

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo das características clínicas e laboratoriais da infecção
pelo vírus da dengue em crianças atendidas em uma unidade
de saúde no município de Ribeirão Preto, São Paulo**

Telma Regina Ramos Silva Poloni

**Ribeirão Preto
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo das características clínicas e laboratoriais da infecção
pelo vírus da dengue em crianças atendidas em uma unidade
de saúde no município de Ribeirão Preto, São Paulo**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biociências aplicadas à Farmácia
para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientador: Prof. D. Victor Hugo Aquino Quintana
Coorientadora: Prof Dr^a Aparecida Yulie Yamamoto

Versão corrigida da Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências aplicadas à Farmácia em 23/08/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Poloni, Telma Regina Ramos Silva

Estudo das características clínicas e laboratoriais da infecção pelo vírus da dengue em crianças atendidas em uma unidade de saúde no município de Ribeirão Preto, São Paulo

78p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Aquino, Victor Hugo
Coorientadora: Yamamoto, Aparecida Yulie

1. Dengue. 2. Crianças. 3. Diagnóstico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Telma Regina Ramos Silva Poloni

Estudo das características clínicas e laboratoriais da infecção pelo vírus da dengue em crianças atendidas em uma unidade de saúde no município de Ribeirão Preto, São Paulo

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. D. Victor Hugo Aquino Quintana
Coorientadora: Prof Dr^a Aparecida Yulie Yamamoto

Aprovado em :

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais uma oportunidade de realização profissional.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana por sua orientação neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia (INTC) em Dengue pelo suporte financeiro.

Aos pacientes, seus pais e responsáveis que voluntariamente participaram deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Aos funcionários do Centro de Saúde Escola Ipiranga, Rafael, Danusa e Max.

Aos colegas de laboratório Amanda Cristina Trabuco, Aline Carolina da Costa Lemos, Alberto Anastacio Amarilla, Adriana Moreira Soares, Anibal Silva de Oliveira, Nilton Nascimento dos Santos Jr, Fábio Pio Dornas, Raquel Rinaldi Russo, Helda Liz Alfonso Castro, Vanessa Danielle Menjon Müller, Mohd Jaseem Khan, Veridiana Ester Dias de Barros Luiz, Harryson Wings Godoy, Larissa Ribeiro Galvão, Denise Gonçalves, Sabrina Trigueiro, Flávia Tremeschin de Almeida. Sem vocês este trabalho não teria sido possível.

RESUMO

POLONI, T. R. R. S. **Estudo das características clínicas e laboratoriais da infecção pelo vírus da dengue em crianças atendidas em uma unidade de saúde no município de Ribeirão Preto, São Paulo.** 2013. 78p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A dengue é uma doença infecciosa transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. O vírus da dengue (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, é atualmente um importante problema de saúde pública em todo o mundo. São reconhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, -2, -3 e -4). A infecção por qualquer um dos sorotipos cursa de forma assintomática ou com quadro clínico que varia desde uma febre indiferenciada e autolimitada, passando pela febre clássica da dengue (FD) até quadros graves de febre hemorrágica da dengue (DHF). O diagnóstico clínico é difícil de ser realizado principalmente na faixa etária pediátrica em que os sintomas são muito similares aos de outras infecções febris agudas, ficando a cargo do laboratório o diagnóstico confirmatório. Este estudo descritivo do tipo série de casos teve como objetivo analisar as características clínicas e laboratoriais da dengue em pacientes pediátricos. A população de estudo foi constituída por 110 crianças com idade média de $9,3 \pm 3,7$ anos recrutadas em uma unidade de saúde no município de Ribeirão Preto, São Paulo. Amostras de sangue, saliva e urina foram coletadas das crianças 1-14 dias após o início do quadro clínico. Os sinais e sintomas mais frequentes foram a febre (105/110, 95%), seguida de cefaleia (66/110, 60%), mialgia (49/110, 45%), vômitos (27/110, 25%) e exantema (16/110, 15%). A infecção pelo vírus da dengue foi confirmada laboratorialmente em 96 crianças, as quais apresentavam sinais e sintomas compatíveis com a classificação de caso suspeito de dengue de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde. A análise clínica inicial falhou em classificar como caso suspeito de dengue 46% das crianças. A carga viral foi significativamente maior no soro quando comparado àquela observada em saliva e urina, mas ainda assim estas amostras podem ser utilizadas como alternativa para diagnóstico da doença. O sequenciamento nucleotídico da região codificadora da proteína NS5 mostrou a circulação de DENV-3, principalmente durante o ano de 2010, e de DENV-1 e DENV-2, predominantemente no ano de 2011 na população do estudo. Houve predomínio de infecções primárias com quadro clínico leve sem complicações.

Palavras-chave: dengue, criança, diagnóstico, saliva, urina.

ABSTRACT

POLONI, T. R. R. S. **Study of the clinical and laboratory features of dengue virus infection in children attended at a health care center in the city of Ribeirao Preto, Sao Paulo.** 2013. 78p. Thesis (doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Dengue is an infectious disease transmitted by the biting of mosquitoes of *Aedes* genus. Dengue virus (DENV), belonging to the *Flavivirus* genus, *Flaviviridae* family, is an important public health problem worldwide. Four antigenically distinct viruses are recognized (DENV-1, -2, -3, e -4). Infection with any of the virus serotypes causes a spectrum of clinical manifestations ranging from inapparent or mild viral syndrome to classic dengue fever (DF) and severe hemorrhagic disease (DHF). The clinical diagnosis of dengue is difficult, especially in children because the symptoms are very similar to those observed in other febrile illness; thus, the confirmatory diagnosis is carried out by laboratory tests. This descriptive study aimed to analyze the clinical and laboratory features of dengue in pediatric patients. The study population consisted of 110 children; mean age 9.3 ± 3.7 years enrolled in a health center in Ribeirao Preto, Sao Paulo. Samples of blood, saliva and urine were collected from children 1-14 days after the onset of symptoms. The most common signs and symptoms were fever (105/110, 95%), followed by headache (66/110, 60%), myalgia (49/110, 45%), vomiting (27/110, 25%) and rash (16/110, 15%). Dengue virus infection was confirmed by laboratory tests in 96 children whom presented signs and symptoms compatible with the suspected dengue case classification in accordance with the criteria of the World Health Organization. The initial clinical examination failed to classify as a suspected dengue case 46% of children. The viral load in the serum was significantly higher when compared to saliva and urine. Even though, saliva and urine might be used as alternative samples for the diagnosis of the disease. The nucleotide sequencing of a partial region of NS5 protein gene showed the circulation of DENV-3, especially during the year 2010, and DENV-1 and DENV-2, predominantly in the year 2011 in the study population. There was a predominance of primary instead of secondary infections, all of them with self-limiting dengue fever.

Keywords: dengue, children, diagnosis, saliva, urine.

RESUMEN

POLONI, T. R. R. S. **Estudio de las características clínicas y laboratoriales de la infección por el virus del dengue en niños atendidos en un centro de salud en la ciudad de Ribeirao Preto, San Pablo.** 2013. 78p. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto de la Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

El dengue es una enfermedad infecciosa transmitida por mosquitos del género *Aedes*. El virus del dengue (DENV), perteneciente al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, es actualmente un importante problema de salud pública en todo el mundo. Son reconocidos cuatro serotipos antigénicamente distintos (DEN-1, -2, -3 y -4). La enfermedad causada por cualquiera de los serotipos evoluciona de forma asintomática o con síntomas clínicos que van desde fiebre indiferenciada y autolimitada, pasando por la forma del dengue clásico (FD) hasta cuadros graves de fiebre hemorrágica del dengue (DHF). El diagnóstico clínico es difícil de realizarse, principalmente en pacientes pediátricos donde los síntomas son muy similares a los observados en otras infecciones febriles agudas, dejando a cargo del laboratorio el diagnóstico definitivo. Este estudio descriptivo que tuvo como objetivo estudiar las características clínicas y laboratoriales del dengue en pacientes pediátricos. La población de estudio consistió en 110 niños, con edad media de $9,3 \pm 3,7$ años, los cuáles fueron reclutados en un centro de salud de Ribeirao Preto, San Pablo. Las muestras de sangre, saliva y orina fueron colectadas de los niños 1-14 días después de la aparición de los síntomas. Los signos y síntomas más frecuentes fueron fiebre (105/110, 95%), seguido de cefalea (66/110, 60%), mialgias (49/110, 45%), vómitos (27/110, 25%) y exantema (16/110, 15%). La infección por el virus del dengue fue confirmada por pruebas laboratoriales en 96 niños, los cuales presentaron signos y síntomas compatibles con la clasificación de caso sospechoso de dengue de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial Salud. El análisis clínico inicial fallo en clasificar como caso sospechoso de dengue 46% de los niños. La carga viral en el suero fue significativamente mayor cuando comparada con aquella observada en saliva y orina. Sin embargo, saliva y orina pueden ser utilizadas como muestras alternativas para el diagnóstico de la enfermedad. La secuenciación nucleotídica de una región parcial del gen codificante de la proteína NS5 demostró la circulación de DENV-3, especialmente durante el año 2010, y un predominio de DENV-1 y DENV-2 en el año 2011 en la población de estudio. Hubo un predominio de las infecciones primarias en detrimento de las secundarias, todos con cuadros clínicos leves sin complicaciones.

Palabras-claves: dengue, niños, diagnóstico, saliva, orina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa ilustrativo das áreas de transmissibilidade da dengue em latitudes tropicais e subtropicais do mundo.....	3
Figura 2. Ilustração do impacto econômico das epidemias de dengue em algumas regiões do globo.....	3
Figura 3. Média anual de casos de dengue e de febre hemorrágica da dengue registrados pela OMS no período de 1955 a 2001.....	6
Figura 4. Mapa ilustrativo da dispersão do <i>Aedes aegypti</i> nas Américas em 1930, 1970 e 2006.....	6
Figura 5. Casos confirmados de DENV-4 distribuídos nos bairros do município de Boa Vista-RR, 2010.....	9
Figura 6. Representação esquemática do ciclo de transmissão da dengue.....	11
Figura 7. Desenho esquemático de corte sagital do mosquito transmissor mostrando os principais pontos do ciclo extrínseco.....	12
Figura 8. Estrutura do genoma do vírus da dengue.....	14
Figura 9. Representação esquemática do modelo para o ADE na replicação do vírus da dengue	16
Figura 10. Exantema típico da dengue.....	18
Figura 11. Classificação de casos de dengue e níveis de gravidade.....	19
Figura 12. Prova do laço positiva em paciente com suspeita de infecção pelo vírus da dengue.....	22
Figura 13. Esquema ilustrativo de testes diagnóstico para dengue.....	23
Figura 14. Mapa dos limites do Ribeirão Preto.....	35
Figura 15. Recrutamento dos participantes e coleta de amostras.....	37
Figura 16. Gráfico representativo dos sinais e sintomas apresentados pelas 110 crianças incluídas no estudo.....	43
Figura 17. Gráfico representativo da proporção de positividade da RT-PCR em tempo real e do teste de detecção de NS1 em amostras de 96 crianças com infecção pelo vírus da dengue confirmada.....	47

Figura 18. Gráfico representativo da comparação da carga viral em amostras de soro, saliva e urina.....	47
Figura 19. Gráfico representativo da cinética da carga viral nas amostras de soro, saliva e urina.....	48
Figura 20. Gráficos representativos da proporção de amostras de soro, saliva e urina positivas na RT-PCR em tempo real.....	49
Figura 21. Sinais e sintomas encontrados nos dois grupos em que as crianças foram categorizadas.....	52
Figura 22. Gráfico representativo dos sinais e sintoma apresentados pelas 44 crianças inicialmente classificadas como não sendo caso suspeito de infecção pelo vírus da dengue.....	52
Figura 23. Gráfico representativo da comparação dos sinais e sintomas apresentados pelas crianças dos Grupos A e B.....	53
Figura 24. Fluxograma ilustrativo do subdiagnóstico de infecção pelo vírus da dengue.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos casos de dengue por faixa etária no período de 2000 a 2011 – Ribeirão Preto - SP.....	10
Tabela 2. Características gerais das 110 crianças incluídas no estudo.....	42
Tabela 3. Resultados dos testes de RT-PCR em tempo real, NS1, IgM e IgG das 110 crianças.....	44
Tabela 4. Sorotipos circulantes nas crianças durante o período do estudo.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

DENV	Vírus da dengue
CID-10	Classificação Internacional de Doenças, décima edição
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
FD	Febre clássica da dengue
FHD/SCD	Febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue
NS	do inglês <i>non structural</i> - proteínas não estruturais
RNC5', RNC3'	Regiões não codificadoras 3'e 5
DC-SIGN	molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês ribonucleic acid
ADE	Do inglês <i>antibody-dependent enhancement</i> , exacerbação dependente de anticorpos
IgG	Imunoglobulina G
IFNγ	Interferon gama
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
HLA	Antígenos leucocitários humanos, do inglês Human Leukocyte Antigen
OMS/TDR	<i>Tropical Disease Research</i> (TDR), braço da OMS
IgM	Imunoglobulina M
VERO	Células de rim de macaco verde africano
IH	Inibição da hemaglutinação
FC	Fixação do complemento
ELISA	Do inglês <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
RT-PCR	Transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEET	N,N-diethyl-3-metilbenzamida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CSE	Centro de Saúde Escola
HC-FMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Resumen.....	iii
Lista de ilustrações.....	iv
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Breve histórico.....	5
1.2. A dengue no Brasil.....	7
1.3. Ciclo de transmissão da doença	10
1.4. Características gerais do vírus e do seu ciclo de replicação.....	12
1.5. Visão geral da imunopatogênese da doença.....	14
1.6. Quadro clínico.....	17
1.7. Manifestações clínicas atípicas.....	20
1.8. Dengue na gestação.....	20
1.9. Diagnóstico clínico.....	21
1.10. Diagnóstico laboratorial.....	22
1.10.1. Principais exames complementares inespecíficos.....	23
1.10.2. Principais exames complementares específicos.....	24
1.11. Tratamento.....	27
1.12. Profilaxia e controle.....	29
1.13. Justificativa para este trabalho de doutorado.....	33
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Gerais.....	34
2.2. Específicos.....	34
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	35
3.1. Características do local do estudo.....	35
3.2. Desenho do estudo.....	36
3.3. Recrutamento dos participantes e obtenção das amostras clínicas.....	36
3.4. Purificação do RNA viral.....	37
3.5. RT-PCR em tempo real.....	38
3.6. Determinação da carga viral.....	38
3.7. ELISA de captura de IgM e IgG.....	39
3.8. ELISA para detecção da proteína NS1.....	39
3.9. Sequenciamento.....	40
3.10. Hemograma.....	41
3.11. Análise estatística.....	41

4. RESULTADOS	42
4.1. Confirmação da infecção pelo vírus da dengue em casos suspeitos	43
4.2. Determinação da carga viral em amostras de sangue, saliva e urina.....	47
4.3. Avaliação da utilidade de urina e saliva como amostras alternativas.....	49
4.4. Identificação dos tipos virais detectados nas crianças.....	50
4.5. Análise da sintomatologia e dos dados laboratoriais	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS	60
8. ANEXOS	75
8.1. Anexo 1. Fluxogramas de classificação de risco e manejo do paciente.....	76
8.2. Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	77
8.3. Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	78

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM UMA UNIDADE DE SAÚDE NO MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO.

