 (DENV-1) (Teixeira et al. 2013; PAHO 2015, 2016). No período compreendido entre 2000 e 2016, houve registro de um aumento significativo no número de casos, casos graves, taxas de hospitalização e no

número de óbitos de dengue em todo o país (Teixeira et al. 2013; PAHO 2016, 2017).

No ano de 2013 foram registrados, somente nas Américas, mais de 2 milhões de casos de dengue com 1280 óbitos. Destes, cerca de 1,4 milhões de casos suspeitos de dengue foram registrados no Brasil, sendo que a região Centro-Oeste registou 271.773 desses casos, correspondendo a 18,4% desses casos (PAHO 2013, 2016).

No ano de 2016 foram notificados cerca de 2,3 milhões de casos de dengue em todos os países das Américas (exceto o Canadá), dos quais o Brasil foi responsável por aproximadamente 1,5 milhão. As regiões brasileiras Centro-Oeste e Sudeste obtiveram as maiores incidências nesse período, 1.322 e 1.001,8 por 100.000 habitantes, respectivamente (Brazil 2017; PAHO 2017).

Na região Centro-Oeste do Brasil as primeiras epidemias ocorreram 10 anos após as epidemias nas regiões litorâneas do país. O estado de Goiás é o que apresenta os maiores de índices de transmissão da doença (Teixeira et al. 2013; PAHO 2017).

Em Goiás, o primeiro registro laboratorial de dengue foi realizado em 1994, com mais de 3.500 casos notificados de DENV-1 (Maciel et al. 2008). A introdução do DENV-2 ocorreu em 1998, quando foram identificados os primeiros casos de febre hemorrágica de dengue (Siqueira et al. 2004). Em janeiro de 2002, após introdução do DENV-3 no país, houve rápida dispersão para todas as regiões brasileiras, e em 2003, este se tornou o sorotipo predominante dentre os isolados do mesmo ano (Feres et al. 2006). Entre os anos de 2003 e 2007 houve uma tendência de dispersão da doença para o interior do estado, associada a um aumento do

número de notificações de casos, casos graves e óbitos por dengue no estado (Maciel et al. 2008; PAHO 2016). O sorotipo 4, em Goiás, foi detectado em 2011, e em 2013 ocorreu uma grande epidemia de dengue causada pelo DENV-4 (Argolo et al. 2013; PAHO 2016).

Goiânia, capital de Goiás, tem sido o epicentro de picos epidêmicos sucessivos e crescentes devido à introdução ou substituição do sorotipo viral predominante em circulação (DENV-1/1994, DENV-1/3, 2002 DENV-3/1, 2008, DENV-1/3, 2010 e DENV-4/1 em 2011) (Feres et al. 2006; Argolo et al. 2013). De 2012 a 2013, ocorreu um dos maiores surtos de transmissão de dengue até então, no qual a incidência atingiu 2.233 casos por 100 mil habitantes (PAHO 2016).

1.3 Sintomas e classificação clínica

A infecção por DENV pode se apresentar de forma assintomática ou sintomática. Quando há presença dos sintomas, a infecção causa uma doença febril aguda, sistêmica e dinâmica, variando desde formas oligossintomáticas a formas graves, podendo evoluir ao óbito. A doença tem um início abrupto e pode ser dividida em três fases clínicas: febril, crítica e de recuperação (WHO 2009; Brasil 2016)

O Brasil, até o ano de 2013, adotava uma classificação de dengue, que classificava a doença em: Dengue Clássica (DC), Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), Dengue com Complicações e Síndrome do Choque da Dengue (SCD). A primeira manifestação para classificação de DC era a febre geralmente alta (39°C a 40°C), de início abrupto, associada a cefaléia, prostração, mialgia, artralgia, dor retroorbitária, exantema maculopapular acompanhado ou não de prurido, na qual o paciente apresentava recuperação após o período febril. Para a FHD era necessário

que a partir do 3º ao 7º dia de doença fosse evidenciado o surgimento de manifestações hemorrágicas, trombocitopenia e perda de plasma. Dengue com Complicações acontecia nos casos que não poderiam ser enquadrados como FHD, e que a classificação por DC fosse insatisfatória devido ao potencial risco associado ao quadro. O SCD acontecia quando uma hemoconcentração prolongada provocava disfunção de órgãos, acidose metabólica, coagulação intravascular disseminada e choque hipovolêmico, nessa classificação assumia-se um grande risco de morte para o paciente (Brasil; Ministério da Saúde. 2002; WHO 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reavaliou os critérios de classificação de dengue, que em 2014 passou a ser utilizada pelo Brasil (WHO 2009). Essa nova classificação observou a dengue como uma doença única, dinâmica e sistêmica, considerando que a doença pode evoluir para remissão dos sintomas ou agravar-se, portanto os pacientes foram categorizados em Dengue (D), Dengue com sinais de alarme (DSA) e Dengue grave (DG) (Brasil 2016).

Um quadro suspeito de dengue ocorre quando uma pessoa que reside ou viajou nos últimos 14 dias para uma área com transmissão de dengue ou com a presença do *A. aegypti*, apresenta febre há menos de 7 dias associada com pelo menos dois dos seguintes sinais e sintomas: náusea, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaleia, dor retroorbital, petéquias ou prova do laço positiva e/ou leucopenia. Considera-se também como caso suspeito de dengue uma criança proveniente ou residente em área com transmissão de dengue, com quadro febril agudo, entre 2 a 7 dias (Brasil 2016).

Caso suspeito de dengue com sinais de alarme ocorre quando o caso de dengue que na fase crítica, período de defervescência da febre, apresenta um ou





mais dos seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdômen, vômitos persistentes, acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural (lipotímia), hepatomegalia maior do que 2 cm e aumento progressivo do hematócrito (Brasil 2016).

Caso suspeito de dengue grave é quando um caso de dengue, seja com ou sem sinais de alarme, apresenta pelo menos um dos seguintes critérios: (1) Choque provocado pelo extravasamento grave de plasma, geralmente entre os dias quatro e cinco da febre; (2) Hemorragias graves; (3) Comprometimento grave de órgãos como hepatites, encefalites ou miocardites, que podem ocorrer sem o concomitante extravasamento plasmático ou choque (Brasil 2016).

O caso suspeito de dengue é confirmado por meio de testes laboratoriais específicos. Caso descartado é o caso suspeito de dengue que apresenta diagnóstico laboratorial negativo ou que seja um caso cujas investigações clínica e epidemiológica são compatíveis com outras doenças e não apresente teste laboratorial (Brasil 2016)

No Brasil é adotada a classificação de risco no atendimento e triagem de casos suspeitos. Essa classificação visa reduzir o tempo de espera no serviço de saúde, por meio de dados da anamnese e de exame físico (Quadro 1).

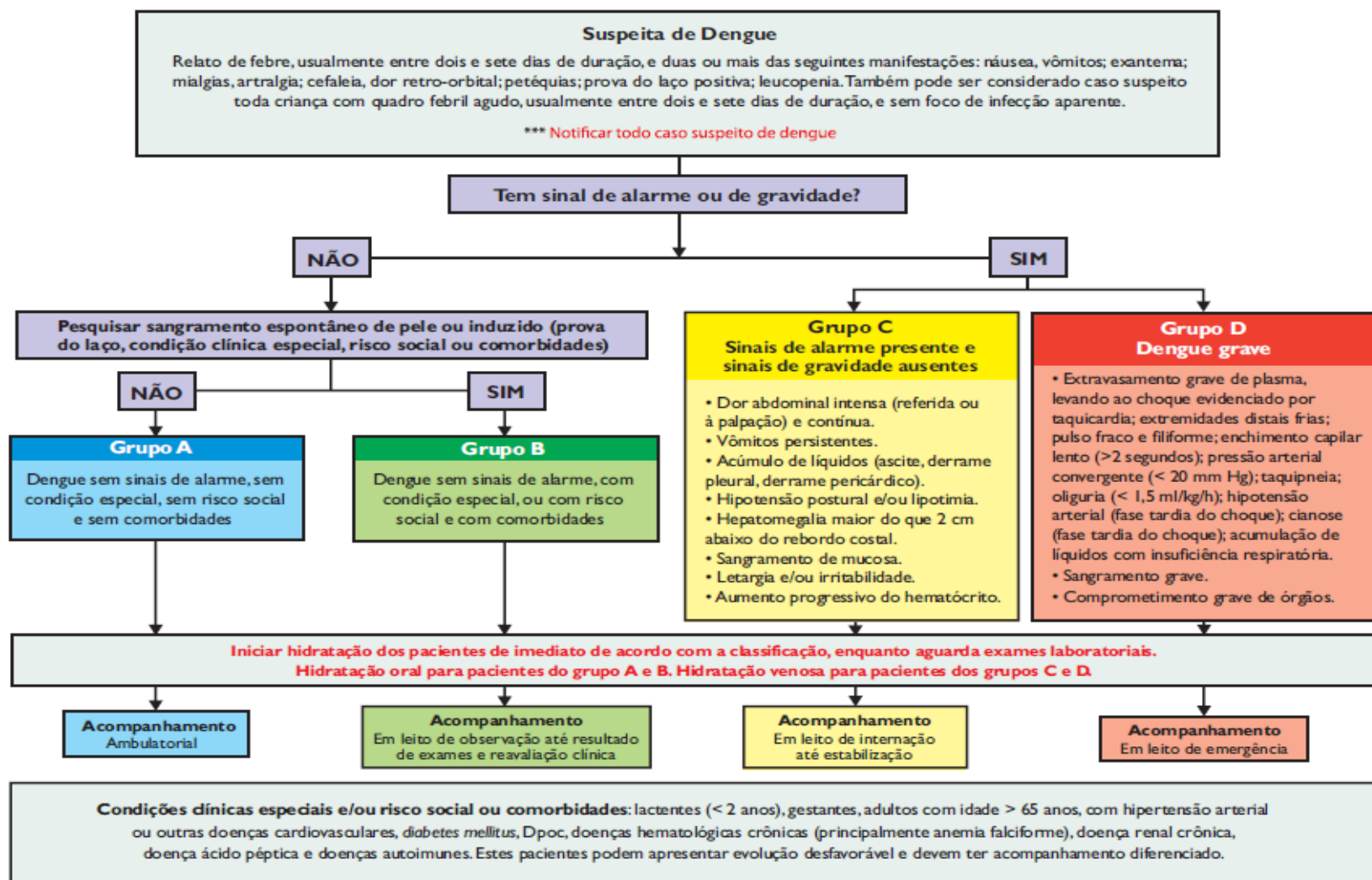
Quadro 1. Classificação de risco de acordo com os sinais e sintomas

	Azul: Grupo A – atendimento de acordo com o horário de chegada
	Verde: Grupo B – prioridade não-urgente
	Amarelo: Grupo C – urgência, atendimento o mais rápido possível
	Vermelho: Grupo D – emergência, paciente com necessidade de atendimento imediato

Fonte: Brasil, 2009

O manejo adequado dos pacientes e as medidas terapêuticas cabíveis são orientados de acordo com as classificações da doença (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma para classificação de risco de dengue



Fonte: Brasil, 2016.

1.4 Etiopatogenia

1.4.1 TRANSMISSÃO

A dengue é uma arbovirose, cujos vetores são mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes spp.* A espécie que está mais relacionada à transmissão ao homem é *A. aegypti*, principalmente por seu comportamento sinantrópico e anatrofílico. O maior período de transmissão se dá no verão e em períodos chuvosos, e principalmente em regiões tropicais e subtropicais, por conta do clima mais propício à propagação e infestação do mosquito (Natal 2002; Tauil 2002).

O ciclo de transmissão urbana do DENV é composto pelo vetor e por hospedeiros infectados e susceptíveis. Nesse ciclo as fêmeas do vetor são infectadas ao se alimentarem de indivíduos infectados pelo DENV durante o período de viremia (transmissão horizontal) ou de forma transovariana (transmissão vertical) onde a fêmea do mosquito infectada transmite o vírus à sua progênie (Martins et al. 2012). Uma vez infectado, o mosquito se torna capaz de transmitir a infecção durante todo o resto de sua vida, que dura de 6 a 8 semanas (Brasil; Ministério da Saúde. 2009). As fêmeas do vetor, que são as responsáveis pelo repasto sanguíneo, costumam se alimentar durante o dia, preferencialmente ao amanhecer e ao entardecer. O indivíduo é infectado no momento em que a fêmea infectada se alimenta de seu sangue inoculando partículas virais no mesmo (Guzman et al. 2010).