1. Introdução

A dengue é uma doença infecciosa sistêmica, não contagiosa, causada por um vírus que recebe o nome de vírus da dengue (DENV). O significado deste nome, independente da sua origem, está relacionado ao comportamento assumido pelo enfermo no decorrer da história natural da patologia, fato que levou a doença a ser denominada “febre quebra ossos”¹. No Brasil, a dengue recebeu diversas denominações de cunho popular já tendo sido chamada, por exemplo, de polca e de patuleia (que quer dizer povão, populacho). Em relação à origem do nome, Figueiredo e Fonseca² (p. 345) escreveram

[...] segundo Vambéry, citado por Siler, em 1926, seria árabe arcaico, significa fraqueza (astenia). Nas línguas portuguesa e espanhola, que possuem influência moura, existe a palavra dengue significando afetação. Com ambos os sentidos, a palavra descreve sintomas da doença ou comportamento praticado em virtude dela. Uma outra origem para o nome é sugerida por Halstead, em que o nome teria surgido em Zanzibar, durante epidemia ocorrida em 1870, e estaria relacionado à frase nativa “Ki-denga Pepo”, que significa pancada ou golpe dado por um mau espírito, provocando ataque doloroso semelhante à cãibra.

De todo modo, seja por melhor refletir a sintomatologia ou pela consagração que trouxe o uso popular, de todos os nomes que a doença já tenha recebido, dengue foi aquele que prevaleceu e universalizou-se. Esta é hoje a designação aceita e catalogada na atual Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde, a CID-10 (Classificação Internacional de Doenças, décima edição) estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), na qual a doença recebe os códigos A90 para dengue e A91 para febre hemorrágica devida ao vírus da dengue³. Em relação ao gênero da palavra, a quinta edição do ano de 2009 do Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa da Academia Brasileira de Letras a classifica como um substantivo de dois gêneros sendo feminino quando se refere à doença infecciosa de origem viral⁴. O Ministério da Saúde faz uso mais frequente do gênero feminino o que, juntamente com o largo alcance dos meios de comunicação de massa consagraram o mesmo. Este é o gênero usado nesta tese fazendo referência à palavra enquanto doença infecciosa viral.

A transmissão da doença ao ser humano se dá através da picada de vetores artrópodes infectados e por isso ela recebe a denominação de arbovirose, nome proveniente do inglês *arthropod-borne virus*. A doença pode ser causada por quatro vírus diferentes uma vez que existem quatro sorotipos virais distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4⁵. Os vetores são fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O *Aedes aegypti*, a espécie primariamente implicada no ciclo de transmissão da dengue, é um vetor originário da África que disseminou-se, durante o comércio de escravos ocorrido durante os séculos XV a XIX, inicialmente para a Ásia e posteriormente difundiu-se globalmente em consequência do incremento em viagens e comércio ocorrido nos últimos 50 anos⁶. São mosquitos antropofílicos de atividade hematofágica predominantemente diurna, se alimentando preferencialmente no meio da manhã e ao final da tarde. São vetores urbano-adaptados que têm predileção por ambientes domésticos fazendo seu repouso pós-prandial em espaços escuros dentro das casas e com dispersão usualmente limitada a cerca de 30 a 50 metros por dia. O *Aedes albopictus*, originário da Ásia, é um vetor secundário da doença que expandiu drasticamente sua distribuição geográfica global nas últimas três décadas. Este vetor não apresenta antropofilia e domesticação tão acentuadas quanto o *Aedes aegypti*, é encontrado tanto em áreas rurais quanto urbanas e tem dispersão natural de 400 a 600 metros⁷. Embora os índices de disseminação do vírus do intestino para outros tecidos seja menor no *Aedes albopictus* do que no *Aedes aegypti*, o *Aedes albopictus* é importante na transmissão da doença devido ao seu atual estado adaptativo dentro da clássica tríade vetor-hospedeiro-ambiente⁸. Dengue é uma enfermidade de notificação compulsória caracterizada por epidemias de padrões sazonais. No Brasil, a doença apresenta comportamento endêmico com epidemias cíclicas anuais, com maior incidência de casos nos meses de fevereiro a maio devido à tríade de maior precipitação pluviométrica, médias de temperatura mais elevadas e aumento da população do mosquito vetor neste período. Durante o século XIX, a dengue era considerada uma doença esporádica que causava epidemias com longos intervalos refletindo a lentidão dos sistemas de transporte que limitava o deslocamento das pessoas naquele tempo. Hoje, a dengue figura como a mais importante arbovirose humana do mundo^{9; 10}. Estima-se, segundo a OMS que 2,5 bilhões de pessoas vivam em mais de 100 países endêmicos e áreas onde a temperatura é adequada à transmissão do vírus da dengue, o que significa dizer que um terço da população mundial está exposta ao risco de contrair a doença (Figura 1). Mais de 50 milhões de infecções ocorrem anualmente, sendo cerca de 500.000 considerados como casos de maior gravidade e 22.000 pessoas evoluem para desfecho fatal¹¹.

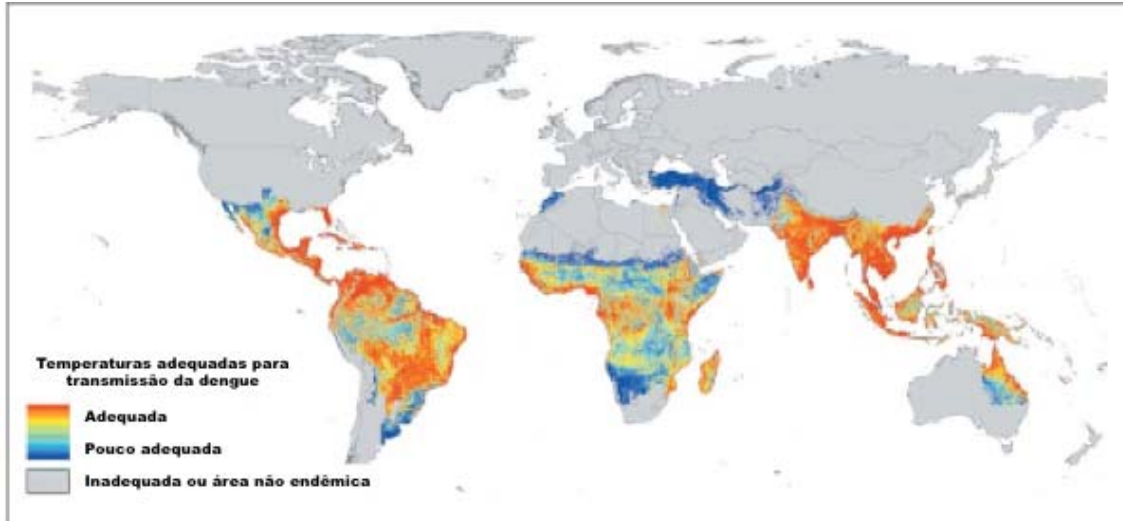


Figura 1. Mapa ilustrativo das áreas de transmissibilidade da dengue em latitudes tropicais e subtropicais do mundo. Fonte: NEJM 2012; 366:1423-32.

O impacto da doença sobre a economia das regiões afetadas pelas epidemias também é preocupante uma vez que há interferência nas atividades produtivas devido ao grande número de indivíduos acometidos (Figura 2).

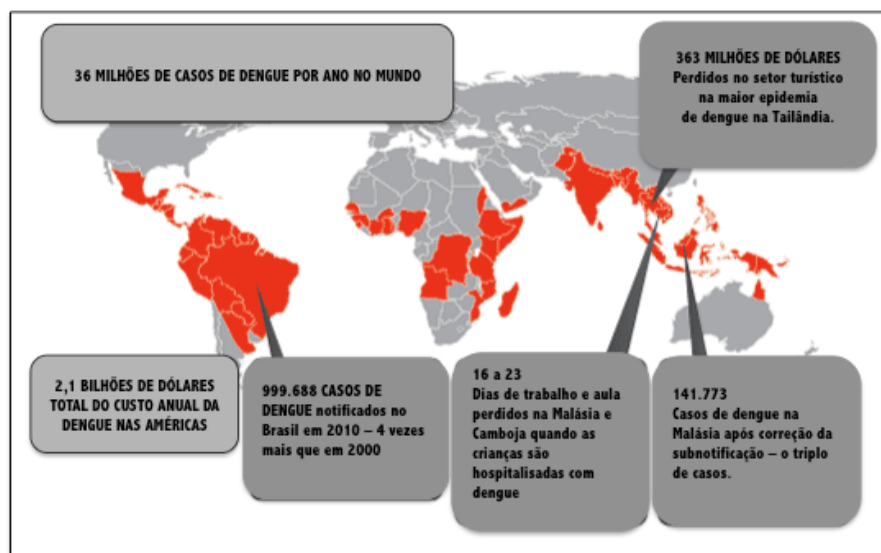


Figura 2. Ilustração do impacto econômico das epidemias de dengue em algumas regiões do globo. Fonte: SHEPARD, 2011: <http://www.denguematters.info/content/issue-2-economic-burden-dengue>.

Em países em desenvolvimento, sobretudo a partir da década de 1960, o intenso êxodo rural ocasionou crescimento desordenado de cidades nas quais a falta de abastecimento de água, levando ao armazenamento precário da mesma, e a falta de destinação adequada para o lixo

somados a uma cultura de excesso de produção industrial de descartáveis que após o uso são lançados em quintais e terrenos baldios fizeram proliferar os criadouros do mosquito vetor¹². Nestes países a dengue é uma importante doença a causar grande impacto econômico, social e de saúde pública que não é totalmente conhecido pois os estudos elaborados até o presente momento são focados em epidemias. No Brasil, por exemplo, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) implantado em 2002, assume atualmente o caráter de política de saúde permanente gerando ainda mais custos. Especialmente durante os períodos epidêmicos, a doença gera absenteísmo laboral e escolar, uma vez que o número de crianças acometidas é crescente, enfraquece as atividades turísticas e sobrecarrega o sistema de saúde com uma grande e repentina demanda trazendo prejuízos não apenas à saúde pública, mas à toda a cadeia produtiva¹³. A quantificação destes impactos é de crucial importância para governos e iniciativa privada na formulação de decisões para prevenção e manejo da dengue, em especial para a potencial introdução de vacinas e outras tecnologias de combate da doença.

A doença é autolimitada, não estabelecendo infecção persistente e pode cursar de forma assintomática ou com quadro clínico que varia desde uma febre indiferenciada, passando pela febre clássica da dengue (FD), até quadros graves de febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD). Até o presente momento não há tratamento específico para a doença. A inadequação e insuficiência das medidas de controle do vetor mantém o foco na busca de novas abordagens de enfrentamento da doença tais como o desenvolvimento de vacinas contra dengue, uma solução acessível a baixo custo. Nas últimas décadas o desenvolvimento da imunologia e da biologia molecular possibilitou a implementação de novas vacinas e de novas estratégias de vacinação em todo mundo¹⁴. Atualmente há vacinas com possibilidade de entrar em poucos anos no mercado podendo se tornar poderosas ferramentas para os órgãos de saúde no sentido de proteger os cidadãos e salvaguardar a economia dos países do impacto deletério da dengue¹³. Este é o desafio atual das autoridades sanitárias nacionais e internacionais: reverter a tendência de aumento das epidemias, bem como o aumento da incidência de dengue hemorrágica visto que a doença é uma importante questão de saúde pública internacional¹⁵.

1.1. Breve histórico

Os mais antigos relatos de uma doença possivelmente causada pelo vírus da dengue encontram-se em enciclopédias chinesas da dinastia Chin (265 a 420 d.C.) onde a doença é descrita como “veneno da água” e associada a insetos voadores, da dinastia Tang (610 d.C) época em que os escritos foram formalmente editados e da dinastia Northern Sung no ano 992 d.C.¹⁶. O vírus da dengue também pode ter sido o causador de surtos de doença febril aguda que ocorreram no século XVII em ilhas a oeste do oceano Pacífico e no Panamá, bem como das epidemias registradas em Jacarta, Indonésia e Egito no século XVIII, época em que a doença já apresentava uma distribuição global^{17; 18}. Contudo, a primeira descrição detalhada da dengue em sua forma epidêmica foi feita por Benjamim Rush em 1780 na Filadélfia, Estados Unidos da América¹⁹. Já no século XIX, inúmeras epidemias de dengue foram descritas em Zanzibar, Calcutá, Grécia e Japão². Durante a Segunda Guerra Mundial tanto o vírus quanto o vetor tornaram-se amplamente distribuídos em centros urbanos do Sudeste Asiático o qual é conhecido como uma região hiperendêmica da doença onde a circulação simultânea dos quatro sorotipos do vírus leva a quadros graves da doença com grande número de hospitalizações sobretudo em crianças; neste continente a doença está muito melhor caracterizada do que em outras regiões do globo²⁰. Nas áreas tropicais do Pacífico e das Américas nas décadas de 1970 e 1980 um padrão de urbanização não planejada e a falta de controle do vetor também ocorreram fazendo com que a doença ressurgisse como grande problema de saúde pública. Embora as razões para reemergência da doença e para a atual pandemia não estejam completamente elucidadas, sabe-se que as alterações ambientais promovidas pelo acelerado crescimento populacional e pela urbanização descontrolada que ocorreu no pós-guerra, a falta de controle do mosquito vetor e o surgimento de mosquitos resistentes aos inseticidas habitualmente utilizados, contribuíram para o retorno e aumento das epidemias¹⁶. Com o advento do moderno transporte aéreo e o aumento do deslocamento das pessoas, muitas delas em período de incubação da doença, a expansão do DENV e seu mosquito vetor alcançaram distribuição geográfica global²¹. Esta disseminação também é facilitada por um período de transmissibilidade longo, variando desde um a dois dias antes do aparecimento dos sintomas até oito dias após seu início²². A dengue, portanto é uma doença antiga, mas que nos últimos 30 anos ressurgiu globalmente com epidemias frequentes e de grande importância (Figura 3).