1.4.2 AGENTE ETIOLOGICO

O vírus dengue é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, reconhecido em quatro sorotipos distintos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Lindenbach et al. 2007). O vírion é uma partícula esférica com cerca de 50 nm de diâmetro, apresenta um nucleocapsídeo icosaédrico envolvido por um envelope de bicamada lipídica e genoma RNA (Mukhopadhyay et al. 2005).

O genoma de RNA consiste em uma fita simples com cerca de 10.700 nucleótidos e codifica uma poliproteína posteriormente clivada em três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM (precursora da proteína da membrana [M]) e E (envelope), e sete proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Lindenbach et al. 2007; Bäck and Lundkvist 2013). O RNA do vírus dengue tem polaridade de sentido positivo e apresenta uma única fase de leitura aberta (ORF do inglês “*open read frame*”), flanqueada por regiões terminais não traduzidas (UTR do inglês “*untranslated region*”), 5’ e 3’, ambas importantes para a tradução e replicação viral (Chambers et al. 1990; Bäck and Lundkvist 2013).

As proteínas estruturais estão envolvidas principalmente na entrada e montagem da partícula viral, enquanto as proteínas não-estruturais participam da replicação, rearranjo das membranas internas, e também montagem da partícula viral, além do recrutamento e subversão de fatores celulares que contribuem na replicação e na evasão da resposta imune. O correto processamento das proteínas estruturais e não estruturais é essencial para a replicação viral e montagem do vírion infeccioso (Lindenbach et al. 2007; Alcaraz-Estrada et al. 2010; Strottmann 2013).

A principal função da proteína C está no empacotamento do RNA, que juntos formam o nucleocapsídeo viral (Lindenbach et al. 2007). A prM dá origem a proteína

M, que é a proteína estrutural da membrana do vírus maduro, e interage com a proteína E, estabilizando a proteína do envelope (Li et al. 2008; Zheng et al. 2010). A glicoproteína E faz o papel de uma hemaglutinina viral e também é o principal componente antigênico do DENV, e distingue os sorotipos entre si. Além disso, a proteína E está envolvida no processo de replicação e maturação viral, participando da adsorção do vírus ao receptor da célula hospedeira, na entrada e na montagem da partícula viral (Zhang et al. 2004; Zheng et al. 2010).

A proteína NS1 pode ser encontrada na forma intracelular, envolvida na replicação viral, na superfície da membrana celular infectada, onde pode ser alvo de anticorpos e na forma secretada na corrente sanguínea (Alcon et al. 2002; Lindenbach et al. 2007). As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas, enquanto NS2B forma um complexo estável com NS3, as demais são proteínas transmembrana envolvidas na replicação do vírus. Já as proteínas NS3 e NS5 têm múltiplas atividades enzimáticas na replicação viral e formação do cap na extremidade 5' do genoma viral (Lindenbach et al. 2007; Teramoto et al. 2017).

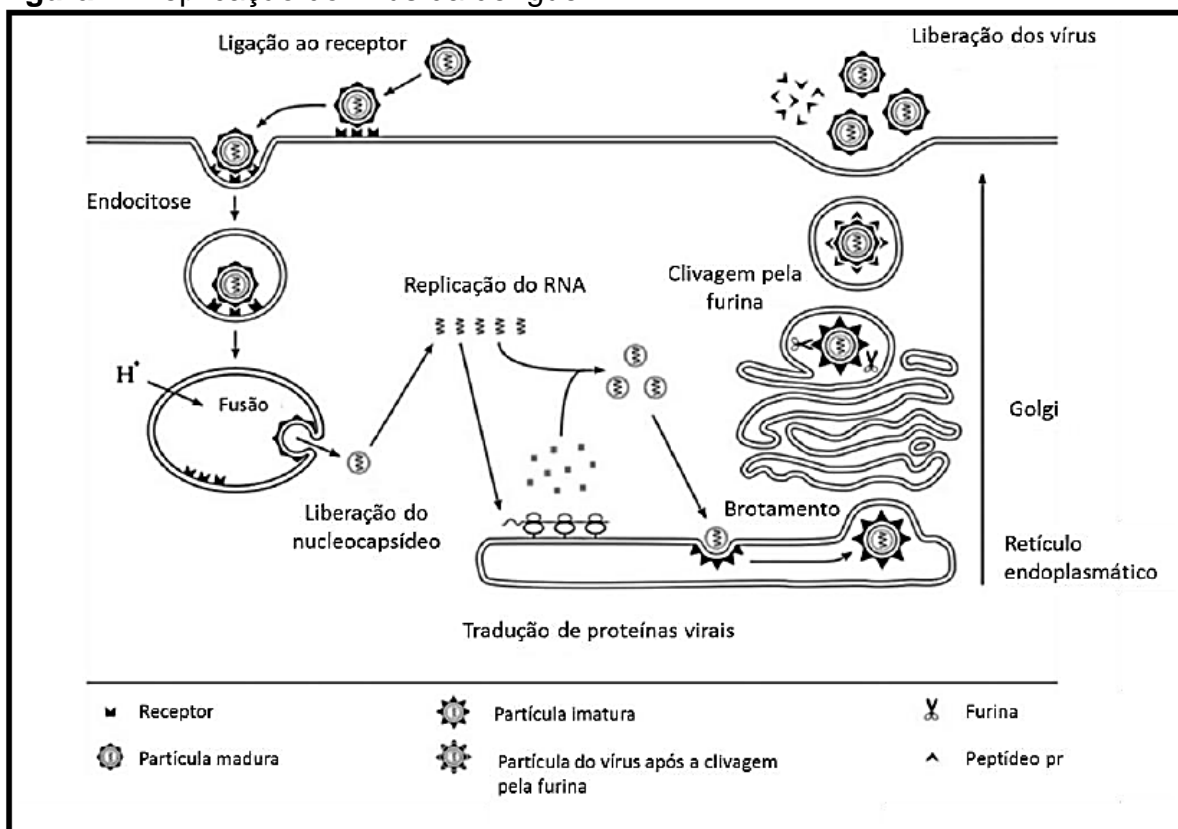
Os sorotipos do DENV compartilham cerca de 65% da sequência de nucleotídeos que compõem seus genomas, sendo, portanto, geneticamente semelhantes, porém distintos antigenicamente, principalmente por conta da diferença na sequência de aminoácidos na proteína E, que varia de 25 a 40%. Além disso, existem alterações na proteína E de genótipos que compõem o mesmo sorotipo do DENV, tanto na sequência nucleotídica quanto na sequência de aminoácidos. Diferentes *Flavivirus* estão associados geneticamente aos sorotipos do

DENV, como por exemplo, o vírus do Oeste do Nilo e o vírus da Encefalite Japonesa (Guzman et al. 2010; Azevedo 2011).

1.4.3 REPLICAÇÃO VIRAL

As células da linhagem mononuclear fagocitária são os principais alvos da replicação viral nas infecções pelo vírus dengue. Macrófagos, monócitos e células dendríticas são as células mais permissivas à infecção por DENV (Kou et al. 2008). Porém, existe uma grande variedade de células que também são permissivas, indicando que o vírus se liga em alguma molécula de superfície celular onipresente ou que ele interage com múltiplos receptores mediando a infecção (Lindenbach et al. 2007; Sousa 2015).

Figura 2. Replicação do vírus da dengue.



Fonte: Rodenhuis-Zybert et al., 2010 (Rodenhuis-Zybert et al. 2010). Adaptado.

No hospedeiro os virions se ligam à superfície de uma célula hospedeira e entram através de endocitose mediada por receptor. Em seguida, ocorre uma acidificação do endossomo, que desencadeia alterações conformacionais no vírus, fusão das membranas virais e celulares, e desmontagem da partícula viral. Quando o genoma é liberado no citoplasma, o RNA é traduzido numa única poliproteína que é processada co- e pós-tradução por proteases do vírus e do hospedeiro. A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares. A montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE) quando as proteínas estruturais e o RNA recém-sintetizado chegam no lúmen do RE. As partículas virais não-infecciosas imaturas e subvirais resultantes são transportadas através da rede trans-Golgi. As partículas virais imaturas são clivadas por proteases furinas do hospedeiro, resultando em partículas maduras e infecciosas. As partículas subvirais são também clivadas pela furina. Os virions maduros e as partículas subvirais são então liberados por exocitose (Figura 2).

O conhecimento do ciclo de replicação do vírus dengue nas células hospedeiras e as características estruturais e funcionais de suas proteínas impulsiona o estudo de diversos alvos para a ação de antivirais, seja através do desenho racional de inibidores ou mediante ensaios empíricos de “*screening*” de compostos sintéticos ou produtos naturais. Atualmente são avaliados inibidores que podem agir na entrada do vírus na célula, na replicação do RNA viral, na protease viral e na maturação das partículas virais. Por este motivo, é extremamente importante o entendimento do ciclo de replicação viral (Damonte et al. 2004).

1.4.4 RESPOSTA IMUNE

A replicação viral, na fase inicial da infecção pelo DENV, estimula uma resposta imune inata do hospedeiro humano, por meio de mecanismos antivirais mediados por interferon (IFN) α assim como por células *natural killers* (NK) (Abbas Abul K. et al. 2014). Uma resposta imune do tipo humoral é induzida ao longo da infecção, com a produção de anticorpos sorotipo específico, principalmente contra as proteínas E, prM e NS1, nesse caso indivíduos que foram infectados (infecção primária) desenvolvem uma imunidade protetora de longo prazo contra uma possível re-infecção pelo mesmo sorotipo, imunidade homóloga. Nesse período também têm-se uma imunidade protetora temporária contra os outros sorotipos, chamada de imunidade heteróloga ou cruzada, que tende a desaparecer em alguns meses. Ou seja, em uma nova infecção por DENV (infecção secundária), tem-se uma infecção por outro sorotipo (Valdés et al. 2000; Rothman 2011).

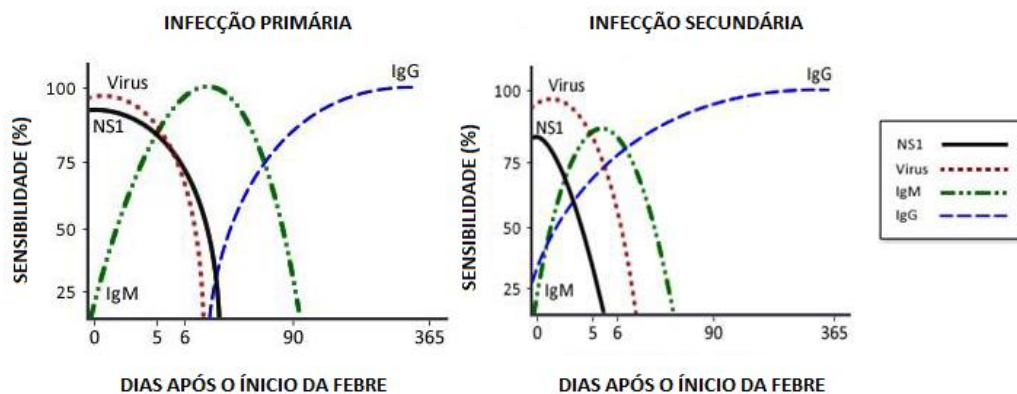
Existem estudos que comprovam que a imunidade contra o DENV, em infecções secundárias, tem o potencial de facilitar o processo de infecção nas células fagocitárias e aumentar o risco de infecções graves da doença. Essa teoria da amplificação da infecção dependente de anticorpos é denominada de efeito ADE (do inglês, “antibody dependent-enhancement”) (Guzman and Vazquez 2010; Ubol et al. 2010; Halstead 2014).

Na infecção primária há um aumento lento e gradativo dos níveis de anticorpos específicos, a imunoglobulina M (IgM) é o primeiro a aparecer no soro. Uma média de 80% de casos de dengue tem anticorpos IgM detectáveis até cinco dias após o aparecimento da doença, e cerca de 93-99% entre o sexto e o décimo dia de infecção. Já os anticorpos da imunoglobulina G (IgG) costumam ser

produzidos no final da primeira semana de doença, e permanecem detectáveis por anos e possivelmente pelo resto da vida (Chanama et al. 2004; Schilling et al. 2004; WHO 2009).

Na infecção secundária, que acomete um indivíduo que já teve uma primeira infecção por um sorotipo diferente, a concentração dos anticorpos IgG aumenta rapidamente atingindo valores elevados, enquanto a concentração dos anticorpos IgM aumentam em menor escala, alcançando um pico mais baixo que na primeira infecção (Schilling et al. 2004; Prince and Matud 2011). A cinética de vírus, anticorpos e antígenos nas infecções primária e secundária está apresentada na figura 3.

Figura 3: Cinética de vírus, anticorpos e antígenos nas infecções primária e secundária do vírus Dengue.



Fonte: CDC 2010 (CDC 2010). Adaptado.

1.5 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico preciso da dengue é um desafio, uma vez que os sinais e sintomas da doença são indiferenciados. Por isso, é essencial que o diagnóstico

laboratorial seja usado em conjunto ao clínico para a confirmação dos casos suspeitos de dengue (Ferraz et al. 2013; Muller et al. 2017).

A confirmação laboratorial de dengue como diagnóstico diferencial de outras flavivirose ou doenças exantemáticas ou hemorrágicas é relevante para um adequado manejo clínico, avaliação dos casos graves, suporte à vigilância, estudos de patogênese e pesquisa de medicamentos e vacinas. O diagnóstico laboratorial de dengue, de forma precoce e precisa, proporciona à vigilância epidemiológica e às autoridades em saúde informações úteis sobre período, localização, sorotipo circulante e gravidade da doença (Guzmán and Kourí 2004).

O diagnóstico laboratorial para confirmação de infecção pelo vírus dengue tem como alvo o próprio vírus, por isolamento viral ou detecção do genoma (RNA), componentes ou antígenos virais ou a resposta imune do hospedeiro à infecção pelo vírus (anticorpos IgM e IgG antidengue específicas) (Muller et al. 2017).

1.5.1. ISOLAMENTO VIRAL

O isolamento do vírus dengue é realizado por cultivo de amostras clínicas em linhagens celulares de mosquito (células C6/36, AP-61, Tra-284, AP64, e CLA-1) ou de mamíferos (células LLCMK2, Vero e BHK -21) (Guzman and Kouri 1996; Shu et al. 2004), seguido por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos monoclonais contra os quatro sorotipos (Henchal et al. 1983). Além da cultura celular, o isolamento pode ser feito por inoculação em cérebro de ratos recém-nascidos ou inoculação intratorácica em mosquitos vivos (Tang and Ooi 2012).

Embora a detecção de DENV por isolamento viral seja uma metodologia direta para o diagnóstico de infecção, exige habilidades técnicas, alto investimento em estrutura e um longo prazo de tempo até liberação dos resultados (Guzmán and Kourí 2004; Tang and Ooi 2012).

1.5.2. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL

Os métodos moleculares descritos para diagnóstico da infecção por DENV são a hibridação de ácidos nucleicos e reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) convencional ou em tempo real (Lanciotti et al. 1992; WHO 2009).

A técnica de hibridização com sondas detecta a presença de ácidos nucleicos virais, através de sondas, que são construídas a partir de sequências genômicas virais. Essa técnica é considerada rápida e relativamente simples, porém, menos sensível do que as técnicas de RT-PCR (Gubler 1998).

As técnicas de RT-PCR necessitam de uma previa extração e purificação do RNA viral da amostra, que pode ser feita utilizando técnicas *in house*, utilizando kits com colunas de extração ou equipamentos automatizados (Lanciotti et al. 1992; Guzman et al. 2006).

A técnica de RT-PCR convencional para o vírus dengue tem como objetivo a transcrição reversa do RNA em cDNA e amplificação de sequências genômicas específicas do DNA delimitados por *primers*, e uma posterior visualização do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose para confirmação da detecção do DNA (WHO 2009). Vários protocolos de RT-PCR foram desenvolvidos para diagnóstico da dengue (Lanciotti et al. 1992; Pao et al. 1992; Meiyu et al. 1997;

Rosario et al. 1998), nas Américas o protocolo elaborado por Lanciotti e colaboradores (Lanciotti et al. 1992) é o mais empregado.

A RT-PCR em tempo real é uma variação da técnica convencional. Assim como a convencional, a RT-PCR em tempo real promove a amplificação de sequências genômicas do DNA, porém os produtos são detectados diretamente por meio marcadores fluorescentes no equipamento de amplificação. Essa técnica traz algumas vantagens com relação à convencional, como redução do tempo necessário para a realização da análise, baixo risco de contaminação com o produto amplificado e quantificação viral por comparação com uma curva padrão, além de possibilitar a testagem de várias amostras simultaneamente (Niesters 2002; Chao et al. 2007; WHO 2009).

As técnicas moleculares apresentam como vantagem a detecção do genoma viral no início da doença, serem sensíveis, específicas e rápidas. Porém, traz algumas limitações, sendo que a principal delas é o alto investimento em infraestrutura, materiais, equipamentos e qualificação profissional (Argolo 2014; Muller et al. 2017).

1.5.3. DETECÇÃO ANTIGENOS VIRAIS (NS1Ag)

Os antígenos do vírus dengue em amostras podem ser detectados por meio da técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assays*) ou testes rápidos por imunocromatografia. A proteína viral NS1 é um dos alvos de diagnóstico laboratorial mais utilizados, por ser secretada por células infectadas e circular o sangue do indivíduo infectado em quantidades elevadas a partir do início dos sintomas (Alcon et al. 2002).

Atualmente, kits comerciais para detecção do antígeno da proteína NS1 (NS1Ag) são amplamente utilizados na fase inicial da doença, além de serem mais rápidos, práticos e acessíveis do que isolamento viral e testes moleculares. Porém em infecções secundárias, por conta de uma imunidade prévia, os anticorpos de reação cruzada tendem a se ligar as proteínas NS1 e formar imunocomplexos, o que dificulta no processo de detecção das mesmas por técnicas diagnósticas. Além disso, a sensibilidade e a especificidade destes testes podem variar consideravelmente com relação ao sorotipo infectante e ao tipo de infecção (Shu et al. 2004; Hunsperger et al. 2014; Muller et al. 2017).

1.5.4. DETECÇÃO DE ANTICORPOS

Existem vários ensaios disponíveis para o diagnóstico sorológico de dengue, os principais são: inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), soroneutralização por redução de placas (PRNT) e ELISA de captura de anticorpos IgM e IgG (Kao et al. 2005).

A inibição da hemaglutinação e a fixação do complemento foram as primeiras técnicas utilizadas para diagnóstico laboratorial de infecção por flavivírus. A técnica de IH, foi durante muitos anos o método padrão para detecção de flavivirose por apresentar alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e ter uma execução mais simples do que as demais (Kao et al. 2005).

O ensaio de PRNT *in vitro* permite detectar anticorpos neutralizantes específicos para os quatro sorotipos do vírus dengue e, é considerado o método sorológico mais específico. O princípio do teste está na ligação do vírus à células em cultivo, evidenciada pela formação de placa. Quando os anticorpos antidengue

específicos estiverem presentes no soro ou plasma, eles irão se ligar aos vírus formando complexos que impedem a infecção das células pelo vírus e conseqüentemente a formação de placas. O PRNT é uma técnica laboriosa que exige expertise técnica, além de precisar de um tempo longo para a obtenção dos resultados (Shu et al. 2003; Argolo 2014).

As técnicas de ELISA de captura de anticorpos IgM tornaram-se ensaios laboratoriais de rotina na detecção do DENV, principalmente por conta da automação destes ensaios. Anticorpos IgM antidengue costumam aparecer no começo da infecção com picos a partir do 5º dia de doença na infecção primária, podendo permanecer em níveis detectáveis por cerca de 90 dias. Os anticorpos IgG antidengue não aparecem durante a fase aguda na infecção primária, porém, durante a infecção secundária, ocorre uma resposta rápida de IgG, por conta de epítomos partilhados em várias proteínas virais entre os sorotipos do DENV, podendo ser detectada antes do 5º dia de doença. Portanto, podem ser realizados ensaios de detecção de IgM e IgG em paralelo na fase aguda da doença a fim de se obter um diagnóstico capaz de diferenciar uma infecção primária e secundária (Guzmán and Kourí 2004; Shu et al. 2004; Guzman et al. 2006) (Figura 3).

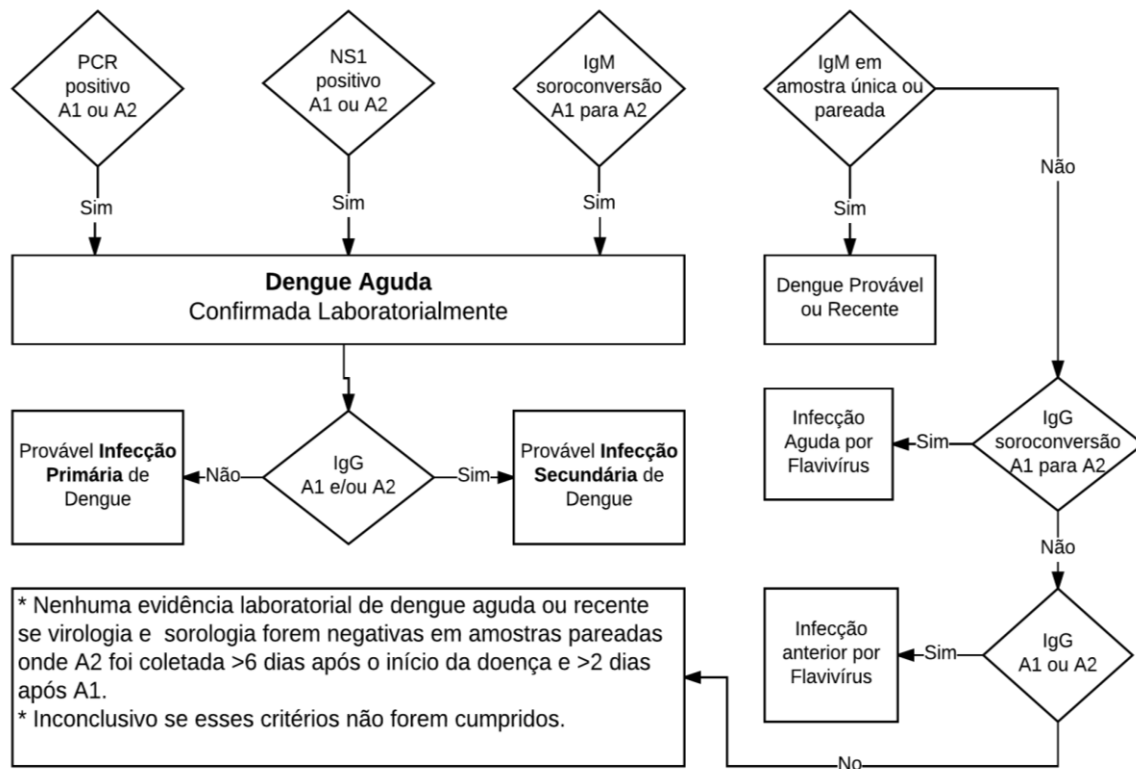
1.5.5. ALGORITMOS DIAGNOSTICOS

Algoritmo é uma sequência finita de instruções bem definidas que, aplicada a um número finito de dados, permite solucionar classes semelhantes de problemas. Nesse sentido, são realizados estudos que analisam marcadores virológicos tais como o vírus, genoma viral e a proteína NS1 secretada, juntamente com fatores do hospedeiro incluindo respostas imunes específicas contra o DENV, enzimas

hepáticas (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) e fatores hematológicos (contagem de plaquetas e hematócrito) que propõe instruções para um diagnóstico laboratorial de dengue mais eficaz (Tanner et al. 2008; Yacoub and Wills 2014; Hunsperger et al. 2016; Jaenisch et al. 2016; Tamibmaniam et al. 2016).