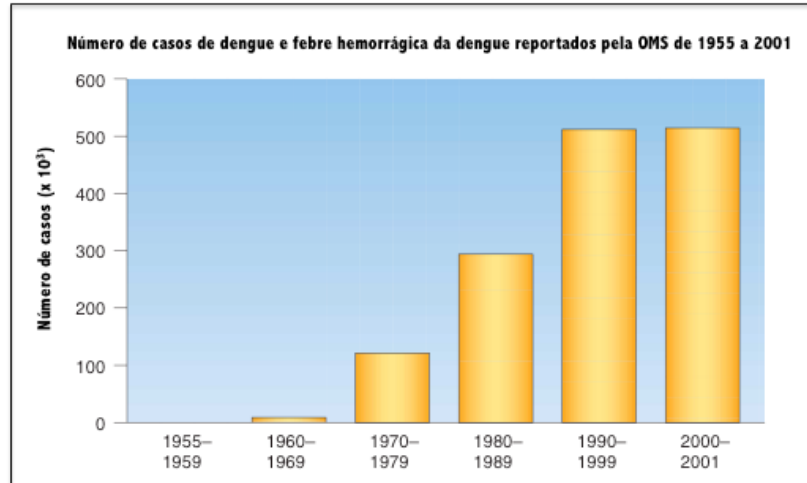


Figura 3. Média anual de casos de dengue e de febre hemorrágica da dengue registrados pela OMS no período de 1955 a 2001. Fonte: Nature Medicine Supplement volume 10 | number 12 | december 2004.

A partir de 1954, a dengue começa a exibir um novo padrão caracterizado por hemorragia grave e/ou choque provocando óbito em 40% dos enfermos: a chamada febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD), descrita pela primeira vez por William McD. Hammon, em 1960, nas Filipinas e na Tailândia²³. Após a década de 70, o problema das epidemias de dengue e suas formas hemorrágicas agravou-se particularmente nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, ajudado pela grande dispersão do mosquito vetor (Figura 4).

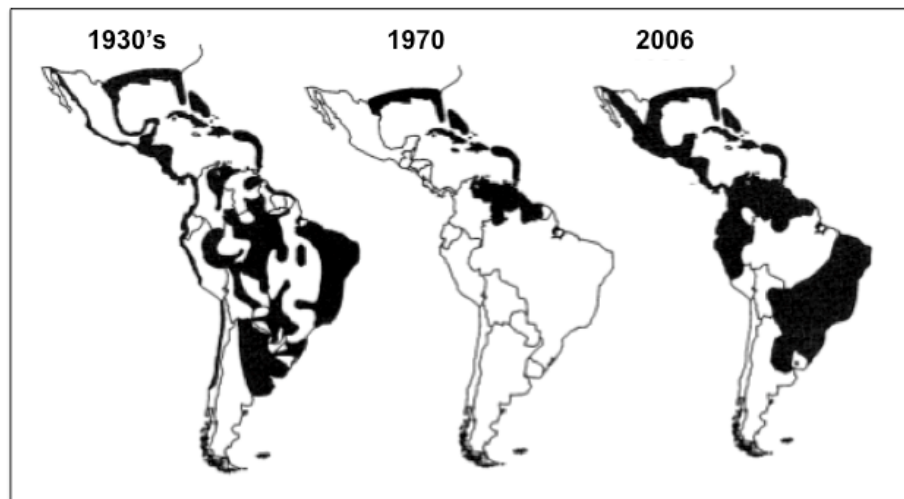


Figura 4. Mapa ilustrativo da dispersão do *Aedes aegypti* nas Américas em 1930, 1970 e 2006. Fonte: Flaviviruses - vol 1 – cap 33 – pag 1154-1251 - Fields Virology, 5^a ed.

Nas Américas, a primeira grande epidemia de FHD/SCD foi registrada no ano de 1981 em Cuba, onde 10.312 pacientes foram classificados como tendo FHD em um total de 344.203 casos notificados²⁴. Desde então, sucederam-se epidemias com grande número de casos de FHD em todas as faixas etárias, mas a maioria dos casos fatais em crianças²⁵. Embora a transmissão da dengue entre as crianças nas Américas fosse considerada menos intensa do que no Sudeste Asiático, ao estudar as manifestações clínicas da doença em crianças e adultos hospitalizados na Nicarágua, Hammond e colaboradores mostraram que a maioria dos casos de infecção secundária ocorreu em crianças jovens, sugerindo uma incidência muito maior de infecção do que se pensava para esta faixa etária²⁶. Entre os fatores que contribuíram para a reemergência da FD/FHD destacam-se o rápido crescimento populacional e urbanização da América Latina e Caribe, o aumento do número de pessoas se deslocando geograficamente facilitando a disseminação da virose, a circulação dos quatro sorotipos nas Américas gerando um estado de hiperendemicidade, com aumento do risco de FHD, e a pouca eficiência dos programas de controle do vetor. Atualmente, Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, países localizados na região do Cone Sul, na América do Sul, foram responsáveis por 64,6% (2.798.601) de todos os casos notificados nas Américas no período de 2001 a 2007. Destes, 6.733 foram de febre hemorrágica da dengue com 500 óbitos¹⁵.

1.2. A dengue no Brasil

Os primeiros surtos e epidemias de dengue datam de 1846 no Rio de Janeiro, 1896 em Curitiba, 1917 no Rio Grande do Sul e entre 1922 e 1923 no Rio de Janeiro e Niterói². A campanha brasileira de erradicação do *Aedes aegypti* no intuito de combater a febre amarela, que já vinha sendo empreendida por Emílio Ribas e Oswaldo Cruz desde 1903, ganhou impulso a partir de 1920 com o apoio da Fundação Rockefeller e da Organização Pan-Americana da Saúde, sendo tão bem sucedida que não houve relatos de outras epidemias de dengue até 1981²⁷. Porém, com a expansão da dengue na América Central e Caribe somada à nova infestação do Brasil pelo mosquito, um surto veio a ocorrer em Boa Vista, Roraima, provocado pelos DENV-1 e DENV-4 causando doença febril indiferenciada e febre clássica da dengue em 11.000 indivíduos²⁸. Em 1986 o DENV-1 vindo do Caribe atingiu Nova Iguaçu, disseminando-se pela região metropolitana do Rio de Janeiro com cerca de 95.000 casos notificados de febre indiferenciada e febre clássica da dengue^{29; 30}. A partir do Rio de Janeiro o DENV-1 se disseminou para outros estados transformando-se em um problema de saúde

pública. Passados quatro anos, as cidades de Niterói e Rio de Janeiro foram afetadas por um novo surto em 1990, desta vez relacionado ao DENV-2 também proveniente do Caribe resultando pela primeira vez em formas graves da doença com confirmação, pelo Ministério da Saúde, de 435 casos de dengue hemorrágica e 3 óbitos³¹. Até a década de 80, a atividade da dengue no Brasil esteve associada aos DENV-1 e DENV-2, mas em 1998 o DENV-3 foi isolado no estado de São Paulo, de um indivíduo que havia viajado para a Nicarágua, onde o vírus estava circulando, sugerindo que este sorotipo poderia ingressar em nosso país a qualquer momento³². De fato, o primeiro caso autóctone de DENV-3 foi detectado em 2000 no Rio de Janeiro^{33; 34; 35}. Do Rio de Janeiro, o DENV-3 disseminou-se por todo o país, contribuindo para que em 2002 fossem notificados quase 800.000 casos de dengue clássica, 270 casos de dengue hemorrágica e 150 óbitos². A partir deste ponto, grandes epidemias ocorreram ocasionadas por estes três sorotipos, causando infecções humanas de alta morbimortalidade, sendo que no período entre 2001 e 2007, 98,5% dos casos de dengue da região do Cone Sul foram notificados pelo Brasil, que também registrou os maiores índices de mortalidade desta região em um período que circulavam os DENV-1, DENV-2 e DENV-3¹⁵. No ano de 2008 a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou, de janeiro a novembro, 787.726 casos suspeitos de dengue, 4.137 casos confirmados de FHD e a ocorrência de 223 óbitos por FHD. Nesta ocasião, o DENV-2, sorotipo associado a casos de maior gravidade, já substituíra o DENV-3 e predominava nos estados do Rio de Janeiro (82,7%), Rio Grande do Norte (80%), Ceará (75%), São Paulo (41,7%), Bahia (40%) e Roraima (37%), sendo o DENV-1 isolado em apenas 3,6% das amostras no ano de 2008. O comportamento endêmico apresentado pela doença foi acompanhado pelo aumento de número de casos graves em crianças, sugerindo que a doença está assumindo, no Brasil, um padrão à semelhança do que ocorre no Sudeste Asiático³⁶. Até o ano de 2006 os casos de FHD ocorreram predominantemente na faixa etária dos 20 aos 40 anos de idade, mas a partir de 2007, além do aumento no número de casos, mais da metade deles foi registrada em menores de 15 anos de idade em várias regiões do país³⁷. Por exemplo, no ano de 2008 no estado do Rio de Janeiro, a faixa etária de 0 a 15 anos concentrou 86% dos óbitos. Esta mudança do perfil epidemiológico da doença chama a atenção das autoridades de saúde pública para a necessidade de atendimento diferenciado para crianças durante epidemias e realização de estudos populacionais que esclareçam melhor a história natural da doença nesta faixa etária³⁸. Até 2010, no sistema de monitoramento implantado pelo Ministério da Saúde, em conjunto com as Secretarias Estaduais e Municipais da Saúde, não havia relato de isolamento do DENV-4, bem como não havia evidência epidemiológica de sua

circulação no Brasil embora em 2008, a pesquisadora Regina Maria Pinto de Figueiredo e colaboradores, da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, já houvessem descrito o isolamento do DENV-4 do soro de três pacientes na cidade de Manaus, Amazonas³⁹. Somente em agosto de 2010 o Ministério da Saúde Brasileiro divulgou nota técnica confirmando o isolamento do DENV-4 em um caso autóctone da cidade de Boa Vista, Roraima. Posteriormente foram confirmados outros dois casos, todos autóctones de Boa Vista, Roraima (Figura 5)⁴⁰.

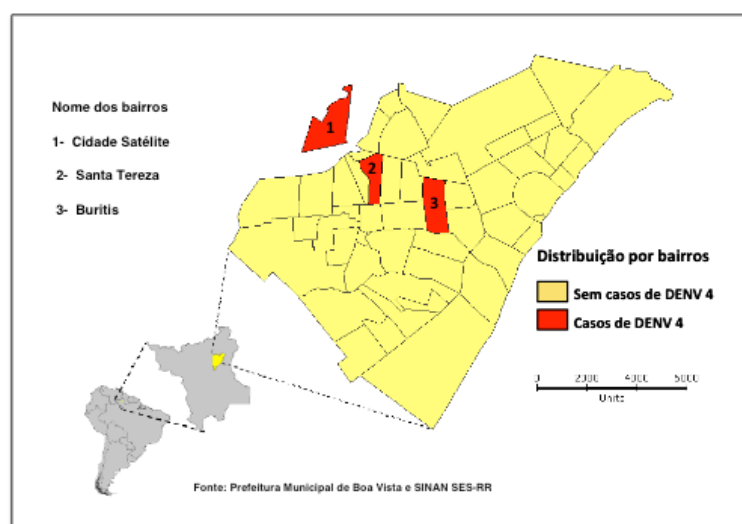


Figura 5. Casos confirmados de DENV-4 distribuídos nos bairros do município de Boa Vista-RR, 2010.

Na atual epidemia de 2013, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou a circulação dos quatro sorotipos sendo que o DENV-4 é o de maior prevalência correspondendo a 52,6% das amostras analisadas até fevereiro de 2013. O boletim do governo aponta 204.650 casos, contra 70.489 do mesmo período do ano passado sendo que oito estados - Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso e Espírito Santo - concentram 173.072 notificações, que equivalem a 84,6% do total. Mesmo com expansão da notificação total da doença há tendência de queda no número de casos graves. Este menor número de casos graves e óbitos é resultado das medidas adotadas pelo Ministério da Saúde em conjunto com estados e municípios, como a organização da rede pública de atendimento, a melhoria da atenção básica, a capacitação dos profissionais e o reforço à vigilância em saúde.

No município de Ribeirão Preto, cidade onde foi realizado o presente estudo, uma epidemia de grandes proporções que rapidamente se expandiu para municípios vizinhos foi

registrada pela primeira vez no verão de 1990/91 causada pelo DENV-1. Após esta epidemia um inquérito sorológico realizado por Figueiredo e colaboradores mostrou uma soroprevalência de anticorpos antidengue de 5,4% na faixa etária de 5 a 15 anos⁴¹. A partir de então, a região de Ribeirão Preto já vivenciou outras epidemias em 2001 pelo sorotipos DENV-1 e DENV-2, em 2006 pelo sorotipo DENV-3 e nos anos seguintes, de 2007 a 2011 a transmissão se manteve sustentada em níveis epidêmicos. Em consonância com o quadro observado em todo país, até 2006 os casos de dengue confirmados em residentes no município concentraram-se na faixa etária de 15 a 49 anos de idade, a partir de então houve aumento do número de casos na faixa etária pediátrica (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos casos de dengue por faixa etária no período de 2000 a 2011 - Ribeirão Preto-SP.

Idade em anos	2000	2001*	2002	2003	2004	2005	2006*	2007*	2008*	2009*	2010*	2011*
< 1	0	4	0	1	0	1	17	11	4	10	207	149
1 a 4	2	30	2	5	0	3	62	31	15	20	864	699
5 a 9	3	81	4	21	0	41	230	92	34	73	1570	1314
10 a 14	21	171	17	49	4	128	387	157	92	158	2951	2193
15 a 19	19	307	41	79	6	128	622	261	98	153	3011	2409
20 a 34	63	1106	114	252	11	110	2067	794	301	565	9387	6722
35 a 49	66	886	92	229	16	127	1461	682	286	367	6040	5121
50 a 64	29	452	53	122	10	72	844	514	173	227	4025	3253
65 a 79	7	147	23	32	1	27	279	167	49	55	1319	1276
≥ 80	0	6	7	7	0	0	28	13	4	8	214	207
Total	210	3190	346	797	48	637	5997	2722	1056	1.636	29.588	23.343

*Anos epidêmicos.

Fonte: SINAN-Vigilância Epidemiológica-Secretaria Municipal da Saúde

1.3. Ciclo de transmissão da doença

Em seus trabalhos realizados nas colônias inglesas, o cientista australiano Thomas Lane Bancroft sugerira, em 1905, que a doença era transmitida por um mosquito, muito provavelmente pelo mesmo vetor da febre amarela, o mosquito *Aedes aegypti* que, naquela época, era denominado *Stegomyia fasciata*⁴². Posteriormente, o médico australiano John Burtion Cleland, realizando estudos com voluntários, comprovou a transmissão do vírus pelo *Aedes aegypti*^{43; 44}. Ao longo de suas adaptações, de ciclo ancestral no Sudeste Asiático provavelmente envolvendo primatas e mosquitos da mata, o vírus da dengue evoluiu para um

ciclo urbano no qual o mosquito se infecta ao picar um homem com viremia e transmite o vírus a outros seres humanos⁴⁵ (Figura 6).