O algoritmo proposto por Jaenisch e colaboradores (Jaenisch et al. 2016) (Figura 4) é de confirmação para o diagnóstico de dengue, predizendo se o resultado de cada teste, tanto para amostras em fase aguda e convalescente, é capaz de diagnosticar ou descartar a infecção pelo DENV. O algoritmo indica que a positividade da PCR ou da NS1 em amostras clínicas agudas (A1) ou convalescentes (A2) confirma infecção atual de dengue. A soroconversão de IgM por ELISA (A1 para A2) confirma a infecção aguda por dengue. A presença de IgG na dengue aguda confirmada laboratorialmente indica uma provável infecção secundária de dengue. A presença de IgM numa única amostra indica uma infecção por dengue aguda ou recente. Enquanto IgM negativa com soroconversão de IgG entre A1 e A2 indica uma infecção aguda por flavivírus, a presença de IgG em A1 e A2 indica uma infecção anterior por flavivírus.

Figura 4. Algoritmo de diagnóstico para confirmação laboratorial da infecção pelo vírus da dengue.



Fonte: Jaenisch et al. (Jaenisch et al. 2016). Adaptado e traduzido pelo autor.

Hunsperger e colaboradores (Hunsperger et al. 2016) propuseram um algoritmo para escolha do melhor teste diagnóstico laboratorial baseado em períodos após o aparecimento dos sintomas da doença (Tabela 1). Foram obtidos três períodos: 0-3, 4-7 e >7 dias após o início dos sintomas. No período de 0-3 dias, chegou-se a conclusão que apenas um teste, ou RT-PCR ou NS1 seriam suficientes para o diagnóstico final de dengue. Para o período de 4-7 dias o melhor era a associação de dois testes, o teste sorológico de IgM com RT-PCR ou NS1. No terceiro período, maior do que 7 dias, apenas o teste de IgM seria suficiente para a confirmação da infecção pelo DENV.

Tabela 1. Algoritmo de teste laboratorial de amostra de paciente com suspeita de dengue, por tipo de teste e dia após o início da doença.

Dias após o início dos sintomas	IgM anti-DENV	RT-PCR ou NS1	Porcentagem Positiva	Decisão
0-3	-	+	66-91%	Um teste
4-7	+	+	75-92%	Dois testes
>7	+	-	96-100%	Um teste

Fonte: Hunsperger et al. (Hunsperger et al. 2016). Adaptado.

1.5.6. DIAGNOSTICO LABORATORIAL DE DENGUE NO BRASIL

O Ministério da Saúde do Brasil adota um protocolo de diagnóstico e manejo clínico para pacientes com suspeita de dengue (Brasil 2016). O protocolo indica alguns métodos para confirmação laboratorial: (1) sorologia pelo método de imunoenensaio enzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti-DENV imunoglobulina M (IgM), que deve ser solicitada a partir do sexto dia após o início dos sintomas; e (2) detecção do vírus e/ou antígenos virais: isolamento viral, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), detecção do antígeno da proteína não estrutural 1 (NS1) e imunohistoquímica (usado para identificar antígenos virais em fragmentos viscerais de tecido *post mortem*), solicitados até o quinto dia de início dos sintomas (se positivos confirmam o caso, se negativo, uma nova amostra para sorologia deve ser realizada).

A tabela 2 apresenta uma relação dos testes diagnósticos mais comuns para dengue com suas respectivas abordagens diagnósticas, metodologias e o tempo até o resultado.

Tabela 2. Métodos de Diagnóstico Laboratorial para a Detecção de Infecção por Dengue

	Amostra Clínica	Abordagem diagnóstica	Metodologia	Tempo até o Resultado
Detecção do vírus e produtos virais	Soro da fase aguda (até 5 dias) e tecido de necropsia	Isolamento Viral	Inoculação em cultura de células ou em mosquitos	1 semana ou mais
		Detecção de Ácidos Nucléicos	RT-PCR e RT-PCR em tempo real	1-2 dias
		Detecção de Antígenos	Teste Rápido de NS1Ag ELISA de captura de NS1Ag Imunohistoquímica ELISA	Minutos 1 dia 2-5 dias 1-2 dias
Resposta sorológica	Amostras de soro pareadas: <ul style="list-style-type: none"> • A1: Soro de fase aguda de 1-5 dias • A2: Soro de fase convalescente de 15-21 dias 	Soroconversão de IgM ou IgG (A1 para A2)	IH	1-2 dias
			PRNT	>7 dias
			MAC-ELISA	1-2 dias
	Soro depois de 5 dias de febre	Detecção de IgM	Testes rápidos de IgM	Minutos
		Detecção de IgG	IgG ELISA IH Testes rápidos de IgG	1-2 dias 1-2 dias Minutos

Abreviações: Ag: antígeno; ELISA, ensaio imunoenzimático; IH, ensaio de inibição da hemaglutinina; IgG, imunoglobulina G; IgM, imunoglobulina M; MAC, anticorpo de captura da imunoglobulina M; NS1, proteína não-estrutural 1; RT-PCR, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa.

Fonte: World Health Organization (WHO 2009). Adaptado.

O panorama mundial da dengue evidencia que a doença é endêmica em mais de 100 países da África, Américas, Leste Mediterrâneo, Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental, onde 3,9 bilhões de pessoas estão com risco de infecção pela doença (Brady et al. 2012; Noble and Shi 2012).

Estima-se que 390 milhões de infecções por dengue ocorrem todos os anos, dos quais 96 milhões se manifestam clinicamente (com qualquer gravidade da doença) (Bhatt et al. 2013). Além disso, um grande número de pessoas com sintomas clínicos de dengue não procuram serviços de saúde para tratamento, por isso acredita-se que a notificação de dengue é subestimada, e como a confirmação diagnóstica por ensaios laboratoriais nem sempre está disponível, provavelmente a prevalência da infecção pode ser diferente da registrada (WHO 2009).

Atualmente, não existe um teste diagnóstico para dengue que confirme a doença de forma rápida e precisa e acessível para os diferentes sistemas de saúde, fácil de executar e com alto desempenho, que esteja disponível (WHO 2009). Além disso, dada a cinética variável de cada marcador da dengue (Figura 3), não há disponível um teste único que possa ser utilizado para diagnosticar definitivamente o DENV em doentes em todas as fases da infecção (Muller et al. 2017).

No contexto epidemiológico atual os quatro sorotipos do vírus dengue co-circulam com outros flavivirus assim como outros agravos que apresentam sinais e sintomas semelhantes à dengue, tornando o diagnóstico clínico destas doenças um desafio. Portanto, a confirmação do agente causador da doença por testes

laboratoriais é de fundamental importância na determinação do manejo clínico adequado dos pacientes (CDC 2010; Brasil 2016).

O desempenho de testes diagnósticos de dengue tem sido avaliado em diferentes estudos (Ferraz et al. 2013; Hunsperguer et al. 2016). Testes moleculares e sorológicos foram comparados para avaliar a exatidão, diagnóstico precoce da infecção por dengue e em casos de infecção secundária (Noble, Shi 2012; Gubler 1998) objetivando determinar a porcentagem da contribuição que cada teste pode adicionar ao diagnóstico final. Estes evidenciam que os resultados podem variar dependendo do contexto geográfico, temporal e epidemiológico.

Esse estudo representa uma oportunidade de analisar o potencial de testes laboratoriais na confirmação de casos de dengue por período da infecção, aplicando um algoritmo para o diagnóstico de dengue proposto anteriormente por Hunsperger e colaboradores (2016), para avaliação do desempenho desses testes no contexto epidêmico do centro-oeste brasileiro, com uma alta cobertura de vacina contra febre amarela e antes das epidemias dos vírus chikungunya (2014) e zika virus (2015).

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de testes laboratoriais para o diagnóstico de dengue na confirmação de casos suspeitos em uma epidemia de dengue no Centro-Oeste brasileiro nos anos de 2012 e 2013.

3.2 Objetivos Específicos

- Testar o algoritmo diagnóstico para dengue, proposto previamente por Hunsperger e colaboradores (2016), baseado em períodos após o início dos sintomas da doença e positividade dos testes laboratoriais NS1Ag, IgM e RT-PCR em amostra única em um contexto de epidemia.
- Avaliar a positividade dos testes sorológicos (NS1Ag, IgM) e molecular (RT-PCR) individualmente e em associação na confirmação diagnóstica de dengue na fase aguda por dia da infecção após o início dos sintomas;
- Determinar o desempenho dos testes NS1Ag, IgM e RT-PCR quanto à sensibilidade, especificidade e acurácia.

4.1 Delineamento do estudo

Este é estudo observacional analítico que analisou uma base de dados clínicos e laboratoriais de uma coorte prospectiva de pacientes com sinais e sintomas característicos de infecção por dengue. Esses pacientes foram selecionados em três unidades de saúde e cinco hospitais, estabelecidos pela Secretaria Municipal de Saúde como referências no tratamento da dengue, de Goiânia-Goiás, região Centro-Oeste do Brasil, de janeiro de 2012 a dezembro de 2013.

4.2 População do estudo

Os pacientes da demanda espontânea das unidades de saúde de nível secundário foram triados pela equipe local com os seguintes critérios: febre por até sete dias, acompanhada de história epidemiológica compatível e pelo menos dois sinais e sintomas inespecíficos (cefaléia, prostração, dor retro-orbitaria, exantema, mialgias e artralguas), presença ou ausência de sinais de alarme (dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, hipotensão postural e/ou lipotímia, hepatomegalia dolorosa, sangramento de mucosa ou hemorragias importantes, sonolência e/ou irritabilidade, diminuição da diurese, diminuição repentina da temperatura corpórea ou hipotermia, aumento repentino do hematócrito, queda abrupta de plaquetas, desconforto respiratório), sangramento espontâneo ou induzido, presença de comorbidades, grupo de risco ou condições clínicas especiais

(menores de 2 anos de idade, gestantes, adultos com idade acima de 65 anos, com hipertensão arterial ou outras doenças cardiovasculares graves, diabetes mellitus, DPOC, doenças hematológicas crônicas - principalmente anemia falciforme e púrpuras - doença renal crônica, doença ácido péptica, hepatopatiasme, doenças auto-imunes).

Os pacientes com suspeita de dengue foram recomendados ao repouso e hidratação domiciliar ou permaneciam em observação clínica com hidratação endovenosa, por no mínimo 4 horas, conforme a rotina de atendimento estabelecida na epidemia. Os pacientes que permaneciam em observação clínica foram o alvo da pesquisa nestas unidades. Nos hospitais, todos os pacientes hospitalizados com suspeita clínica de dengue eram elegíveis para participar da pesquisa.

Em seguida, os casos elegíveis pela equipe de campo foram informados sobre os objetivos da pesquisa e procedia-se o preenchimento da ficha de notificação de dengue SINAN e de um questionário estruturado dividido em quatro partes. A primeira parte era baseada em questões sobre aspectos sócio, demográfico, econômico e antecedentes clínicos de dengue e de doenças crônicas. A segunda tinha questões sobre condições clínicas (sinais e sintomas) do início da doença até o dia da visita. A terceira, questões para avaliação física do paciente no dia da visita. E a quarta, onde eram preenchidos os dados laboratoriais inespecíficos e específicos.

Os pacientes foram bem caracterizados clínica e laboratorialmente constituindo um banco de dados no formato Access®.

4.3 Coleta de amostras

Amostras de sangue dos pacientes ambulatoriais e hospitalizados foram obtidas em diferentes momentos, por um período de até 30 dias após o aparecimento dos sintomas. Uma primeira amostra foi coletada no dia da inclusão do paciente no estudo, fase aguda da doença (≤ 7 dias de início dos sintomas). Uma segunda e terceira amostras foram obtidas no acompanhamento, durante a fase de convalescência recente aos 8-15 dias e convalescência tardia aos 20-30 dias após o início dos sintomas, respectivamente.

4.4 Algoritmo e avaliação do desempenho

O algoritmo testado foi proposto anteriormente (Hunsperger et al. 2016) e consiste na comparação da positividade de testes diagnósticos utilizados em três diferentes períodos a partir do dia do aparecimento dos sintomas, considerado como dia zero: 1º) 0-3 dias - amostras coletadas do dia zero a três, 2º) 4-7 dias - quatro a sete, e 3º) > 7 dias - a partir do oitavo dia em diante.

No presente estudo os resultados dos testes laboratoriais (pesquisa de IgM e detecção de antígeno NS1, teste molecular RT-PCR) dos pacientes foram então divididos nos três períodos mencionados.