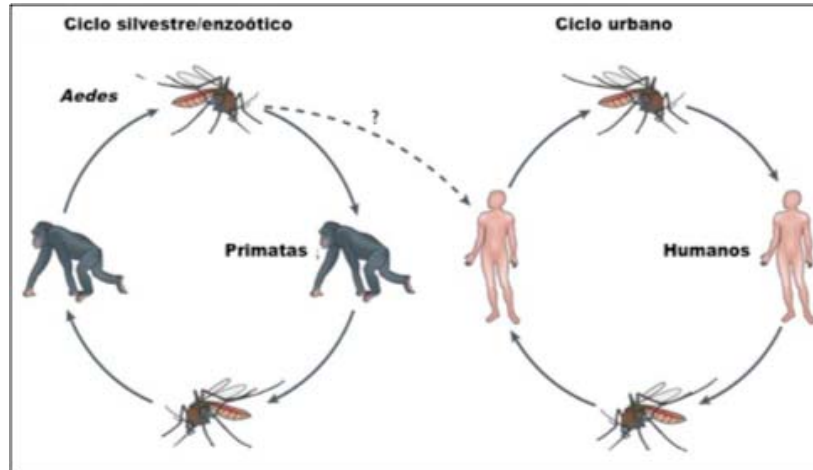


Figura 6. Representação esquemática do ciclo de transmissão da dengue. Fonte: Modificado de Whitehead et al. Nature reviews – Microbiology, vol 5 – jul 2007 – 519.

Os vírus da dengue são restritos em sua gama de hospedeiros vertebrados naturais, geralmente utilizando-se de primatas como seus hospedeiros reservatórios e de amplificação⁴⁶. Além disto, os vírus da dengue são arbovírus completamente adaptados a humanos e não necessitam do ciclo enzoótico para sua manutenção²¹. A necessidade da fêmea do mosquito sugar sangue humano para maturação de seus ovos provê o mecanismo necessário para a transmissão do vírus da dengue. Quando o mosquito ingere sangue de um hospedeiro virêmico ocorre infecção das células epiteliais do intestino médio deste inseto. Em experimentos de laboratório utilizando repasto sanguíneo artificial, verificou-se que são necessários 10^6 ou mais partículas virais infecciosas por mililitro de sangue para infecção dos mosquitos, porém muitos dos fatores reguladores da infecção durante o repasto de mosquitos sob condições naturais ainda não estão completamente elucidados⁷. Carreado pela hemolinfa, o vírus infecta as glândulas salivares e, posteriormente, é secretado na saliva durante o repasto do inseto em outro hospedeiro vertebrado susceptível, fechando o ciclo de transmissão da doença⁴⁷. O intervalo de tempo entre a ingestão do sangue infectado e a secreção salivar do vírus é de 8 a 11 dias e denominado período de incubação extrínseco (Figura 7). Estima-se que à temperatura de 25°C, o período de incubação extrínseco varie entre 5 a 33 dias (média de 15 dias). Quando as temperaturas aumentam para 30°C este período de incubação pode ser reduzido para 2 a 15 dias com média de 6,5 dias⁴⁸. O período de incubação extrínseco também

varia com a carga viral infectante sendo que mosquitos infectados em primatas não humanos com baixos títulos de viremia e mantidos a 30°C não foram capazes de transmitir o vírus até 25 dias após o repasto sanguíneo⁷.

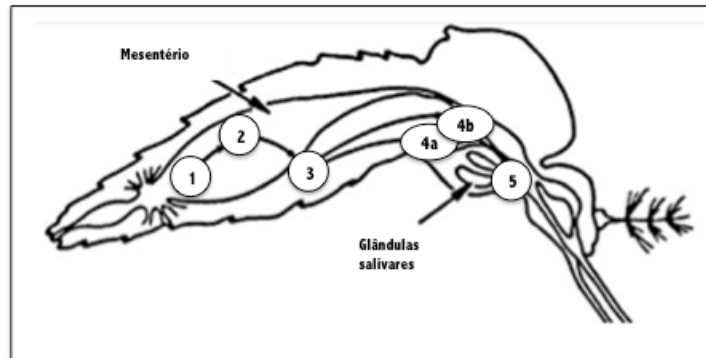


Figura 7. Desenho esquemático de corte sagital do mosquito transmissor mostrando os principais pontos do período de incubação extrínseco. 1-Sangue infectado ingerido. 2-Vírus infectam e se multiplicam nas células epiteliais do mesentério. 3-Vírus são liberados do intestino. 4a- Vírus infectam as glândulas salivares após amplificação secundária em outros tecidos. 4b- Vírus infectam as glândulas salivares sem amplificação secundária em outros tecidos. 5-Os vírus são liberados pelas células epiteliais das glândulas salivares e transmitidos durante o repasto do inseto. Fonte: Modificado de Flaviviruses - vol 1 – cap 33 – pag 1154-1251 - Fields Virology, 5ª ed.

Transmissão sem envolvimento de vetor foi descrita em indivíduos de equipes de saúde que se acidentaram com materiais perfuro cortantes contaminados com sangue de pacientes doentes e em pacientes submetidos a transplante de medula óssea⁴⁹. Também há relatos de transmissão da dengue em pacientes que receberam transfusão de sangue e hemoderivados contaminados com o vírus⁵⁰. Em relação à transmissão vertical do vírus da dengue em humanos, embora a imunopatogênese não seja ainda bem compreendida, este modo de transmissão tem sido relatado por vários grupos de estudo inclusive no Brasil^{51;52;53;54}.

1.4. Características gerais do vírus e do seu ciclo de replicação

Desde 1906, Percy Moreau Ashburn e Charles Franklin Craig, oficiais das forças armadas dos Estados Unidos da América, haviam demonstrado que a dengue era causada por um agente etiológico filtrável (designação anteriormente dada aos vírus), descartando o envolvimento de protozoários e bactérias⁵⁵. Durante a Segunda Guerra Mundial, muitos investigadores japoneses publicaram relatos de seus experimentos sobre a patogenicidade do

vírus da dengue em camundongos e outros animais de laboratório⁵⁶. O vírus da dengue foi isolado pela primeira vez em 1943 pelo pesquisador japonês Susumu Hotta da Universidade de Kyoto em epidemias ocorridas no Japão no período da guerra⁵⁷ e, posteriormente, nos Estados Unidos da América pelo médico Albert Bruce Sabin e nas Filipinas e Tailândia por William McD. Hammon^{56; 58}. Testes sorológicos cruzados entre o soro de pacientes convalescentes da doença e as cepas virais isoladas mostraram que embora os vírus da dengue sejam, do ponto de vista epidemiológico, praticamente idênticos, são reconhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4⁵⁹. Atualmente o vírus da dengue é classificado como pertencente à família *Flaviviridae*, ao gênero *Flavivirus* e ao sorogrupo DENV. A família também possui outros três gêneros que são *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. O gênero *Flavivirus*, cujo protótipo é o vírus da febre amarela, é composto por 53 espécies⁶⁰. A inclusão do DENV neste gênero é baseada na sua reatividade antigênica com outros flavivírus bem como na organização do genoma. O vírus apresenta morfologia esférica, tem tamanho de 40 a 60 nm de diâmetro e contém um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica envolto por envelope lipídico. O genoma viral que está dentro deste nucleocapsídeo é constituído por RNA de fita simples, de polaridade positiva e com tamanho de aproximadamente 11.000 pares de base. Este genoma codifica três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína pré-M/M associada à membrana e proteína E do envelope, além de sete proteínas não estruturais (NS-do inglês *non structural*): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 8). As extremidades genômicas 5' e 3' são compostas de regiões não codificadoras (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 450 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de amplificação genômica, tradução e empacotamento viral⁶¹.

O ciclo de replicação inicia-se com a adsorção da partícula viral à célula-alvo através da ligação da proteína E a receptores celulares ainda não bem caracterizados. Interações entre a proteína E e a molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) são essenciais para a infecção destas células e para internalização eficiente da partícula viral por endocitose mediada por clatrina⁶². Uma vez endocitado para o citoplasma, ocorre queda do pH intra endossomo provocando mudanças estruturais na proteína E que culminam na fusão do envelope viral com a membrana endossomal. Esta fusão libera o genoma viral no citoplasma e o mesmo, sendo de polaridade positiva e se comportando como RNA mensageiro, dá início à tradução de uma poliproteína que é direcionada para a membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) onde permanece ancorada, com as proteínas prM, E,

NS1 e NS2b voltadas para o lúmen do retículo endoplasmático e as proteínas NS2a, NS3, NS4 e NS5 voltadas para citoplasma. Uma combinação de proteases virais e do hospedeiro cliva a poliproteína dando origem às proteínas virais. A proteína C reconhece o genoma viral replicado pela RNA polimerase/RNA dependente (NS5/NS3) formando uma ribonucleoproteína que se liga à porção citoplasmática das glicoproteínas ancoradas no RER. Posteriormente, a partícula viral é montada por brotamento para dentro do lúmen do RER adquirindo, neste momento, seu envelope. Esta partícula viral é então direcionada para complexo de Golgi, onde sofre um processo de maturação que consiste na clivagem da proteína “prM”, resultando na liberação da “pr” e formação da proteína M no envelope viral (Figura 8 C). O processo de maturação termina com a dimerização da glicoproteína E do envelope viral para finalmente a progênie viral ser liberada pela via exocítica⁶³.

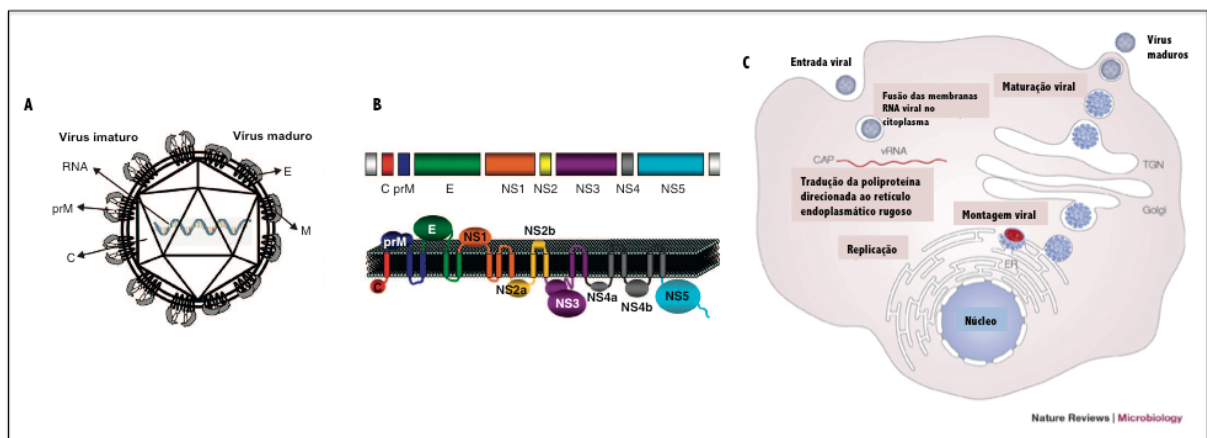


Figura 8. Estrutura do genoma do vírus da dengue. (A) Representação esquemática da partícula viral. Do lado esquerdo a estrutura das moléculas numa partícula viral imatura, com proteína prM ainda não clivada e à direita esquema da partícula viral madura. (B) Representação da organização do genoma do vírus com suas proteínas estruturais, não estruturais e respectivas topologias na membrana do retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira. Fonte: Drug Discovery Today: Disease Mechanisms / Haematology. Vol.8, N1-2, 2001. (C) Esquema representativo do ciclo de replicação viral. Fonte: nature reviews | microbiology volume 3 | january 2005.

1.5. Visão geral da imunopatogênese da doença

Após a picada do mosquito, as células dendríticas da pele (células de *Langerhans*) são as primeiras a serem infectadas e nelas ocorre uma replicação inicial dos vírus e também uma produção local de *interferon* tipos I e II que tende a limitar a disseminação da infecção por contiguidade. Estas células infectadas migram para os linfonodos regionais onde o vírus se

replica e se dissemina através dos vasos linfáticos para o ducto torácico e daí para a circulação sanguínea e os órgãos⁶⁴. A replicação viral inicial que ocorre nos tecidos (células musculares estriadas, lisas e fibroblastos) bem como em linfonodos locais serve como fonte de disseminação do vírus para o sangue, onde estes podem circular livres no plasma ou no interior de monócitos ocasionando a viremia. Os DENV são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica por transporte passivo através do endotélio, por replicação ativa em células endoteliais ou carreados no interior de células inflamatórias infectadas⁶⁵. Quando um indivíduo é infectado, seu organismo responde no sentido de prevenir a disseminação viral, o que nem sempre é factível uma vez que o DENV tem genes com domínios que, além de mediar passos essenciais do ciclo de vida viral, modulam as reações de seu hospedeiro para escapar tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Portanto, o desfecho de uma infecção por DENV será determinado pelo balanço entre a velocidade da replicação e disseminação viral e a resposta imune do hospedeiro. A forma grave da doença se caracteriza pela perda de fluidos e proteínas, principalmente albumina, do leito vascular para o interstício e cavidades serosas gerando diminuição do volume plasmático, hipotensão arterial e choque que pode levar ao óbito. Esse evento costuma ser rápido e parece ser mediado por alterações na permeabilidade do endotélio resultante da perda das suas junções celulares. Para explicar a origem das alterações que levam ao surgimento das formas graves da doença foram propostas diversas hipóteses sendo que a mais conhecida delas é a chamada teoria da exacerbação da infecção dependente de anticorpos (*antibody-dependent enhancement*, ADE). Em 1960, a observação de que mais de 85% das crianças com FHD na cidade de Bangkok apresentavam altos títulos de anticorpos não específicos da infecção atual (ou seja, anticorpos heterólogos) foi a primeira indicação de uma base imunológica para a FHD⁶⁶. Tem sido observado que o risco de FHD é aumentado na infecção secundária em comparação com a infecção primária²⁰. A infecção pelo DENV produz imunidade duradoura sorotipo específica, mas a imunidade é apenas parcial e transitória para infecções subsequentes que envolvam outro sorotipo (heterólogo) e dura cerca de dois a três meses⁵⁶. O pesquisador Scott B. Halstead e colaboradores propuseram a teoria de que indivíduos que sofrem infecção secundária por sorotipo diferente do envolvido na primo-infecção, têm uma exacerbação da infecção imunologicamente mediada e desenvolvem uma resposta paradoxal que leva a quadros mais graves da doença⁶⁶. Durante a infecção secundária, anticorpos heterólogos antidengue pré-existentes, da classe IgG, não neutralizantes, opsonizam o vírus e aumentam sua entrada e replicação nos macrófagos. Os anticorpos subneutralizantes formam, com os vírus, complexos imunes que uma vez ligados aos fagócitos mononucleares são rapidamente internalizados

resultando em infecção celular seguida de replicação viral. Acredita-se que as manifestações da FHD sejam devidas à exacerbada replicação viral, a qual induz monócitos e macrófagos infectados a liberarem mediadores vasoativos envolvidos no aumento da permeabilidade capilar⁶⁷. Embora a teoria do ADE não seja uma formulação consensual uma vez que FHD/SCD ocorre em casos de infecção primária e também não explique completamente a patogênese da FHD, ela mostra que a resposta imune tem um papel central (Figura 9).

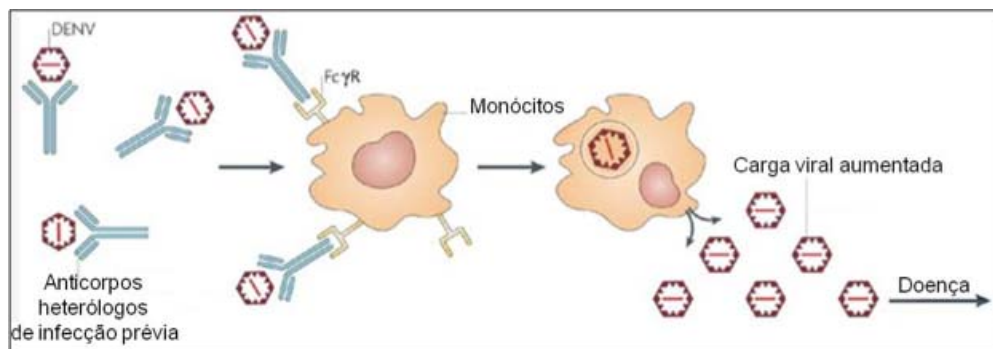


Figura 9. Representação esquemática do modelo para o ADE na replicação do vírus da dengue. ADE ocorre quando anticorpos de uma infecção anterior, heterotípicos e não neutralizantes se ligam às partículas virais numa segunda infecção, mas não as neutralizam. Pelo contrário, este complexo vírus-anticorpo se liga a receptores celulares de monócitos circulantes facilitando a infecção destas células. O resultado disto é um aumento global na replicação viral que leva a formas mais graves da doença. Fonte: nature reviews | microbiology volume 5 | july 2007.

Outros autores têm sugerido uma teoria na qual os elevados níveis de citocinas assim como a magnitude da resposta de células T, teriam correlação diretamente proporcional com a gravidade da doença⁶⁸. O DENV tem a capacidade de induzir ativação anormal de células T, resultando em uma “tempestade” de citocinas pró-inflamatórias com efeitos patológicos que são críticos sobretudo para o endotélio vascular⁶⁹. A entrada viral em macrófagos e monócitos resulta em apresentação de peptídeos virais na superfície celular e as subsequentes interações entre as células apresentadoras de antígenos com células T de memória induzem produção de citocinas pró-inflamatórias tais como *interferon* gama e fator de necrose tumoral alfa (IFN γ e TNF α). A grande quantidade de mediadores químicos como, por exemplo óxido nítrico, liberada pelos fagócitos mononucleares infectados e lisados pelos linfócitos T CD8+ juntamente com as citocinas pró-inflamatórias afetam diretamente as células endoteliais resultando em aumento da permeabilidade vascular observada na forma grave da doença. Dentre estes mediadores químicos, o TNF- α é uma das mais importantes citocinas com papéis centrais na defesa do hospedeiro e na resposta inflamatória à injúria tecidual aguda⁶⁵. Esta

teoria prediz que indivíduos com dengue hemorrágica teriam maiores níveis de citocinas e maior ativação de células T no sangue⁷⁰. Outra teoria é a hipótese integral, formulada durante a epidemia de 1981 em Cuba, segundo a qual a ocorrência de formas hemorrágicas da doença depende de fatores individuais, epidemiológicos e virais. São fatores individuais: sexo feminino, idade menor que 15 anos, presença de comorbidades, certos antígenos HLA (antígenos leucocitários humanos, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) e pré-existência de anticorpos para dengue. Fatores epidemiológicos são a alta densidade do vetor, a suscetibilidade da população, a infecção sequencial, a sequência dos vírus infectantes e a circulação dos vírus em grande intensidade⁷¹. Diferenças de virulência entre os genótipos virais também são implicadas na patogênese da doença grave. Estudo conduzido por Cologna e colaboradores com o DENV-2 aponta para evidências de que os vírus pertencentes ao genótipo do Sudeste Asiático são responsáveis por formas mais graves da doença, enquanto aqueles pertencentes ao genótipo Americano respondem por formas leves como a FD⁷². Embora a patogênese da forma grave da doença não esteja totalmente esclarecida, entre os indivíduos que têm maior risco de apresentar FHD estão aqueles pertencentes à faixa etária pediátrica⁷³. As crianças são particularmente propensas ao desenvolvimento de choque pois, diferenças relacionadas à fragilidade capilar podem torná-las mais suscetíveis à síndrome de extravasamento capilar do que os adultos⁷⁴.

1.6. Quadro clínico

Na história natural da doença os sintomas se instalam de modo abrupto após um período de incubação de 2 a 8 dias, conhecido como período de incubação intrínseco, e seguem três fases:

Fase febril inicial: Surgem febre alta que dura de 2 a 7 dias, calafrios, cefaleia intensa e de localização predominantemente frontal, dor retro-orbitária, astenia e dor musculoesquelética importantes, sintomas estes frequentemente associados a anorexia, náuseas e vômitos. Enxantema maculopapular ou morbiliforme pruriginoso pode aparecer tanto nas primeiras 24 horas da fase febril quanto após a remissão da febre (Figura 10). A contagem total de leucócitos está diminuída, pode ocorrer trombocitopenia e fenômenos hemorrágicos leves⁷¹. Em relação à faixa etária pediátrica, a ocorrência de doença febril inespecífica de curta duração, acompanhada de faringite, rinite e tosse discreta, é

frequentemente observada em lactentes e pré-escolares. Este quadro febril pode ser acompanhado de exantema maculopapular dificultando o diagnóstico de dengue baseado exclusivamente o quadro clínico⁷⁵. Uma criança com dengue pode ser assintomática, apresentar-se com uma síndrome febril viral clássica ou com sinais e sintomas inespecíficos tais como adinamia, sonolência, recusa da alimentação e de líquidos, vômitos e diarreia. Nos menores de dois anos de idade, sintomas como cefaleia, dor retro-orbitária, mialgias e artralgias podem manifestar-se por choro persistente, astenia e irritabilidade, geralmente com ausência de manifestações respiratórias, podendo-se confundir com outros quadros infecciosos febris, próprios dessa faixa etária.



Figura 10. Exantema típico da dengue. Erupção eritemato-edematosa da pele entremeada com ilhas de pele sã. (A): Fonte: An Bras Dermatol. 2007;82(4):291-305. (B): Fonte: NEJM 2012; 366:1423-32.

Fase crítica: No momento da defervescência, paralelamente à diminuição da febre, podem aparecer manifestações hemorrágicas que variam desde petéquias na pele e mucosas a hemorragias gastrointestinais relacionadas tanto à fragilidade capilar quanto à acentuada trombocitopenia com potencial evolução para quadro de maior gravidade, choque e óbito⁷⁶. Nota-se nesta fase que sangramentos de grande monta estão associados com o choque profundo pela combinação de trombocitopenia, hipóxia e acidose que leva à falência múltipla de órgãos e à coagulação intravascular disseminada⁷⁷. Em crianças, sobretudo nos menores de cinco anos, o início da doença pode passar despercebido e o quadro grave da fase crítica ser

identificado como a primeira manifestação clínica, surgindo geralmente em torno do terceiro dia de doença, acompanhado ou não de diminuição da febre. Nestes pacientes o agravamento costuma ser súbito, diferente do agravamento no adulto que ocorre de forma gradual⁷¹.

Fase de recuperação espontânea: A dengue clássica é usualmente autolimitada, porém a convalescença é geralmente prolongada pela astenia retardando a retomada das atividades escolares e laborais do indivíduo⁷¹.

A classificação tradicional da OMS implantada desde 1974, baseada na experiência com dengue pediátrica na Tailândia e revisada em 1997, classificava a doença em Dengue clássica ou Febre da Dengue (FD), Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD). Entretanto esta classificação apresentava limitações sobretudo em pacientes com sintomas de maior gravidade. Baseado nesses fatos o *Tropical Disease Research* (TDR), braço da OMS, conduziu um estudo multicêntrico em sete países da Ásia e América Latina e, deste estudo surgiu a proposta de um novo esquema de classificação para dengue⁷⁸. A atual classificação da OMS/TDR propõe que a doença seja vista de modo contínuo podendo evoluir para cura ou para formas graves a partir de qualquer fase e independente do quadro inicial ser grave ou não. Este modelo visa chamar atenção de pacientes e profissionais de saúde quanto aos sinais que alertam para gravidade, o que permite rápida intervenção no sentido de diminuir e evitar desfechos fatais (Figura 11).

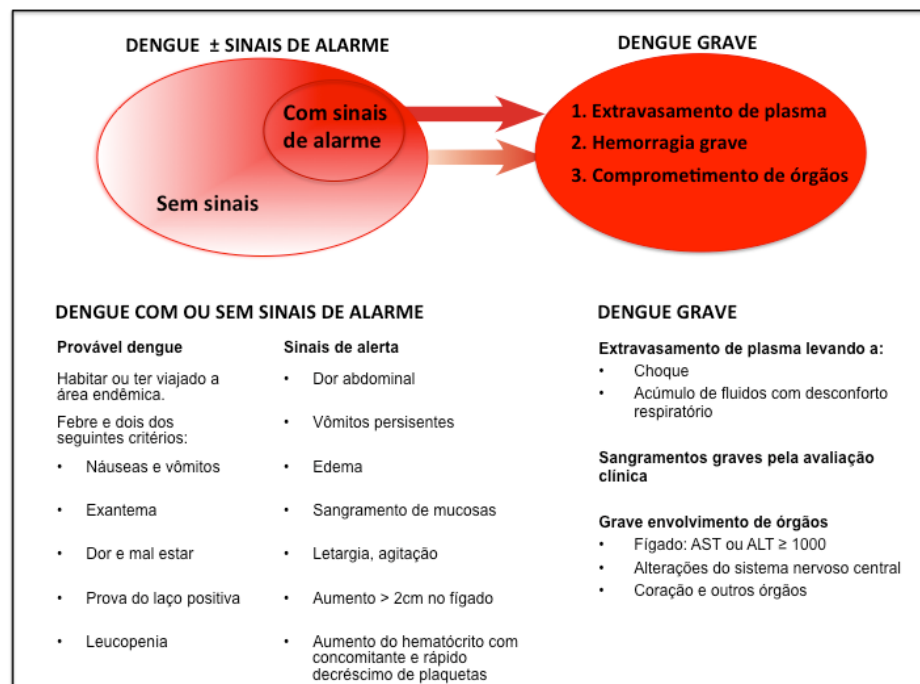


Figura 11. Classificação de casos de dengue e níveis de gravidade. Fonte: WHO Library Catalog Publication Data. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Chapter 1: Epidemiology, burden of disease and transmission . Pag 11, 2009.

1.7. Manifestações clínicas atípicas

Em frequência cada vez maior, registram-se casos de comprometimento do sistema nervoso central tanto durante a fase aguda quanto após a convalescença, bem como casos de comprometimento hepático e esplênico. Nos quadros com envolvimento do sistema nervoso central podem ocorrer cefaleia, vômitos, convulsão e agitação acompanhados ou não de meningismo⁷¹. Em áreas endêmicas de dengue torna-se importante aventar a hipótese de envolvimento do DENV em pacientes com síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalite e mononeuropatias que foram acometidos por infecção viral pregressa dias ou semanas atrás, principalmente nos casos oligossintomáticos^{79; 80; 81}. Em relação ao comprometimento esplênico, quadros mais graves de ruptura do órgão são complicações raras da doença e que podem não ser diagnosticados ao serem interpretados como síndrome do choque da dengue⁸². Quanto ao fígado, o aumento das transaminases é frequente e proeminente na dengue sendo que a hepatite reativa ocorre em altas porcentagens nos pacientes com infecção pelo vírus e podem evoluir com quadros graves potencialmente fatais^{83; 84}. Quadros de colecistite alitiásica geralmente autolimitados podem ocorrer e devem ser investigados em pacientes que apresentem dor abdominal importante e persistente como sinal de alerta e, de modo geral, a conduta é expectante com remissão espontânea⁸⁵.

1.8. Dengue na gestação

Infecção pelo DENV durante o período gestacional requer diagnóstico e tratamento precoces uma vez que o estado gravídico aumenta as chances de desenvolvimento de formas mais graves da doença e gera riscos de transmissão vertical do vírus, nascimento prematuro e aborto. A idade gestacional na qual ocorre a infecção pelo DENV parece ser significativa, sendo que os períodos iniciais ou finais da gestação parecem apresentar pior prognóstico⁸⁶. A correta incidência de dengue em gestantes não é totalmente conhecida e a patogênese neonatal pouco entendida. Quadros de febre, exantema petequial, trombocitopenia, leucopenia, elevação de enzimas hepáticas, hepatomegalia, derrame pleural, prematuridade, mal formações fetais, aborto e baixo peso ao nascer têm sido relatados e desfechos fetais adversos podem ser atribuídos ao comprometimento da circulação feto-placentária provocado pelo dano endotelial⁸⁷. A transferência transplacentária de anticorpos IgG específicos que ocorre

durante a gestação pode explicar o desenvolvimento de doença grave em casos de infecção primária em crianças, uma vez que, em níveis subneutralizantes, estes anticorpos têm importante papel na dengue hemorrágica neonatal⁸⁸. A apresentação clínica nas grávidas pode ser atípica pois a hemodiluição própria da gestação normal pode mascarar a hemoconcentração associada ao extravasamento plasmático da FHD, dificultando o diagnóstico da doença grave⁸⁹. Diagnóstico de infecção pelo DENV deve ser considerado nas gestantes com doença febril residentes em áreas endêmicas, sobretudo nos períodos de epidemias. O diagnóstico diferencial de formas mais graves da dengue torna-se importante em gestantes com quadro de pré-eclâmpsia e eclâmpsia uma vez que tal patologia também cursa com elevação de enzimas hepáticas e plaquetopenia e a hipertensão pode complicar a fase de convalescença se houver excesso de infusão de fluidos no tratamento da dengue. A infecção por si só é frequentemente tratada conservadoramente não havendo indicação de intervenções obstétricas salvo em casos de complicações maternas ou fetais associadas⁹⁰.

1.9. Diagnóstico clínico

É considerado caso suspeito de dengue, devendo ser notificado, todo paciente que apresente febre com duração máxima de 7 dias e, pelo menos, dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro-orbitária, exantema, prostração, mialgia, artralgia¹¹. Os sintomas são similares aos de outras infecções febris agudas como malária, tifo, leptospirose, sarampo, rubéola, gripe e várias arboviroses, todas elas incluídas no diagnóstico diferencial com a dengue. O quadro clínico clássico da dengue é mais comum em adolescentes e adultos; já em pediatria, o diagnóstico clínico da dengue torna-se complexo, pois a sintomatologia é muito semelhante à de outras infecções febris agudas comuns da infância como, por exemplo, escarlatina, exantema súbito, rubéola e sarampo. A anamnese deve ser dirigida investigando-se o histórico e a cronologia do quadro, observando dados epidemiológicos como presença de casos de dengue no domicílio ou local de trabalho e viagens para locais onde há dengue. O paciente ou responsável deve ser interrogado sobre o quadro inespecífico, presença de sinais de alerta ou fenômenos hemorrágicos, medicamentos em uso e se há doenças crônicas associadas como, por exemplo, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, anemia falciforme e doença renal crônica. Em seguida, o exame físico deverá ser completo observando-se os sinais vitais, a ectoscopia, exame de cada segmento corporal e exame básico do sistema nervoso.