A análise de desempenho foi realizada por comparação dos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes de RT-PCR, NS1Ag e IgM. Cada teste foi comparado com a soma dos outros dois como referência (RT-PCRxIgM+NS1Ag, IgMxRT-PCRxNS1Ag e NS1AgxRT-PCR+IgM).

Para essas análises foram estabelecidas tabelas cruzadas 2x2, de acordo com o modelo abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Modelo de tabela de desempenho de um teste diagnóstico

Teste	Referência		Total
	Reagente	Não Reagente	
Positivo	Verdadeiro Positivo (A)	Falso Positivo (B)	Total de Positivos (A+B)
Negativo	Falso Negativo (C)	Verdadeiro Negativo (D)	Total de Negativos (C+D)
Total	Total de Reagentes (A+C)	Total de Não Reagentes (B+D)	Total (A+B+C+D)

A sensibilidade de cada teste foi calculada por meio da divisão dos resultados Verdadeiros Positivos (A) pelo Total de Reagentes (A+C), desta forma a sensibilidade avalia a capacidade do teste analisado em reconhecer os resultados positivos do teste adotado como referência.

A especificidade de cada teste foi calculada por meio da divisão dos resultados Verdadeiros Negativos (D) pelo Total de Não Reagentes (B+D), desta forma a especificidade avalia a capacidade do teste analisado em reconhecer os resultados negativos do teste adotado como referência.

A acurácia de cada teste por meio da divisão da soma dos resultados Verdadeiros Positivos (A) e Verdadeiros Negativos (D) pelo Total (A+B+C+D).

4.5 Testes laboratoriais

As amostras de soro coletadas foram testadas por kits comerciais de ELISA para a pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-dengue (PanBio, Ltd, Brisbane, Australia) e de antígeno NS1 (Biorad Platelia™), e por RT-PCR (Lanciotti et al. 1992).

Para RT-PCR primeiramente foi extraído o RNA viral, pelo kit comercial QiAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA). O cDNA foi obtido por transcrição reversa à 40 °C por 60 min, com 10 µL de RNA viral e um mix contendo 10 mL do primer randômico e 50 U/µL de transcriptase reversa (Multi Scribe - High Capacity Applied Biosystems, US). A primeira amplificação do cDNA ocorreu primeiramente com uso de primers consensuais (D1 e D2) correspondentes às regiões genômicas das proteínas C e prM no termociclador Swift™ Maxi Thermal Cycler (Esco Technologies, US). Em seguida, os primers específicos semi-alinhados usaram TS1, TS2, TS3 e TS4 para detecção de cada sorotipo de DENV (Lanciotti et al. 1992). As bandas formadas foram visualizadas em gel de agarose 1,2% com auxílio do transiluminador (Major Science, US).

4.6 Critérios e definições

No presente estudo foram incluídos os pacientes com amostras coletadas e testadas simultaneamente por meio de testes moleculares e sorológicos.

Os casos de dengue foram confirmados por RT-PCR, NS1Ag e / ou IgM anti-dengue em uma única amostra. A soroconversão de anticorpos IgM foi considerada em amostras pareadas para confirmação diagnóstica.

A infecção primária foi definida como a presença de IgM anti-dengue com ausência de IgG anti-dengue em amostras coletadas durante a fase aguda ou a detecção de soroconversão IgM em amostras pareadas. A infecção secundária foi considerada pela detecção de IgG anti-dengue em amostras agudas antes do quinto dia de início dos sintomas.

Os resultados das técnicas laboratoriais foram avaliados por dia da infecção, a partir do início dos sintomas (dia zero até o dia dez após o aparecimento dos sintomas), a fim de se conhecer a positividade cada teste individualmente (RT-PCR, NS1Ag, IgM) ou em associação com os demais testes (RT-PCR+IgM, NS1Ag+RT-PCR e IgM+NS1Ag), e ainda o quanto cada teste se sobressaiu na confirmação diagnóstica isolada, isto é, com resultados negativos para os demais testes.

4.7 Análise estatística

Investigamos a combinação de diferentes tipos de variáveis (dias de sintomas de início, sexo, infecção primária ou secundária, classificação clínica, atendimento hospitalar ou ambulatorial) com resultados laboratoriais de RT-PCR, IgM e NS1Ag para definir padrões dominantes de correlação usando análise exploratória de dados (R software's development Core Team 2008). Foram realizadas estatísticas descritivas das variáveis no SPSS Statistics 17.0. Os testes Qui-quadrado e teste t foram aplicados para verificar diferenças estatísticas entre variáveis categóricas ou contínuas. As análises estatísticas de sensibilidade, especificidade e acurácia foram realizadas em <http://www.openepi.com/>.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Manuscrito

DIAGNOSTIC TESTING ALGORITHM FOR DENGUE DURING A 2012-2013 OUTBREAK, IN CENTRAL-WEST REGION, BRAZIL

Pedro H. D. Botelho¹, Maria T. F. Bara¹, Celina M. T. Martelli², Lucimeire A. da Silveira³, Isabela C. Junqueira³, Adriana de O. Guilarde³, Benigno A. M. Rocha⁴, Angela F.L. T. Argolo⁵, Anselmo E. de Oliveira⁶, Valéria C. R. Féres¹.

¹Pharmacy College, Goiás Federal University, Goiânia, Brazil.²Oswaldo Cruz Foundation, Pernambuco, Brazil.³Institute of Tropical Pathology and Public Health, Goiás Federal University, Goiânia, Brazil;⁴Goiás State University, Ceres, Brazil;⁵Central Public Health Laboratory, Dr. Giovanni Cysneiros/LACEN; Goiás, Brazil;⁶Chemistry Institute, Goiás Federal University, Goiânia, Brazil.

Keywords: Dengue Diagnosis; RT-PCR; NS1; Anti-dengue IgM ELISA, Algorithm.

Running Title: **DIAGNOSTIC TESTING ALGORITHM FOR DENGUE**

Corresponding: Pedro H. D. Botelho Pharmacy College, Goiás Federal University, Av. Universitária c/ 1ª Avenida Setor Universitário 74605-220 - Goiânia, GO - Brazil (xpedroh@gmail.com)

Alternative corresponding: Valéria C. R. Féres, Pharmacy College, Goiás Federal University, Av. Universitária c/ 1ª Avenida Setor Universitário 74605-220 - Goiânia, GO - Brazil (vcrisrezende@gmail.com)

Background. Molecular and serologic tests are used to dengue diagnosis. Performance of laboratory assays was evaluated for dengue diagnosis in patients clinical-laboratory characterized in Goiânia, Goiás, central of Brazil.

Methods. A database of patients with suspected dengue infection was analyzed according to the date collection: 0-3, 4-7, and >7 days of onset of symptoms (DOS). Serum samples were tested by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detection of IgM and IgG anti-dengue, antigen nonstructural protein 1 (NS1Ag) and viral RNA by Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Dengue infection was confirmed by positive tests. We analyzed results using SPSS Statistics 17.0, R software's, and OPENEPI.

Results. During 0-3 DOS, dengue infection was confirmed by RT-PCR (81.6%), NS1Ag (63.3%) and IgM (38%). After 4 DOS, RT-PCR and NS1Ag declined and IgM reaching 85%-93% of dengue cases. Individually, RT-PCR increase 10%-50% and IgM, 30%-60% in confirmation cases, respectively. RT-PCR and IgM tests associates confirmed 100% of dengue cases. Sensitivity of tests ranged according DOS, RT-PCR (19.4%-75.0%), NS1Ag (33.0%-58.2%) and IgM (31.7%-88.2%). Specificity of NS1Ag was better ranging 95.3%-92.9%.

Conclusions. The algorithm allowed which laboratorial test was the best for the course of disease. Until 3 DOS, molecular is most sensitive test; between 4-7 DOS, two techniques may be required to obtain an accurate diagnostic. NS1Ag test, presented less detection in secondary infection cases, however, they was more specific test and can be used in differential diagnosis of dengue. These results contributed to diagnostic decision in the epidemiological context with concomitant arbovirus circulation.

Background

Dengue is a systemic acute viral mosquito-borne disease, considered a major public health problem worldwide due to continuous viral circulation and high incidence at endemic countries. Dengue virus (DENV) is a Flavivirus, classified in four serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) [1, 2].

Approximately 2.5 billion people live in dengue endemic countries. It is estimated that around 390 million cases and 20 thousand deaths occur per year [2, 3]. However, the prevalence of dengue cases is probably higher, considering that diagnosis confirmation by laboratory assays is not always available. Also the notification of dengue cases could be underestimated, since many people do not seek health services for treatment [4].

In Brazil, more than 8.4 million of dengue cases were reported between 2000 and 2010. In this period, the disease has spread geographically and increased its incidence, clinical severity, hospitalizations and deaths [5-7]. At central region of Brazil, the epidemiological scenario of the disease is considered recent since dengue epidemics occurred 10 years after epidemics registered in regions southeast and northeast of the country [7]. The Goiania city, capital of Goias state has been the epicenter of successive and increasing epidemic peaks due to the introduction or replacement of predominant virus serotype in circulation (DENV-1, 1994; DENV-2/1, 1998; DENV-1/3, 2002; DENV-3/1, 2008; DENV-1/3, 2010 and DENV-4/1 in 2011) [8, 9]. From 2012 to 2013, occurred the major dengue outbreak and dengue incidences reached 2.233 probable dengue cases per 100.000 inhabitants [10,11].

According to Brazilian Ministry of Health the protocol of assistance of dengue suspected cases includes specific laboratory methods to confirm the infection: (i)

serology by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to detect IgM anti-DENV antibodies which should be requested after six days after the onset of symptoms (ii) virus and/or viral antigens detection by virus isolation, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), nonstructural 1 protein (NS1) antigen, requested up to the fifth days of onset of symptoms [13].

Performance diagnostic of dengue assays have been evaluated in different studies and evidenced that results vary depending of geographical, temporal and epidemiological context [13-15]. Molecular and serologic tests were compared to evaluated the accuracy, early diagnosis of dengue infection and in cases of secondary infection [16-18].

In this study, we aimed to evaluate the performance of laboratory assays for diagnosis of dengue infection in patients epidemiological and clinical-laboratory characterized, during 2012 -2013 outbreak, in Goiânia, Goiás located at central of Brazil.

METHODS

Study Design

This is a retrospective study that analyzed a database of a clinical and laboratory dengue cohort conducted during epidemics peaks from January 2012 to December 2013. Patients with clinical suspicion of dengue infection were monitored by infectious diseases physicians at reference units for dengue treatment: three basic health care units and four hospitals, in Goiânia city (1.4 million inhabitants) [19], Goiás state, central of Brazil. Laboratory tests were conducted during acute (< 7 days) and convalescent (<30 days) phases of disease. Clinical evaluation was

performed according to Brazilian Health Ministry and the disease was classified according to WHO: dengue, dengue with warning signs(DWS) and severe dengue(SD) [4, 12].

Inclusion criteria

In the current study, we selected patients who had samples collected and tested simultaneously by molecular and serological tests. Dengue cases were confirmed by RT-PCR, NS1Ag and/or IgM anti-dengue test in a single sample. In order to promote a more accuracy of IgM test, the antibodies seroconversion was considered in paired samples for diagnostic confirmation.

Dengue infection classification

Primary infection was defined as the presence of IgM anti-dengue with absence of IgG anti-dengue in samples collected during acute phase or the detection of IgM seroconversion in paired samples. Secondary infection was considered by IgG anti-dengue detection in acute samples before the fifth day of onset of symptoms.

Laboratory Diagnostics

Serum samples were prospectively tested by commercial ELISA kits for IgM and IgG anti-dengue antibodies (PanBio, Ltd, Brisbane, Australia), NS1 antigen (BioradPlatelia™), according to manufacturer's instructions. Molecular assay by Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction RT-PCR followed Lanciotti protocol [20]. The tests were carried out at the Immunology Research Laboratory of the Institute of Tropical Pathology and Public Health at Federal University of Goias.

Performance evaluation of dengue tests

Performance evaluation of dengue tests was conducted in order to determine the percentage of the contribution that each test can add into the final diagnostic. We analyzed the increase in positivity of tests individually or in association in order to determine the best test combination that improve the dengue diagnosis: RT-PCR and NS1Ag, RT-PCR and IgM or NS1Ag and IgM. This analyzes was stratified per day of the onset of symptoms and followed the protocol described by Hunsperger et al [21].

We considered as 'day zero' the first day of onset of symptoms thought patients were subdivided into three groups: (i) 0 to 3 days, (ii) 4 to 7 days, and (iii) >7 days up to the disease convalescence phase.

Sensitivity, specificity and accuracy of each diagnostic test were calculated in comparison to the reference test. We compared RT-PCR results with the sum of NS1 antigen and IgM anti-dengue results as a reference; NS1 antigen results was compared with the sum RT-PCR and IgM anti-dengue results as a reference; and similarly, IgM results test with the sum RT-PCR and NS1 antigen as reference.

Statistical Analysis

We investigated the combination of different variables (days of onset symptoms, gender, primary or secondary infection, clinical classification, hospitalized or ambulatory care) versus laboratorial results of RT-PCR, NS1Ag and IgM anti-dengue, in order to define dominant patterns of correlation using exploratory analysis on SPSS Statistics 17.0 and R software's development Core Team (2008) [22]. Chi-square test were applied in order to correlate variables considering statistical differences with $p < 0,05$ (CI 95%). Sensitivity, specificity, and accuracy analysis were carried out at <http://www.openepi.com/>.

Ethical issues

This study is part of a multi-center research in Brazil approved by Aggeu Magalhães Research Center (FIOCRUZ-PE) and local ethics committees under protocol number 24/11.

RESULTS

Among 592 patients of the study, 415 (70,1%) had dengue infection confirmation of by one of the laboratory tests carried out during the period of study. Patients presented overall age that ranged 0 to 83 years old (mean age 35.4 years), 305(51.5%) were female, 156(26.4%) were hospitalized and 436(76.6%) were outpatients recruited at basic units of health. Among 415 dengue cases, 317 (83.2%) had dengue, 34 (8.2%) dengue with warning signs and 36 (8.6%) patients had severe dengue, according WHO criteria. The four DENV serotypes were identified in our study with predominance of DENV-4 identified in 55.4% of samples followed by DENV-1 (37.6%), DENV-3 (5.4%) and DENV-2(1.7%) respectively.

Laboratory tests were conducted in a single sample collected during acute or convalescent phase. Until 4 days of illness, dengue infection was confirmed in 66.4% (158/238) of patients, presenting positivity in 81.6% (n=129) of RT-PCR, 63.3% (n=100) of NS1Ag and 38% (n=60) of IgM. Within 4-7 days of illness, the positivity of RT-PCR and NS1Ag declined to 47.1% (n=107) and 44.5% (n=101) while IgM reached 85% (n=194) confirmed cases. After 7 days, 93% (n=28) of cases was confirmed by IgM; and RT-PCR (20%, n=6) and NS1Ag (36.7%, n=11), remained detecting cases (Table 1). Figure 1A presents the positivity of the tests by days of onset symptoms showing the decline of viral RNA and NS1Ag markers and the increase in IgM antibody concentration.

The individual positivity of the tests was analyzed during the first 10 days of disease. RT-PCR alone increased 10%-50% the positivity to the other tests, until 4 days of symptoms. In addition, IgM confirmed more 30%-60% than others test, after 4 days of symptoms (Figure 2B).

The association tests (RT-PCR and IgM; RT-PCR and NS1Ag; NS1Ag and IgM) revealed that RT-PCR and IgM together confirmed almost 100% of dengue infection along 10 days of the symptoms. At these same period of disease, the association of RT-PCR and NS1Ag tests confirmed 70%-100% of dengue infection. RT-PCR and NS1Ag reached above 80% of confirmed cases until 4 days of the symptoms and gradually decayed to 40% in the confirmed cases (Figure 2C).

We conducted an analysis to access the sensitivity, specificity and accuracy of RT-PCR, NS1Ag and IgM anti-dengue tests based on the algorithm described previously. Each test was compared with the others tests in association as reference (Table 2). During the early acute phase 0-3 days of illness, the sensitivity of RT-PCR was 75% (95% CI, 67.5%–81.5%), NS1Ag was 58.2% (95%CI) and IgM test was 31.7% (95% CI, 24.5%–39.6%), respectively. The IgM test sensitivity showed an increase that reaching 77.6% (95% CI, 70.5%–83.7%) during the 4-7 days of illness and 88.2% (95% CI, 66.3%–100%) among those samples collected >7days of illness. Thought the accuracy also increases of 52.1% to 60% corresponding to the availability of these antibodies after 4 days of illness. In the same period of disease, the sensitivity of RT-PCR and NS1Ag decayed from 43,2% to 19.4% and 42.2% to 33.0%, respectively. During the period of study, NS1Ag had specificity ranging 92.9%-95.3% and the accuracy of RT-PCR and NS1Ag tests were 77.1%- 42% and 66.7%-51.1%, respectively (Table 2).

The classification of dengue infection showed that 153 (25,8%) patients had primary infection, 381 (64,4%) had secondary infection and 58 (9,8%) could not be classified. The RT-PCR and IgM anti-dengue tests showed a very similar positivity among patients regardless the type of infection (data not shown). However, a significant difference was observed in NS1Ag results among those patients with primary infection and secondary infection ($p < 0.001$) of dengue cases confirmed by others techniques (Figure 2A). Patients that had negative results to NS1Ag test were infected by any one of the four DENV serotype, which was confirmed by RT-PCR ($p = 0.454$) (Figure 2B).

DISCUSSION

During one of the largest epidemics of the disease occurred in Goias state, in 2012-2013, was reported 2,233 probable dengue cases per 100.000 inhabitants [10,11]. The epidemiological scenario in the region is marked by the recent introduction of DENV-4 (2011) leading to a co-circulation of the four dengue serotypes nowadays [6,7,24].

In this study, clinical and laboratorial databases with information of dengue patient's were analyzed. Most of patients were young adults with secondary infection and received ambulatory care. Those characteristics are compatible with pattern of dengue infection and patients assistance in Brazil [7]. The DENV-4 (55.4%) and DENV-1 (37.6%) were the prevalent serotypes during this epidemic, such as viral circulation in the country [6].

Laboratorial tests performance was analyzed according to the date of sample collection. Overall 70% of patients had dengue with laboratorial confirmation by single sample collected during acute and convalescent phase. As expected, before 4

days of illness, RT-PCR (81.6%) and NS1Ag (63.3%) tests, had a better performance in dengue diagnosis by detection of the viral components. This results were concordant with others that describe a similar positivity to NS1Ag and RT-PCR in early acute phase of dengue disease [21, 25]. Our results showed a better performances of NS1Ag test among those patients with primary infection in concordance with previous study [26]. However, 64.4% of the patients presented secondary infections and among those tested, NS1Ag showed lower sensitivity independently of the infecting serotypes (Figure 2).

Previous studies showed that during secondary infections, the sensitivity of NS1Ag test became lower due to the presence of immune complexes formed by NS1 antigen by the recent infection and anti-NS1 antibodies from the previous infection [25-29].

Our study demonstrated a prolonged detection of viral RNA and NS1 antigen over 7 days of illness. Studies have shown a prolonged viremia in severe patients with DENV-3 infection, making it possible the detection of viral particles during 10 days of disease [30, 31]. Also, viral proteins tend to be detectable for a longer period than viral RNA, since they extended in circulating for a while after the virus clearance [17,32, 33].

The association of laboratory tests used for dengue infection confirmation have been discussed by several studies due two phases on the course of dengue disease, first, with the presence of circulating virus components in the blood and second, the immune response with increasing production of antibodies to infection [15, 21]. Hunsperger et al [21] evaluated molecular and serologic tests combinations for diagnostic of dengue infection during 1–10 days after onset of symptoms. The

viral RNA, NS1Ag and IgM anti-dengue antibodies were assessed to evaluate the performance of an algorithm proposed.

In this study we have applied the same algorithm to evaluate the performance of dengue tests in an epidemic area. Our results showed that, individually, RT-PCR achieved 81% of positivity in the 0-3 days of illness, IgM technique reached 85% of positivity after 4 days of illness and the association of RT-PCR and IgM guaranteed ~100% of positivity by overlapping tests over 10 days of disease. The individual performance of those tests evaluated in this study have been already evaluated in previous studies [20,33].

The analyzes of sensitivity, specificity and accuracy of the tests showed that RT-PCR had more sensitive for dengue diagnosis in 0-3 days of onset of symptoms than the others. Between 4 and 7 days of illness, the use of two tests in association was more efficient into confirmation of dengue cases than each test by itself, seems previous study [21]. The IgM anti-dengue test was the major responsible for dengue diagnostic after 4 days of illness reaching up ~80% of sensitivity. Despite NS1Ag test had lost its sensitivity in comparison with other tests, these technique showed the higher specificity among all tests and these results indicated that the NS1Ag test could be used as a diagnostic tool to realize a differential diagnostic of a flavivirus infection.

Therefore, our group considered that the evaluation of algorithm of dengue diagnostic tests, allowed an accurate decision of which laboratorial test could be the best option for dengue laboratorial diagnosis during each time of infection. In the context of our study, patients seek clinical care during the firsts days of onset of symptoms when frequently one biological specimen could be obtained in order to

have a disease diagnostic.

This study analyzed the use of laboratorial tests algorithm, using a single serum sample, in order to confirm dengue cases and recognize DENV circulating serotypes in Goiás state, central Brazil. The epidemiological scenario of study present a high coverage of yellow fever vaccine (>95%). We highlighted that this study was conducted before chikungunya and zika virus introduction which occurred at 2014 and 2015 [34,35] respectively.

In conclusion, RT-PCR was the most sensitive test in the viremia period. The use of two methodologies in association, especially a molecular test with IgM anti-dengue test, after five days of illness, presented the best performance in order to confirm dengue cases. These results may contribute to a better diagnostic decision in the current epidemiological context of concomitant arboviruses co-circulation.

Notes

Acknowledgments. We thank the collaboration of the State Health Department, the Municipal Health Department of Goiania, especially Flúvia Amorim and the group of researchers and students who worked on the project execution. We thank FAPEG officials for their support in the financial management of the project.

Funding. This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Foundation of Support Research of the state of Goiás (FAPEG) [Pronex Rede-Dengue number 73/2009, 201210267000729].

Potential conflicts of interes. All authors: No potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* 2012; 366:1423–1432.
2. Lindenbach B, Thiel H, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Theirs Replication*. 5th ed. 2007.
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496:504–507.
4. WHO. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*. Geneva: 2009.
5. PAOH. *Dengue: PAOH/WHO Data, Maps and Statistics. Annual Cases Reported of Dengue. 2014: Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country*. 2015.
6. Siqueira Jr. JB, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:48–53.
7. Teixeira MG, Siqueira Jr. JB, Ferreira GL, Bricks L, Joint G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7:e2520.
8. Argolo AFLT, Feres VCR, Cordeiro MT, et al. High frequency of pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Central Brazil. *BMC Infect Dis* 2016; 16:546.
9. Feres VC, Martelli CM, Turchi MD, et al. Laboratory surveillance of dengue virus

- in Central Brazil, 1994-2003. *J Clin Virol* 2006; 37:179–183.
10. Goiás. Boletim Semanal de Dengue - Goiás 2013. Volume 50. 2014.
 11. Goiás. Boletim Semanal De Dengue - Goiás 2014: Semana Epidemiológica 1 a 53 (14/12/2013 a 03/01/2015). Volume 52. 2015.
 12. Brazil. Dengue : diagnóstico e manejo clínico : adulto e criança. 5th ed. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2016.
 13. Blacksell SD, Jarman RG, Gibbons R V., et al. Comparison of Seven Commercial Antigen and Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Acute Dengue Infection. *Clinical and Vaccine Immunology* 2012; 19:804–810.
 14. Felix AC, Romano CM, De Campos Centrone C, et al. Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clinical and Vaccine Immunology* 2012; 19:1972–1976.
 15. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS neglected tropical diseases* 2010; 4.
 16. Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:S30-8.
 17. Huhtamo E, Hasu E, Uzcategui NY, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *The Journal Clinical Virology* 2010; 47:49–53.