Como parte do exame clínico, a prova do laço é realizada em todos os pacientes com suspeita de dengue. Brevemente, o manguito de um esfigmomanômetro é insuflado até o valor da média da pressão arterial e mantido por 5 minutos em adultos e 3 minutos em crianças ou até o aparecimento de petéquias ou equimoses. Conta-se o número de petéquias em área de 2,5 cm² de modo que a prova do laço será positiva se houver mais de 20 petéquias no adulto e mais de 10 petéquias nas crianças (Figura 12). Com estes dados, o paciente poderá ser classificado quanto ao nível de risco e uma conduta individualizada poderá ser tomada.



Figura 12. Prova do laço positiva em paciente com suspeita de infecção pelo vírus da dengue. Notam-se numerosas petéquias após a retirada do manguito. Fonte: arquivo pessoal.

1.10. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo da infecção pelo DENV somente pode ser realizado laboratorialmente. Basicamente, o diagnóstico pode ser feito em duas fases da doença: durante o período febril, quando há viremia permitindo a detecção de RNA e antígenos virais como NS1 e logo depois do período febril até algumas semanas, quando há grandes quantidades de anticorpos IgM e IgG. Os métodos de isolamento viral permanecem como padrão ouro para diagnóstico definitivo, mas os testes sorológicos para detecção de anticorpos

dos tipos IgM e/ou IgG são os mais utilizados. Técnicas de biologia molecular para detecção do RNA viral vem sendo amplamente utilizadas atualmente. A definição sobre qual o teste mais adequado a ser utilizado vai depender em que fase da doença se encontra o indivíduo (Figura 13).

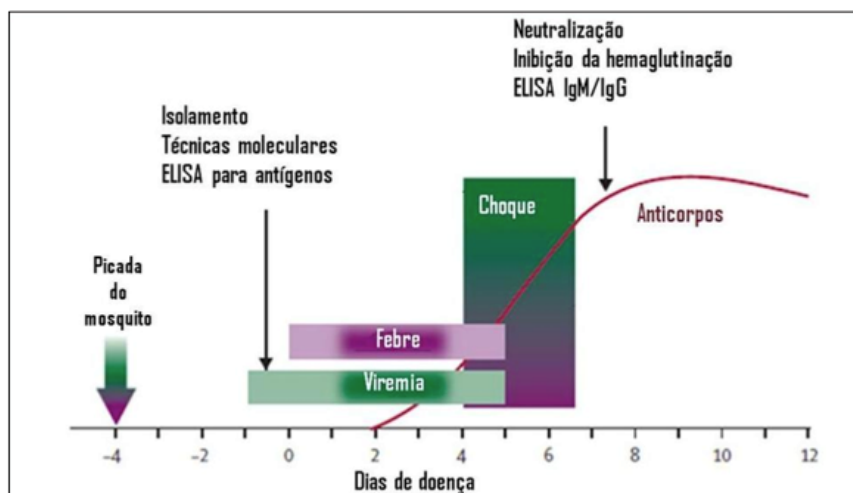


Figura 13. Esquema ilustrativo de testes diagnóstico para dengue e tempo em que é mais adequado a utilização de cada um deles. Fonte: Modificado de Lancet 2007; 370:1644-52

1.10.1. Principais exames complementares inespecíficos

Hemograma: É um exame recomendado para todo paciente com suspeita de dengue permitindo classificar o risco do paciente e monitorar sua evolução. Tem quatro parâmetros essenciais a serem observados: hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais e contagem de plaquetas. São comuns o aumento do hematócrito que indica uma hemoconcentração devido à perda de líquidos do leito vascular para o interstício, a leucopenia por ação viral direta ou inibição das células mielóides progenitoras e plaquetopenia. Esta última pode ser causada por infecção dos megacariócitos, alterações na células do endotélio, ativação do complemento ou pela produção de anticorpos antiplaquetários. Algumas dessas alterações estão relacionadas com a gravidade da doença e indicam a necessidade de intervenção terapêutica com finalidade de reduzir a mortalidade⁹¹.

Transaminases: Útil para pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de dengue que necessitem de avaliação da função hepática nos casos de hepatomegalia dolorosa.

1.10.2. Principais exames complementares específicos

Isolamento viral

O principal método utilizado para o isolamento viral é a inoculação da amostra suspeita seja em mosquitos, em cultura de células ou em camundongos recém-nascidos. Como a viremia coincide com o período febril, o índice de isolamento é significativamente maior naquelas amostras coletadas até o sexto dia de instalação da doença⁹². O vírus da dengue normalmente não apresenta bom crescimento *in vitro* e, até o momento, um dos mais sensíveis métodos de isolamento é *in vivo* através da inoculação em mosquitos. Quatro espécies, nas quais machos e fêmeas são igualmente susceptíveis, têm sido usadas para isolamento viral: *Aedes Aegypti*, *Aedes Albopictus*, *Toxorhynchites amboinensis* e *Toxorhynchites splendens*. Para diminuir o risco de infecção laboratorial, podem ser usados mosquitos *Aedes* machos ou mosquitos não hematofágicos como o *Toxorhynchites*. Após dez dias de incubação a presença do vírus é avaliada nas glândulas salivares dos mosquitos através de imunofluorescência direta. O isolamento viral por inoculação em mosquitos tem como desvantagens, além do risco de infecção laboratorial, o fato de ser uma técnica excessivamente laboriosa e de necessitar da criação e manutenção de um insetário para produção de um grande número de mosquitos, o que não está disponível na maioria dos laboratórios de virologia⁹³. Em relação à inoculação em culturas de células, método mais utilizado para isolamento viral, são comumente empregadas células C6/36 (*Aedes albopictus*), AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*) e RA-284 (*Toxorhynchites amboinensis*) derivadas de mosquitos, além de células de rim de macaco verde africano (células VERO). Após o período de aproximadamente uma semana de inoculação das células, o vírus pode ser detectado por imunofluorescência ou por métodos moleculares. A inoculação em cultura celular é um método de alta especificidade, porém não é usado rotineiramente porque demanda longo período de tempo (usualmente mais que sete dias) para se completar o teste. Finalmente, o isolamento viral por inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos é mais sensível que a cultura celular, entretanto, este é um método laborioso, caro e de difícil implementação na rotina.

Exames sorológicos

Os cinco principais métodos sorológicos para detecção de anticorpos antidengue são inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), neutralização e ELISA (do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*). A IH foi o método padrão durante muitos anos

devido sua alta sensibilidade, fácil execução e boa reprodutibilidade. Detecta anticorpos após vários anos de infecção sendo ferramenta útil em inquéritos epidemiológicos e na diferenciação das infecções primária e secundária com base nos títulos de IH. As principais desvantagens que limitam o uso da reação de IH são a necessidade de tratamento prévio das amostras para remover inibidores e aglutininas inespecíficos da IH, a pouca especificidade devido a reações cruzadas, a necessidade de amostras pareadas (fase aguda e fase convalescente) e a incapacidade de identificar o sorotipo viral envolvido⁹². O teste de FC é baseado no princípio de que o complemento será consumido pela reação antígeno-anticorpo. Os anticorpos detectados são específicos na infecção primária contribuindo para determinação do sorotipo, porém aparecem tardiamente e permanecem por curtos períodos limitando o uso deste teste para inquéritos epidemiológicos. A neutralização é o mais sensível e específico método sorológico para detecção de anticorpos antidengue, podendo ser usada para identificar infecção primária durante a fase de convalescença, mas não é viável em infecções secundárias e terciárias. O ELISA é considerado, nos dias atuais, o mais útil teste de detecção de anticorpos antidengue devido sua alta sensibilidade e facilidade técnica. Os anticorpos podem ser detectados tanto na fase aguda, a partir do quinto dia do início dos sintomas (anticorpos da classe IgM), quanto na fase de convalescença (anticorpos da classe IgG). Os títulos de IgM são significativamente mais altos na infecção primária do que nas infecções secundária e terciária, quando sua produção é muito baixa e transitória; deste modo o índice dado pela razão entre as leituras ópticas dos títulos de IgM/IgG pode ser usado para diferenciação entre infecção primária e secundária⁹⁴. Este método torna-se inviável para a proposta de diagnóstico precoce uma vez que detecta anticorpos a partir do quinto dia de instalação dos sintomas.

Exames de detecção direta

A presença de antígenos do vírus da dengue em soro ou células mononucleares periféricas de pacientes pode ser determinada por ELISA sendo que em células mononucleares esta técnica geralmente mostra maior índice de detecção em relação às amostras de soro⁹⁵. Biopsias de tecidos ou autopsias podem ser analisadas através da técnica de imunohistoquímica para confirmar a presença do vírus^{96; 97}. Outro importante antígeno para o diagnóstico é a glicoproteína não estrutural 1 (NS1). A forma hexamérica da NS1 é expressa na superfície das células infectadas e secretada para a circulação sanguínea durante a fase aguda da infecção podendo ser detectada em amostras de soro do primeiro ao nono dia após a

instalação da febre⁹⁸. Altos níveis de NS1 foram demonstrados por ELISA em pacientes na fase aguda da doença^{99; 100}.

Exames de biologia molecular

As técnicas moleculares, cujo objetivo é a detecção do genoma viral, têm importante papel no diagnóstico da dengue uma vez que são capazes de identificar o vírus na fase aguda da doença e, em algumas metodologias, quantificar a carga viral. A transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) convencional e em tempo real possibilita a amplificação de sequências genômicas específicas de RNA delimitadas por iniciadores (*primers*). Na RT-PCR convencional, uma alíquota da reação de amplificação submetida à eletroforese em gel de agarose que posteriormente é corado, permite a visualização do produto de amplificação sob iluminação ultravioleta para confirmação da detecção do genoma viral. Vários protocolos de RT-PCR convencional foram desenvolvidos para diagnóstico da dengue^{101; 102; 103}. Este método apresenta alta sensibilidade e especificidade, mas requer múltiplas etapas e é passível de contaminação com o próprio produto de amplificação gerando resultados falsos positivos. A aplicação de técnicas de fluorescência à RT-PCR juntamente com instrumentação adequada capaz de combinar amplificação, detecção e quantificação levou ao desenvolvimento de uma variação deste método denominado RT-PCR em tempo real. A RT-PCR em tempo real, assim como a convencional, possibilita a amplificação de fragmentos genômicos, contudo a detecção dos produtos é feita diretamente na plataforma de instrumentação utilizando marcadores fluorescentes e métodos sensíveis de mensuração da fluorescência emitida. O método não requer manipulação após a amplificação sendo por isso chamado de sistema fechado ou homogêneo. As principais vantagens deste sistema homogêneo são: redução do tempo necessário para a realização do teste, baixo risco de contaminação com o produto amplificado e quantificação da carga viral por comparação com uma curva padrão¹⁰⁴. Durante a fase exponencial de amplificação é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado *threshold* ou limiar e pode ser calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado por cada amostra é significativamente maior que a fluorescência basal e a quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este limiar pré-estabelecido é chamado de *cycle threshold* (C_t), o qual é inversamente proporcional à

quantidade inicial do alvo presente na reação. A fluorescência emitida é captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador onde um *software* faz a análise final dos dados. A RT-PCR em tempo real apresenta sensibilidade maior que o isolamento e a RT-PCR convencional^{105; 106}.

Exames de imagem

A ultrassonografia de abdome pode ser um importante exame complementar no diagnóstico da dengue. Os principais achados em estudo realizado com pacientes entre o quinto e o sétimo dia após instalação dos sintomas foram: espessamento da parede da vesícula biliar, colecistite, derrame pleural e pericárdico, hepatomegalia e esplenomegalia¹⁰⁷.

1.11. Tratamento

O tratamento deve ser individualizado conforme a classificação de risco que o paciente recebeu após a anamnese e o exame físico. Em caso de pacientes portadores de condições clínicas especiais e comorbidades há necessidade de acompanhamento clínico diferenciado uma vez que estes indivíduos podem apresentar evolução desfavorável. São considerados pacientes com condições clínicas especiais: lactentes (crianças menores de 2 anos de idade), gestantes, adultos com idade acima de 65 anos, pacientes com hipertensão arterial ou doenças cardiovasculares graves, diabetes *mellitus*, DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica), doenças hematológicas crônicas (principalmente anemia falciforme), doença renal crônica, doença ácido péptica e doenças auto imunes. A Secretaria de Vigilância em saúde do Ministério da Saúde do Brasil, baseando-se em critérios da OMS, organiza, atualiza e distribui para os estabelecimentos de saúde de todo o território nacional fluxogramas de classificação de risco e manejo do paciente com suspeita de dengue como descrito a seguir:

Grupo A - Pacientes que não apresentem condições clínicas especiais, risco social ou comorbidades associadas e que estejam sem sinais de alarme e/ou de choque e sem sangramentos espontâneos de pele (prova do laço negativa) devem ser acompanhados ambulatoriamente com hidratação oral, antitérmicos e analgésicos (dipirona ou paracetamol), antieméticos quando necessário e repouso. Devem também receber orientações sobre a necessidade de retorno em caso de sinais de alarme.

Grupo B - Em pacientes sem sinais de alarme e/ou de choque, porém com sangramento de pele espontâneo ou induzido (prova do laço positiva), ou condição clínica especial ou risco social deverão ser coletadas amostras de sangue para hemograma, sorologia e isolamento viral. Naqueles com hematócrito normal procede-se, como no Grupo A, hidratação oral, antitérmicos e analgésicos (dipirona ou paracetamol), antieméticos quando necessário e repouso. Pacientes com hemoconcentração devem receber reposição hídrica oral ou venosa supervisionada até melhora e liberação para continuidade da hidratação em domicílio. Caso haja piora da hemoconcentração ou se iniciem sinais de alarme, o paciente será classificado e conduzido como Grupo C.

Grupo C – Os pacientes com algum sinal de alarme, mesmo sem manifestação hemorrágica deverão permanecer em leito de internação. Após coletadas amostras de sangue para os exames obrigatórios, procede-se uma hidratação endovenosa imediata com 20 mililitros de solução reidratante por quilo de peso por hora, reavaliação clínica a cada duas horas e em seguida manutenção da infusão de líquidos até melhora hemodinâmica e alta para seguimento ambulatorial. Pacientes com resposta inadequada após a repetição da fase de hidratação expansiva por três vezes, passam a ser classificados e manejados no grupo de risco D.

Grupo D – São aqueles pacientes com sinais de choque, hemorragia grave e disfunção grave de órgãos. Estes deverão ser tratados em leito de terapia intensiva até melhora clínica que os faça ser classificados de volta ao Grupo C . Em caso de respostas inadequadas, deverão ser investigadas hemorragias, coagulopatias de consumo, hiper hidratação e insuficiência cardíaca. Pode ser necessário utilização de vitamina K, crioprecipitado, transfusão de concentrado de hemácias ou de plasma.

Independente do grupo de risco no qual o paciente foi classificado, a precocidade na reposição hídrica e de eletrólitos por via oral ou intravenosa tem um papel crucial na redução da letalidade uma vez que evita o colapso circulatório. Nos casos de doença grave a letalidade pode chegar a 5%, mas isto se reduz para menos de 1% com o tratamento apropriado²⁴. O fluxograma que resume a classificação de risco e manejo dos pacientes pode ser visto no Anexo 1.

Experiências alternativas de tratamento tem sido relatadas na literatura, com casos selecionados, utilizando cloroquina, metilprednisolona, balapiravir e imunoglobulina, mas ainda sem evidências a favor de qualquer terapia específica para dengue¹⁰⁸. Cloroquina e hidroxicloroquina são derivados sintéticos da 4-aminoquinolina com ação e utilização primária malárica que, devido ao fato de apresentarem propriedades anti-inflamatórias, são

usados em patologias como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico. Porém, a cloroquina ainda não se mostrou capaz de reduzir a duração da viremia nem da antigenemia NS1 de pacientes com dengue¹⁰⁹. Estas substâncias são alcaloides que se comportam como bases fracas e se acumulam em vesículas ácidas como as lisossômicas levando ao aumento do pH no interior destas vesículas¹¹⁰. Este é provavelmente um mecanismo que interfere na fusão da membrana viral com a membrana lisossômica bloqueando a entrada do material genético viral no citoplasma da célula infectada e com isto inibindo a replicação do vírus da dengue como visto em experimentos *in vitro*¹¹¹. Em relação aos corticoides como a metilprednisolona, seu uso não é recomendado pela OMS embora haja relatos de que possa trazer algum benefício para pacientes com dengue grave^{112; 113}. Quanto ao balapiravir, estudo randomizado duplo cego não demonstrou evidências de a droga produza melhora clínica, virológica ou imunológica quando utilizada em pacientes com dengue¹¹⁴. Por outro lado, pequeno sucesso foi relatado por autores brasileiros com o uso de altas doses de imunoglobulina em casos de trombocitopenia grave em uma série de cinco pacientes¹¹⁵. Porém ensaios clínicos randomizados não têm mostrado o mesmo benefício¹¹⁶. Outra substância promissora pode ser a pentoxifilina, uma metilxantina que inibe as fosfodiesterases dos nucleotídeos cíclicos e antagonizam as ações da adenosina mediadas por receptor. A inibição resulta em acúmulo de cAMP e cGMP e tem efeitos anti-inflamatórios e propriedades imunoregulatórias^{117; 118}. Em 2012, Doris Salgado e colaboradores conduziram um estudo piloto avaliando os efeitos da pentoxifilina em 55 crianças com febre hemorrágica da dengue. Neste estudo, a pentoxifilina mostrou-se capaz de diminuir a ação pró-inflamatória do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a mais importante citocina envolvida na resposta inflamatória aguda. TNF- α tem sido associado ao extravasamento vascular de plasma que ocorre na dengue grave pela produção de alterações imunológicas e endoteliais. A pentoxifilina tem ainda a vantagem de ser uma medicação de baixo custo o que viabiliza seu uso em larga escala¹¹⁹.

1.12. Profilaxia e controle

Até o momento, a prevenção e o controle da dengue dependem de ações de combate às formas adultas do *Aedes aegypti* utilizando inseticidas e estratégias de conscientização comunitária para eliminação de potenciais criadouros das larvas dos mosquitos. Estratégias

que utilizam manipulação genética do mosquito vetor têm sido descritas como alternativa para controle da doença através da construção e liberação no meio ambiente de mosquitos transgênicos refratários à infecção pelo vírus da dengue¹²⁰. Embora este controle do vetor seja e continuará sendo ferramenta importante no combate à dengue, está clara a necessidade da vacinação em massa. A vacinação é potencialmente a melhor e mais eficaz estratégia para o controle da doença e, por sua vez, evitaria óbitos por dengue hemorrágica¹²¹. As vacinas têm importante papel na prevenção a doenças causadas por flavivírus como, por exemplo, febre amarela, encefalite japonesa e encefalite transmitida por picada de carrapato, mas para dengue a vacina ainda é um desafio. Neste sentido, desde a década de 70, a OMS patrocina diversos estudos para desenvolvimento destas vacinas seja a partir de vírus vivos atenuados, de partículas virais, com subunidades proteicas, vacinas de DNA ou vacinas quiméricas¹²². Infecções prévias aumentam as chances de desenvolvimento de doença grave e por isso uma vacina eficaz e segura deve induzir proteção tetravalente e duradoura. Somado a isto, a falta de modelos animais para testar a efetividade das vacinas contra as formas hemorrágicas da doença sempre foi um desafio para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue. Contudo, estudos indicam que vacinas seguras e eficazes contra os quatro sorotipos podem estar disponíveis em um futuro próximo¹²³. Embora os resultados preliminares dos atuais testes clínicos sejam encorajadores com todas elas, os esforços para desenvolvimento de uma vacina para dengue têm seu foco principal nas vacinas de vírus vivos atenuados, vírus inativados e subunidades virais, sendo as vacinas de vírus atenuados as mais pesquisadas e mais bem sucedidas^{124; 125}. Além da resposta humoral, é fundamental avaliar os aspectos relacionados à resposta celular após a vacinação, tendo em vista que a estimulação excessiva dos linfócitos T parece contribuir para a fisiopatogenia da FHD, porém o papel da imunidade celular mostra-se de menor importância na proteção contra reinfecção^{68;126; 127}. Em um dos primeiros estudos sobre a imunogenicidade e reatogenicidade, uma vacina tetravalente de vírus vivos atenuados foi aplicada por via subcutânea no esquema de três doses e dois reforços em crianças tailandesas de 5 a 12 anos de idade. Efeitos adversos leves e transitórios foram observados após a primeira dose, mas não com as doses subsequentes e, após a terceira dose 78% a 100% das crianças apresentaram soroconversão para todos os sorotipos¹²⁸. No ano de 2005 já existiam duas vacinas de vírus atenuados em estágios avançados de avaliação e apresentando boas taxas de soroconversão em crianças e adultos, uma delas licenciada pela Sanofi Pasteur e desenvolvida na Tailândia e a outra licenciada pela GlaxoSmithKline e desenvolvida nos Estados Unidos da América⁷⁰. Em 2009, testes clínicos realizados com uma vacina tetravalente quimérica entre o vírus da dengue e o vírus vacinal da febre amarela, produzida

pela Sanofi Pasteur mostraram que a soroconversão tetravalente foi de 100% em adultos nos Estados Unidos da América e de 88% a 100% em crianças Mexicanas entre 2 a 5 anos de idade. Diante do sucesso destes testes clínicos a submissão desta vacina aos órgãos regulatórios é prevista para um período de 5 anos, ou seja em 2014¹²⁹. Até abril de 2011, mais de 6.000 voluntários já haviam recebido ao menos uma dose desta vacina em países endêmicos do mundo como Brasil, Colômbia, Honduras, Malásia, Filipinas, porto Rico, Tailândia, e Vietnã¹³⁰. Atualmente, das vacinas em desenvolvimento pela GlaxoSmithKline (GSK), Inviragen, Merck, *US National Institutes of Health* (NIH) e Sanofi Pasteur, quatro são de vírus vivos atenuados, uma de subunidades virais e uma de vírus inativado. O NIH licenciou a produção de sua vacina para quatro laboratórios de países em desenvolvimento: Índia, Vietnã e Brasil. Em paralelo, deve ser levado em conta o custo de produção de uma vacina tetravalente de vírus vivos atenuados para uso em larga escala sobretudo para países em desenvolvimento. Neste sentido, um estudo conduzido pelo Instituto Butantan levando em consideração custos diretos com materiais, custos diretos com recursos humanos, custos indiretos e de depreciação concluiu que seria possível produzir 60 milhões de doses por ano de uma vacina tetravalente a um custo de \$ 0,20 a dose em frascos de 10 doses e de \$ 0,70 a dose em frascos de dose única. Deste modo a vacina poderia ser disponibilizada a um preço que a maioria dos ministérios da saúde dos países em desenvolvimento poderia custear¹³¹.

A proteção oferecida por repelentes para insetos também é importante ferramenta na prevenção da dengue. O repelente ideal é aquele acessível do ponto de vista econômico, seguro, de fácil aplicação e ainda que apresente características como boa eficácia contra a maior variedade possível de insetos, não ser irritante para a pele, ser inodoro ou de odor agradável, deixar o mínimo possível de resíduo na pele e roupas, ser quimicamente estável e ter efeito duradouro¹³². O N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), repelente de amplo espectro e grande eficácia, é largamente utilizado desde 1956 para proteção contra mosquitos e carrapatos. É seguro e de baixo risco de intoxicação, mesmo em crianças e gestantes, quando usado de modo correto e nas quantidades adequadas na pele ou em roupas¹³³. A educação do usuário tem papel fundamental na segurança do produto no sentido de ler os rótulos em busca da concentração adequada, não aplicar no olhos e na boca, não fazer uso simultâneo com protetores solares, não aplicar nas mãos das crianças, não deixa-las dormir toda a noite com o produto no corpo e mantê-lo longe de seu alcance¹³⁴. Seu mecanismo de ação é promover uma barreira de odor ou sabor desagradável que interfere nos receptores sensoriais dos insetos impedindo que os mesmos entrem em contato com a pele. Concentrações de 10 a 35% em aplicações feitas a cada 4 a 6 horas geralmente são eficazes para proteção, porém não deve ser

usado em crianças menores de dois meses de idade e em adultos não deve ser ultrapassada a concentração máxima de 30% no sentido de prevenir possíveis efeitos adversos¹³⁵. Em casos de intoxicação podem ocorrer encefalopatia, convulsões e urticária devendo ser lembrado que sua absorção sistêmica aumenta em até seis vezes quando usado simultaneamente com protetor solar. Os casos fatais registrados geralmente estão relacionados à ingestão intencional do produto¹³⁶. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que o DEET não seja usado em menores de dois anos de idade mesmo nas formulações infantis (DEET 5 a 10%) e não deve ser aplicado mais que três vezes ao dia em menores de doze anos de idade. Para maiores de 12 anos e adultos a concentração máxima permitida é de 30% de DEET¹³⁷. Outro repelente muito usado em nosso meio para tratamento de escabiose, pediculose e ftiíase, disponível em várias apresentações, é o piretróide sintético denominado permetrina. O composto é indicado para uso em maiores de dois anos de idade e age como repelente e inseticida através do bloqueio de canais de sódio das células do sistema nervoso dos insetos provocando morte por paralisia. Em altas doses pode provocar efeitos neurotóxicos, aumento da temperatura corporal e irritação da pele e mucosas. A picaridina ou icaridina, [2-(2-hidroxi-1-etil)-ácido 1-piperidino-carboxílico ester 1-metilpropil], comumente usada na Europa e Austrália, foi recentemente aprovada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) como alternativa em substituição ao DEET por apresentar eficácia similar com menos efeitos tóxicos¹³². Trata-se de um repelente com muitas características ideais cujo mecanismo de ação é a formação de camada de barreira que impede picadas de mosquitos e carrapatos. Indicado para ser usado a partir dos dois anos de idade em preparações com concentrações de 20% a 25% fornecendo 8 a 10 horas de proteção sem relação com efeitos tóxicos importantes e sem interação com protetores solares¹³⁸. Por outro lado, pesquisas recentes apontam para uma nova abordagem com foco na biologia olfatória dos insetos. As fêmeas se utilizam do odor liberado pela pele humana para localizar sua potencial refeição sanguínea através da ligação destas moléculas de odor com proteínas que as transportam até os neurônios olfatórios dos insetos. Teorias preliminares supõe que a destruição destes ligantes pode diminuir as picadas ao interferir neste mecanismo olfatório¹³⁹. Além destes repelentes, é interessante que pais e cuidadores de crianças considerem a utilização de repelentes naturais a base de óleos essenciais de plantas como alternativa segura para a prevenção de picadas de insetos¹⁴⁰. O óleo de citronela é um repelente de insetos com pouco ou nenhum efeito adverso em uso há mais de cinquenta anos na forma de gel, loção, velas e sprays sem relato de efeitos de toxicidade ao ser humano ou ao meio ambiente. O mecanismo de ação do óleo de citronela é mascarar, através de seu odor característico, o gás carbônico e o ácido láctico que, quando

liberados pela pele humana, atraem os mosquitos. Pode ser usado na pele, em roupas ou em superfícies inertes. Outro óleo essencial é o óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*), que contém o eugenol, seguro para o meio ambiente e não tóxico para os seres humanos em diversas aplicações como por exemplo suas propriedades antimicrobianas contra bactérias e fungos que provocam infecções cutâneas. Combinações contendo 10% de óleo de cravo forneceram proteção completa durante quatro horas e 95,7% de proteção cinco horas após a aplicação na pele das pernas de voluntários ¹⁴¹.

1.13. Justificativa para este trabalho de doutorado

A dengue tem sido cada vez mais frequente entre as doenças febris agudas da infância e sua apresentação clínica é muito semelhante à de outras doenças comuns em pediatria. No Brasil, até 2006 a faixa etária de 15 a 49 anos foi responsável por 65% do total de casos notificados, seguida pelos menores de 15 anos que representam 18,5% dos casos. Entretanto, houve uma mudança na distribuição com aumento do número de casos em menores de 15 anos, passando esta faixa etária a concentrar 28% dos casos em 2008 segundo dados do Ministério da Saúde. Nas Américas, tanto a incidência quanto o real impacto desta doença na população pediátrica têm sido muito pouco estudados o que, de certo modo, é compreensível dado as particularidades desta população como, por exemplo, as dificuldades técnicas na obtenção de amostras necessárias aos protocolos de pesquisa, já tão complicados de serem aplicados em seres humanos. No entanto, sabe-se que anticorpos contra o vírus da dengue bem como genoma viral podem ser detectados não apenas no soro, mas também em outros fluidos corporais como, por exemplo, saliva e urina. Estes fluidos corporais são amostras relativamente fáceis de serem coletadas sem a necessidade de procedimentos invasivos. Recentemente, nosso grupo de trabalho isolou e identificou DENV-1 e DENV-2 no soro, urina e saliva de dois pacientes com quadro de febre e mialgia ¹⁴². Neste sentido, estudos como este permitem conhecer melhor a história natural da doença nesta faixa etária, documentar sua incidência e soroprevalência, fazer comparações com os dados obtidos pelos sistemas de vigilância epidemiológica, além de caracterizar dentro do espectro clínico da doença os sinais e sintomas peculiares em crianças, além de gerar dados e amostras para pesquisas com este e outros patógenos.