18. Dussart P, Petit L, Labeau B, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2:e280.
19. IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics. *Cidades*. Goiania. 2017. Available at:
<http://www.cidades.ibge.gov.br/v3/cidades/municipio/5208707>.
20. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam A V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:545–551.
21. Hunsperger EA, Munoz-Jordan J, Beltran M, et al. Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm. *J Infect Dis* 2016; 214:836–844.
22. R Development Core Team RFFSC. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna Austria R Foundation for Statistical Computing. 2008; 1:ISBN 3-900051-07-0.
23. Rocha BAM. *Aspectos clínicos e moleculares da dengue na epidemia de 2012/2013 em Goiânia – GO, Brasil*. 2015;
24. Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* [Internet]. 2011 [cited 2014 Jul 17];17:938–40.
25. Sea VRF, Cruz ACR, Gurgel RQ, et al. Underreporting of Dengue-4 in Brazil Due to Low Sensitivity of the NS1 Ag Test in Routine Control Programs. *PLoS*

ONE 2013; 8.

26. Ferraz FO, Bomfim MR, Totola AH, et al. Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. *The Journal Clinical Virology* 2013; 58:41–46.
27. Kosasih H, Alisjahbana B, Widjaja S, et al. The diagnostic and prognostic value of dengue non-structural 1 antigen detection in a hyper-endemic region in Indonesia. *PloS one* 2013; 8:e80891.
28. Lima, MR, Nogueira, RMR, Fillipis, AMB, Nunes, PCG, Sousa, CS, Silva, MH, et al. A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. *Journal of Virological Methods*. 2014 ago; 204:105-108.
29. Hang, VT, Nguyet, NM, Trung, DO, Tricou, V, Yoksan, S, Dung, NM, et al. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Severity, Specificity and Relationships to Viraemia and Antibody Responses. *PLOS Neglected Tropical Diseasee*. 2009 jan; 3(1):1-7.
30. Wang W-K, Chen H-L, Yang C-F, et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:1023–1030.
31. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *The Journal of infectious diseases* 2008; 197:817–24.
32. Shu P-Y, Chen L-K, Chang S-F, et al. Comparison of capture immunoglobulin M

(IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2003; 10:622–30.

33. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of clinical microbiology* 2002; 40:376–381.
34. Cardoso, C. W., et al. Outbreak of Exanthematous illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Virus, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 2015;21.
35. Zanoluca C, de Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015, 110 (4):569-72.

Table 1. Positivity of dengue diagnostics tests according days of symptoms.

Period, days	RT-PCR n(%)	NS1Ag n (%)	IgM n (%)	Positive/Tested (%)
0-3	129 (81.6)	100 (63.3)	60 (38.0)	158/238 (66.4)
4 - 7	107 (47.1)	101 (44.5)	194 (85.5)	227/312 (82.4)
>7	6 (20.0)	11 (36.7)	28 (93.3)	30/42 (71.4)
Total	242 (58.3)	212 (51.1)	282 (68.8)	415/592 (70.1)

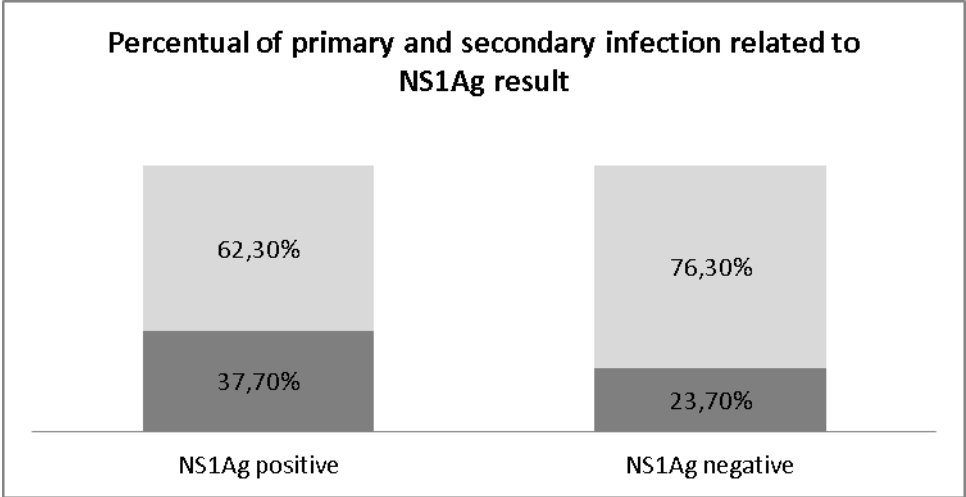
Table 2. Evaluation of performance of dengue tests as sensitivity, specificity and diagnostic accuracy of RT-PCR, NS1Ag ELISA, IgM ELISA compared to association by the algorithm testing.

Period	Test	Test/ Tests Associated as Reference		
		RT-PCR/IgM&NS1	NS1/RT-PCR&IgM	IgM/RT-PCR&NS1
days	Performance	(%)	(%)	(%)
0 - 3	Sensitivity	75.0	58.2	31.7
	Specificity	80.4	95.3	82.5
	Accuracy	77.1	66.7	52.1
4-7	Sensitivity	43.2	42.2	77.6
	Specificity	87.4	94.4	51.8
	Accuracy	56.5	56.8	64.2
>7	Sensitivity	19.4	33.3	88.2
	Specificity	92.9	92.9	44.8
	Accuracy	42.2	51.1	60.0

*In bold those presented values statistically significant considering a 95% of confidence intervals ($p < 0,05$).

Figure 1: NS1Ag test results related to: A. primary and secondary (p< 0,001); and B. DENV serotypes (p=0.454).

A



B

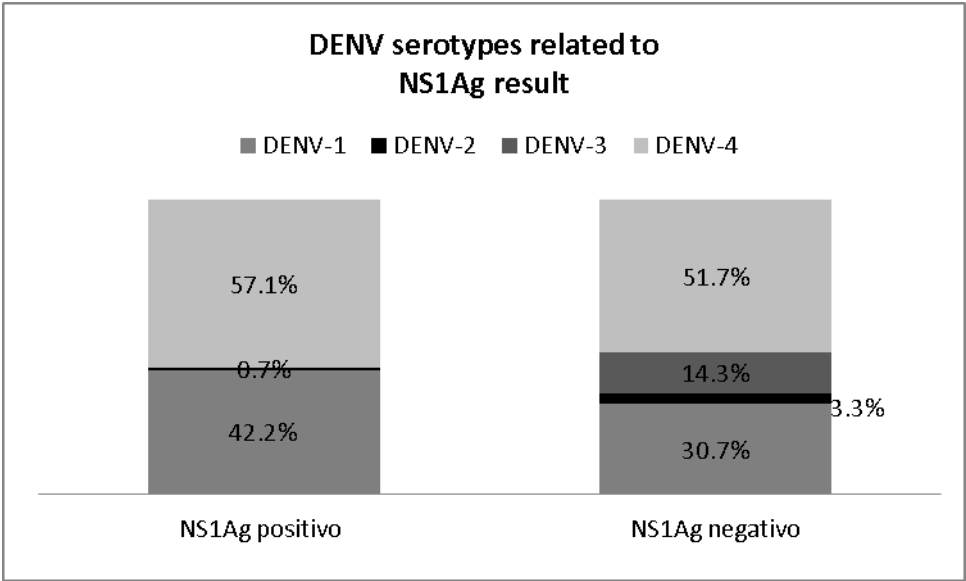
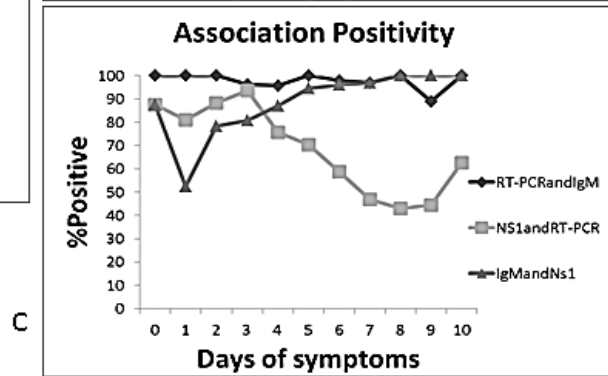
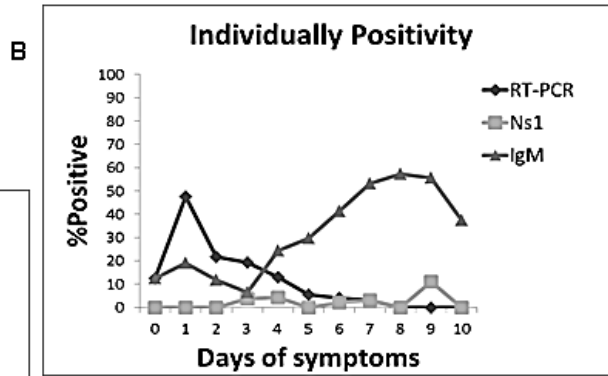
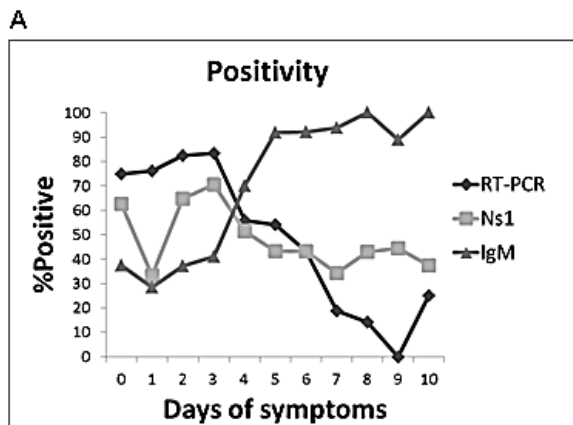


Figure 2. A. Positivity of dengue laboratory tests by days of onset of symptoms; B. Individual positivity of dengue laboratory tests by days of onset of symptoms; C. Positivity results by association of dengue laboratory tests by days of onset of symptoms.



6 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou uma avaliação do desempenho de testes laboratoriais na confirmação de casos suspeitos de dengue provindos de um estudo de coorte realizado na cidade de Goiânia, Brasil, durante uma epidemia de dengue no Centro-oeste brasileiro nos anos de 2012 e 2013, por meio da aplicação de um algoritmo preditivo para o diagnóstico de dengue proposto anteriormente por Hunsperguer e colaboradores (Hunsperguer et al. 2016).

O algoritmo aplicado baseou-se em três períodos na infecção (0-3, 4-7 e >7 dias após o início dos sintomas) e nos testes de RT-PCR, NS1Ag e IgM. Diferente do modelo em que foi proposto, o algoritmo foi aplicado considerando a oportunidade de confirmação de dengue em apenas uma única amostra para cada paciente. Nesse contexto, teste de RT-PCR e NS1 obtiveram melhor desempenho no primeiro período da infecção (0-3 dias), com positividade e especificidade acima de 60% e 80%, respectivamente para ambos. A detecção de IgM obteve resultados de positividade e sensibilidade superiores à 70% a partir do segundo período (4-7 dias), mas com melhores resultados no último período (>7 dias).

A positividade individual dos testes mostrou que RT-PCR e IgM são testes revelantes para a confirmação laboratorial de dengue no início e no final da fase aguda da infecção, respectivamente. NS1 obteve resultados de positividade individual nulos em praticamente todos os dias da fase aguda da infecção, uma vez que a realização de IgM e RT-PCR simultaneamente é capaz de confirmar todas as amostras positivas por NS1. A associação do teste de IgM com NS1Ag ou RT-PCR

foram semelhantes e reconheceram praticamente todos os casos de dengue ao longo dos 10 primeiros dias de doença, enquanto a associação de RT-PCR e NS1, que são testes mais utilizados na fase aguda da doença, obteve valores inferiores à 70% a partir do dia 4.

Mediante as vantagens do teste NS1Ag, de ser um teste de mais fácil execução e com resultados obtidos de forma mais rápida, e as desvantagens de RT-PCR, por ser um teste que demanda conhecimento técnico, aparelhos adequados e é de custo elevado, o teste de NS1Ag é mais disponível à realidade dos sistemas de saúde brasileiros. Portanto, com base nos resultados deste estudo, tem-se que o teste de NS1Ag para a confirmação diagnóstica de dengue apresenta resultados satisfatórios de positividade e desempenho na fase aguda de infecção para aplicação na rotina dos sistemas de saúde. Esses achados também mostraram que no cenário de epidemia de dengue e com a oportunidade de diagnóstico laboratorial em uma única amostra, o algoritmo pode ser aplicado de forma satisfatória, que propõe a realização de apenas um teste (RT-PCR ou NS1Ag) no período de 0-3 dias de doença, dois testes entre os dias 4 e 7 (IgM e RT-PCR ou NS1Ag) e um teste (IgM) no período acima de 7 dias após o início dos sintomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas Abul K., Lichtman; AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Vol. 8a ed., Elsevier. 2014.

Alcaraz-Estrada SL, Yocupicio-Monroy M, del Angel RM. Insights into dengue virus genome replication. *Future Virology*. 2010;5(5):575–92.

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Feb;40(2):376–81.

Argolo AFLT, Feres VCR, Cordeiro MT, Silveira LA, Guilarde AO, Marques Jr. ET, et al. High frequency of pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Central Brazil. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):546.

Argolo AFLT, Feres VCR, Silveira LA, Oliveira A, Pereira L, Siqueira-Junior J, et al. Prevalence and incidence of dengue virus and antibody placental transfer during late pregnancy in central Brazil. *BMC Infect Dis*. 2013;13:254.

Argolo AFLT. Circulação dos vírus dengue no Estado de Goiás: vigilância laboratorial (1994-2013) e perfil de anticorpos neutralizantes sorotipo específico durante o surto de 2013 em Goiânia. Tese (Doutorado). Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás; 2014.

Azevedo AS. Desenvolvimento de vacinas de DNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína do envelope viral. Tese (Doutorado). Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz; 2011.

Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infection ecology & epidemiology*. 2013;3:1–21.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013/04/09. 2013;496(7446):504–7.

Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(8).

Brasil. Dengue : diagnóstico e manejo clínico : adulto e criança. 5th ed. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis; 2016.

Brasil; Ministério da Saúde. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. 2009. p. 162. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_contr_ole_dengue.pdf

Brasil; Ministério da Saúde. Dengue: diagnóstico e manejo clínico. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde; 2002.

Brasil; Secretaria da Saúde do Estado de Goiás (SES-GO)/Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Casos de Dengue, Óbitos por Febre Hemorrágica da Dengue, Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas [Internet]. 2014 [cited 2016 Feb 3]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>

Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016 [Internet]. Ministério da Saúde. 2017. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>

Carneiro AR, Cruz ACR, Vallinoto M, de Vasconcelos Melo D, Ramos RTJ, Medeiros DBA, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Memorias do Instituto*

Oswaldo Cruz. 2012;107(6):805–12.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Guidance and Diagnostic Testing. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). USA [Internet]. 2010. Available from: <http://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology*. 1990;44:649–88.

Chanama S, Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Sa-Gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: Levels and positive rates in comparison with primary infections. *Journal of Clinical Virology*. 2004;31(3):185–9.

Chao D-YY, Davis BS, Chang G-JJJ. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):584–9.

Damonte EB, Pujol CA, Coto CE. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Advances in Virus Research*. 2004;63:239–85.

Feres VC, Martelli CM, Turchi MD, Junior JB, Nogueira RM, Rocha BA, et al. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. *J Clin Virol*. 2006;37(3):179–83.

Ferraz FO, Bomfim MR, Totola AH, Avila T V, Cisalpino D, Pessanha JE, et al. Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. *The Journal Clinical Virology*. 2013;58(1):41–6.

Goiás. Boletim Semanal De Dengue - Goiás 2014: Semana Epidemiológica 1 a 53 (14/12/2013 a 03/01/2015). Volume 52. 2015.

Goiás. Boletim Semanal de Dengue - Goiás 2013. Volume 50. 2014.

Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:480–96.

Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira Jr. JB, Feres VC, Rocha B, Levi JE, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis*. 2008 Mar;197(0022–1899 (Print)):817–24.

Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1996 Nov;3(6):621–7.

Guzman MG, Rosario D, Kouri G. Diagnosis of dengue virus infection. In: *Molecular Biology of the flaviviruses*. 2006. p. 191–223.

Guzman MG, Perez AB, Fuentes O, Kouri G. International Encyclopedia of Public Health. Dengue, Dengue Hemorrhagic Fever in: *International Encyclopedia of Public Health*. 2008.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(12):S7–16.

Guzmán MG, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. Vol. 8, *International Journal of Infectious Diseases*. 2004. p. 69–80.

Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*. 2010;2(12):2649–62.

Halstead SB. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiology Spectrum*. 2014;2(6):1–18.

Hammon WM, Rudnick A, Sather G, Rogers KD, Morse LJ. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1960;73:140–55.

Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(1):164–9.

Hotta S, Kimura R. Experimental studies on dengue 1. Isolation identification and modification of the virus. *The Journal of Infectious Diseases*. 1952;90:1–9.

Huhtamo E, Hasu E, Uzcategui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *The Journal Clinical Virology*. 2010;47(1):49–53.

Hunsperger EA, Munoz-Jordan J, Beltran M, Colon C, Carrion J, Vazquez J, et al. Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm. *J Infect Dis*. 2016/03/18. 2016;214(6):836–44.

Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of Commercially Available Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus NS1 Antigen and Anti-Dengue Virus IgM Antibody. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(10).

IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics. Cidades. Goiania [Internet]. 2017. Available from: <http://www.cidades.ibge.gov.br/v3/cidades/municipio/5208707>

Jaenisch T, Tam DTH, Kieu NTT, Van Ngoc T, Nam NT, Van Kinh N, et al. Clinical evaluation of dengue and identification of risk factors for severe disease: protocol for a multicentre study in 8 countries. *BMC infectious diseases*. 2016;16(1):120.

Kao C-L, King C-C, Chao D-Y, Wu H-L, Chang G-JJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2005;38(1):5–16.

Kimura R, Hotta S. Studies on dengue: anti-dengue active immunization experiments in mice. *Japanese Journal of Bacteriology*. 1944;1:96–9.

Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WWSI, Rose RC, Schlesinger JJ, et al. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medical Virology*. 2008;80(1):134–46.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam A V. Rapid detection

and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(3):545–51.

Li long, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science (New York, NY).* 2008;319(5871):1830–4.

Lindenbach BD, Thiel H, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Theirs Replication.* 5th ed. Vol. 2, *Fields Virology.* 2007.

Maciel IJ, Siqueira Junior JB, Martelli CMT. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. *Aceito.* 2008;37(2):111–30.

Martins VEP, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, de Simone SG, Dutra RF, et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS ONE.* 2012;7(7).

Meiyu F, Huosheng C, Cuihua C, Xiaodong T, Lianhua J, Yifei P, et al. Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. *Microbiology and immunology.* 1997;41(3):209–13.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews Microbiology.* 2005;3(1):13–22.

Muller DA, Depelseñaire ACI, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of infectious diseases.* 2017 Mar;215(suppl_2):S89–95.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India.* 2015;71(1):67–70.

Natal D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico.* 2002;64(2):205–7.

Niesters HG. Clinical virology in real time. *Journal of Clinical Virology.* 2002;25 Suppl 3:S3-12.

Noble CG, Shi PY. Structural biology of dengue virus enzymes: Towards rational design of therapeutics. Vol. 96, Antiviral Research. 2012. p. 115–26.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB de, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2001;96(October):925–6.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Vol. 85, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. scielo; 1990. p. 253.

Normile D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. Science. 2013;342(October):2013.

Osanaí CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota prévia. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1983;25(1):53–4.

PAHO. Dengue: PAHO/WHO Data, Maps and Statistics. Annual Cases Reported of Dengue. 2014: Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country [Internet]. Vol. 2017. 2015. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734

PAHO. Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016 [Internet]. Portal da Saúde; 2016. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>

PAHO. Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country: Deaths (SD/D)x100 CFR. 2017. Available from: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=37782&lang=pt

PAHO/WHO. Novo Protocolo do Brasil para manejo clínico dos pacientes com dengue segue classificação atual da Organização Mundial da Saúde. 2016.

Pao CC, Yao DS, Lin CY, King CC. Amplification of viral RNA for the detection of

dengue types 1 and 2 virus. *The Journal of infection*. 1992;24:23–9.

Pimentel AP. O dengue em Nictheroy. *Brazil-Medico*. 1923;1(13):174–7.

Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World health statistics quarterly Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*. 1997;50(3–4):161–9.

Pinheiro F, Nelson M. Re-Emergence of Dengue and Emergence of Dengue Haemorrhagic Fever in the Americas. *Dengue Bulletin*. 1997;21:1–6.

Prince HE, Matud JL. Estimation of dengue virus IgM persistence using regression analysis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011;18(12):2183–5.

R Development Core Team RFFSC. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vol. 1, Vienna Austria R Foundation for Statistical Computing. 2008. p. ISBN 3-900051-07-0.

Rocco IM, Kavakama BB, Santos CLS. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2001;43(1):55–7.

Rocha BAM. Aspectos clínicos e moleculares da dengue na epidemia de 2012/2013 em Goiânia – GO, Brasil. Tese (Doutorado). Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás; 2015.

Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. Vol. 67, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010. p. 2773–86.

Rosario D, Alvarez M, Diaz J, Contreras R, Rodriguez R, Vazquez S, et al. Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue viruses in clinical samples. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*. 1998;4:1–5.

Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):532–43.

Sabin AB, Schlesinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*. 1945;101(2634):640–2.

Sabin AB. Research on dengue during World War II. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1952;1(1):30–50.

Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AMB, Faria NR, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology journal*. 2011;8:387.

Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT da. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1986;81(2):245–6.

Schilling S, Ludolfs D, Van An L, Schmitz H. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *Journal of Clinical Virology*. 2004;31(3):179–84.

Shu PY, Chen LK, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Chin C, et al. Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(6):2489–94.

Shu P-Y, Chen L-K, Chang S-F, Yueh Y-Y, Chow L, Chien L-J, et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(4):622–30.

Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B, Nguyen van VC, Wills B. Dengue. *The New England journal of medicine*. 2012;366(15):1423–32.

Siqueira Junior. JB, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(1):48–53.

Siqueira Junior JB, Martelli CMT, Maciel IJ, Oliveira RM, Ribeiro MG, Amorim FP, et al. Household survey of dengue infection in central Brazil: Spatial point pattern analysis and risk factors assessment. *American Journal of Tropical Medicine and*

Hygiene. 2004;71(5):646–51.

Sousa DMC. Epidemiologia E Caracterização Molecular Dos Vírus Dengue Circulantes No Rio Grande Do Norte, 2013-2014. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2015.

Strottmann DM. Vírus da dengue: novas abordagens para o estudo da neuropatogênese. Tese (Doutorado). Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/Pr. Universidade Federal do Paraná; 2013.

Tamibmaniam J, Hussin N, Cheah WK, Ng KS, Muninathan P. Proposal of a Clinical Decision Tree Algorithm Using Factors Associated with Severe Dengue Infection. PloS one. 2016;11(8):e0161696.

Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10(8):895–907.

Tanner L, Schreiber M, Low JGH, Ong A, Tolfvenstam T, Lai YL, et al. Decision tree algorithms predict the diagnosis and outcome of dengue fever in the early phase of illness. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2008;2(3).

Tauil PL. Critical aspects of dengue control in Brazil. Cadernos de Saúde Pública. 2002;18(3):867–71.

Teixeira MG, Siqueira Jr. JB, Ferreira GL, Bricks L, Joint G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(12):e2520.

Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerg Infect Dis. 2011;17(5):938–40.

Teramoto T, Balasubramanian A, Choi KH, Padmanabhan R. Serotype-specific interactions among functional domains of Dengue virus 2 non-structural proteins (NS) 5 and NS3 are crucial for viral RNA replication. The Journal of biological chemistry. 2017 Apr;

Ubol S, Phuklia W, Kalayanarooj S, Modhiran N. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201(6):923–35.

Valdés K, Alvarez M, Pupo M, Vázquez S, Rodríguez R, Guzmán MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2000;7(5):856–7.

WHO. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*. In Geneva; 2009.

WHO. *Global strategy for dengue prevention and control, 2012-2020*. 2012. Report No.: 1.

Yacoub S, Wills B. Predicting outcome from dengue. *BMC medicine*. 2014;12(1):147.

Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*. 2004;12(9):1607–18.

Zheng A, Umashankar M, Kielian M. In Vitro and In vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. *PLoS Pathogens*. 2010;6(10).