2. Objetivos

2.1. Geral

Estudar as características clínicas e laboratoriais da infecção pelo DENV em uma população de crianças de 1 a 16 anos atendidas em um serviço público de saúde na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo.

2.2. Específicos

2.2.1. Confirmar a infecção pelo vírus da dengue em casos suspeitos.

2.2.2. Diferenciar infecção primária e secundária.

2.2.3. Determinar a carga viral em amostras de sangue, saliva e urina provenientes de crianças com infecção aguda pelo vírus da dengue.

2.2.4. Avaliar a utilidade do uso de saliva e urina como amostras alternativas ao sangue para diagnóstico de infecção aguda pelo vírus da dengue por RT-PCR em tempo real.

2.2.5. Identificar os tipos virais detectados nas crianças.

2.2.6. Analisar a sintomatologia apresentada pelas crianças e os critérios de classificação de caso suspeito de dengue de acordo com a Organização Mundial da Saúde nesta população.

3. Casuística e métodos

3.1. Características do local do estudo

Ribeirão Preto, localizada 313 quilômetros a nordeste da capital do estado de São Paulo, encontra-se numa região quase totalmente desmatada por um processo iniciado para a cafeicultura e que se agravou atualmente com a agroindústria canavieira. Observa-se, em consequência disto, diferentes formas de organização do espaço geográfico com matas residuais e canaviais que entremeiam as cidades da região. A cidade tem como limites os municípios de Jardinópolis ao norte, Guatapar ao sul, Serrana ao leste, Dumont a oeste, Brodowski a nordeste, Sertãozinho a noroeste e Cravinhos a sudeste (Figura 14).



Figura 14. Mapa dos limites de Ribeirão Preto. Fonte: Plano Municipal de Saúde 2010-2013 da Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto-SP.

Ribeirão Preto tem população total de 604.682 habitantes, sendo que 165.609 (27,4%) deles pertencem à faixa etária de 0 a 19 anos de idade (faixa etária atendida pela pediatria considerando uma abrangência que varia do recém nascido ao final da adolescência) assim distribuídos: 36.091 (6%) entre 0 a 4 anos, 38.722 (6,4%) entre 5 a 9 anos, 43.333 (7,2%) entre 10 a 14 anos e 47.463 (7,8%) entre 15 e 19 anos¹⁴³. A cidade possui clima tropical com verão chuvoso (temperatura média de 25C) e inverno seco (temperatura média de 19C). Está a 518 m de altitude e tem precipitação pluviométrica média de 1.426,80 mm/ano com média anual de umidade relativa do ar de 71%. O município está dividido em cinco distritos de

saúde sendo que no Distrito Oeste está localizada a Unidade Básica de Saúde Dom Pedro I, no bairro Ipiranga, onde funciona o Centro de Saúde Escola Doutor Edgard Aché (CSE-Ipiranga). Trata-se de um ambulatório de assistência primária ligado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP e local onde foi realizado este estudo. No CSE-Ipiranga são oferecidos serviços de pediatria e puericultura, ginecologia e obstetrícia, assistência domiciliar, enfermagem, teste de triagem neonatal e vacinação para uma população de 19.839 habitantes em uma área que abrange os bairros Ipiranga, Vila Esmeralda e parte do Loteamento Planalto Verde.

3.2. Desenho do estudo

Estudo observacional descritivo do tipo série de casos com crianças de 1 a 16 anos de idade atendidas no serviço de pediatria e puericultura do Centro de Saúde Escola Dr Edgard Achê, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, no processo HCRP, número 10075/2009 (Anexo 2).

3.3. Recrutamento dos participantes e obtenção das amostras clínicas

O recrutamento das crianças incluídas neste estudo bem como a coleta das amostras de sangue, saliva e urina foram realizados com a colaboração de dois auxiliares de pesquisa bolsistas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de Março de 2010 a Outubro de 2011. Para tanto a apresentação do estudo foi feita aos pais e responsáveis enquanto aguardavam atendimento de pediatras do CSE-Ipiranga. Crianças cujos pais e responsáveis relatavam queixas compatíveis com doença febril aguda como critério de inclusão, foram convidadas a participar do estudo. Havendo interesse por parte do responsável, o mesmo foi encaminhado à sala de pesquisa para melhor esclarecimento quanto à natureza do estudo, assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e preenchimento de um formulário com dados da criança (Figura 15A). O TCLE foi formulado de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e pode ser consultado no Anexo 3. O atendimento das crianças pelos pediatras dos CSE-

Ipiranga seguiu a rotina normalmente adotada na unidade, não interferindo este estudo no fluxo da mesma. Em etapa posterior na execução do trabalho o prontuário médico de cada paciente foi revisado para coleta de informações clínicas pertinentes ao cumprimento dos objetivos do estudo. O sangue foi coletado seguindo-se as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso¹⁴⁴. Tubos coletores a vácuo ou seringas foram utilizados de acordo com a avaliação feita pelo flebotomista para cada caso respeitando-se a idade e condições de cada criança, coletando de 1 a 3,5 ml de sangue total de cada participante (Figura 15B). A saliva foi coletada por aspiração da cavidade oral utilizando pipetas plásticas do tipo Pasteur sendo o material em seguida transferido para tubos de 1,5ml (Figura 15C). A urina foi coletada em menores de 2 anos utilizando-se bolsas plásticas coletoras aderidas na região do períneo; para os maiores de 2 anos, que já apresentam controle esfíncteriano, a amostra de urina foi coletada por micção espontânea em coletores universais. As amostras clínicas foram transportadas para o laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto acondicionadas em caixa térmica com gelo reciclável.

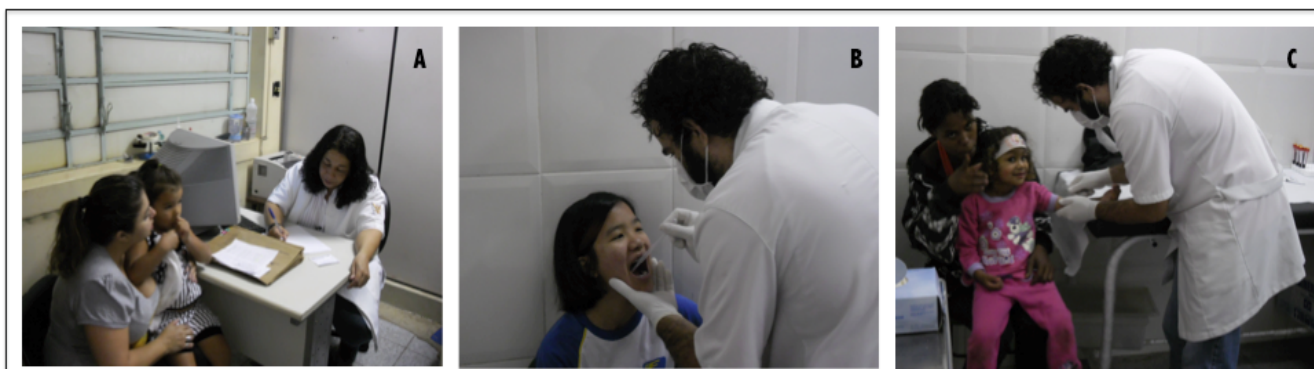


Figura 15. Recrutamento dos participantes e coleta de amostras. (A) apresentação do TCLE e preenchimento do formulário com os dados do paciente. (B) coleta de saliva por aspiração na boca com pipeta plástica de Pasteur. (C) coleta de sangue.

3.4. Purificação do RNA viral

O RNA viral foi purificado a partir de 140 μ l do soro/saliva e/ou urina utilizando o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN®, Alemanha), conforme protocolo recomendado pelo fabricante, eluído a um volume final de 80 μ l e armazenado a -70°C até o momento do uso.

3.5. RT-PCR em tempo real

Para a realização do teste foi utilizado o equipamento Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR Systems™ e o kit diagnóstico SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen™ USA). Brevemente, a mistura de reação continha: 12,5µl 2X SYBR Green, 0,5µl SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix, 5µl de RNA, 0,4µM de cada um dos *primers* 5'UTR-S (5-AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA-3') e 5'UTR-C (5 -CGC GTT TCA GCA TAT TGA AAG-3') e água destilada livre de DNase/RNase até volume final de 25µl. A etapa de RT foi realizada em temperatura de 50 °C por 1200 segundos. A fase de PCR foi realizada como segue: 95 °C por 300 segundos; 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 40 segundos e 72 °C por 30 segundos. Para determinar a especificidade do produto amplificado foi calculada a temperatura de *melting* (T_m) através da análise da curva de dissociações¹⁴⁵.

3.6. Determinação da carga viral

Para determinação da carga viral, uma curva padrão foi construída usando RNA transcrito *in vitro* em um plasmídeo contendo um fragmento de 2500 pares de base correspondentes à extremidade 5'do DENV 3 (cepa D3BR/RP1/2003). Este plasmídeo foi preparado com segue: o fragmento de 2500 pares de base foi amplificado por RT-PCR em tempo real e inserido no plasmídeo pXL (Invitrogen, USA) o qual foi usado para transformar a bactéria *Escherichia coli*. Uma alíquota de 250 µL da bactéria foi inoculada em 10 ml de meio LB+ampicilina, seguido de incubação a 37°C por 14 horas sob agitação. O plasmídeo foi purificado usando o *QIAGEN Plasmid Mini Kit* (Qiagen, Germany) seguindo as recomendações do fabricante. O plasmídeo foi linearizado através de digestão com Bam HI, submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e purificado do gel utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Germany) conforme orientações do fabricante. Para preparo do RNA, 1 µg do plasmídeo linearizado foi transcrito usando o *RNAMaxx High Yield Transcription Kit* (Stratagene, USA). O cDNA foi digerido usando o *RQ DNase* (Promega, USA) at 37°C for 20 min. Após isto, o RNA foi purificado utilizando o *QIAamp Viral RNA Kit* (QIAGEN, Germany) e a concentração foi determinada em espectrofotômetro a 260 nm. Com base na

concentração e no tamanho do produto de RNA (2500 pb), o número de cópias/ml equivalentes ao RNA genômico foi calculada. Diluições decimais seriadas foram preparadas para construção de uma curva padrão.

3.7. ELISA de captura de IgM e IgG

Para detecção de anticorpos IgM e IgG uma placa lavada 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS - *phosphate buffered saline*) e sensibilizada com 100µl de IgG de cabra anti-IgM ou anti-IgG humano (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:500 em um tampão de carbonato-bicarbonato, pH 9,6 foi incubada por 14 horas a 4°C. Cada orifício foi lavado 5 vezes com 200µl de PBS e posteriormente bloqueado com 150µl de albumina sérica bovina 4% (BSA - *bovine serum albumin*) por 2 horas em temperatura ambiente. Cada orifício foi lavado 5 vezes com 200µl de PBS e a cada um deles foi adicionado 50µl de amostra bem como de controles positivos e negativos diluídos 1:40 em PBS com 0.5% BSA. A placa foi incubada a 37 °C por 2 horas e posteriormente lavada com PBS por 5 vezes. Após as lavagens, 50µl do antígeno, contendo quantidades iguais de diluições 1:20 dos 4 sorotipos foram adicionados aos orifícios e a placa incubada a 4 °C por 14 horas. Cada orifício foi lavado 5 vezes com 200µl de PBS e adicionado 100 µl de fluido ascítico imune de camundongo (MIAF - *mouse immuneascitic fluid*) numa diluição 1:100 seguido de incubação a 37 °C por 1 hora. Adicionou-se anticorpo secundário (anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) num volume de 100µl, a placa incubada por 1 hora a 37 °C e lavada 7 vezes com PBS. Utilizou-se como substrato o ABTS (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, KPL, EUA) e, após 15 a 60 minutos de incubação a 37 °C, a reação foi interrompida com pela adição de 100µl de ácido sulfúrico 12,5% e a leitura das absorbâncias realizada em espectrofotômetro a 405 nm. Infecção primária e infecção secundária foram diferenciadas pelo índice IgM/IgG: amostras cujo resultado da razão IgM/IgG foi maior ou igual 1,2 foram consideradas infecções primárias e razão IgM/IgG menor que 1,2 infecção secundária⁹⁴.

3.8. ELISA para detecção da proteína NS1

Para detecção da proteína NS1 em amostras de soro foi utilizado o *kit* comercial para diagnóstico da dengue PLATELIA DENGUE NS1 AG (BIO-RAD, França), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, amostras de soro de pacientes com doença febril aguda foram descongelados à temperatura ambiente (22–23 °C). Controles, calibradores e amostras (50µL de cada) foram adicionados em uma microplaca com orifícios recobertos com anticorpo monoclonal anti-NS1. Anticorpo monoclonal anti-NS1 marcado com peroxidase foi adicionado na microplaca e incubado a 37 °C por 90 minutos. Após seis lavagens, o cromógeno e o substrato foram adicionados em cada orifício, a placa incubada por 30 minutos e a reação foi parada pela adição de solução de ácido sulfúrico 1N. A leitura da absorbância foi realizada a 450nm e a densidade óptica (DO) de cada amostra foi calculada através da razão entre absorbância de cada amostra e do *cut-off*. O valor de *cut-off* corresponde à média da densidade óptica da duplicata dos controles de *cut-off* do *kit*. Os resultados das amostras foram expressos como o quociente da razão entre a DO da amostra e a média da DO dos *cut-off*. A amostra foi considerada negativa quando a razão foi menor que 0,5, duvidosa quando a razão resultou entre $\geq 0,5$ e < 1 , e positiva quando a razão foi ≥ 1 , em concordância com as instruções do fabricante.

3.9. Sequenciamento para identificação dos sorotipos virais

A mistura de reação para síntese de cDNA (volume total de 40 µL) continha: 24 µL de RNA, 200 ng de *random primers* (Invitrogen, EUA), 0,25 mM de dNTP (Invitrogen, EUA), 80 U de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen, EUA), 400U de Transcriptase Reversa M-MLV (USB, EUA) e 8 µL de tampão 5X (25mM Tris-HCL [pH 8,3], 375mM KCl, 15Mm MgCl₂). A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos, seguida de uma incubação a 37 °C por 4 horas e finalmente 5 minutos a 85 °C. Posteriormente, o cDNA foi tratado com 1 U de RNase H (GIBCO, EUA) a 37 °C por 30 minutos e estocado a -20 °C até o uso. A mistura de reação da PCR contendo 2µl deste cDNA, 0,1mM de dNTP, 0,3µM do *primer* FG1, 0,3µM do *primer* FG2 (para amplificação da região NS5)¹⁴⁶, 2,5U de DNA polimerase (Patinum® *Taq* DNA polymerase, Invitrogen), 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl) e 2mM de MgCl₂ num volume final de 50µl foi amplificada em termociclador (Px2

Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, USA) como segue: 95 °C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos a 95 °C por 20 segundos, 53 °C por 45 segundos e 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados (200 µl) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e purificados utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen, Alemanha) seguindo as especificações do fabricante. A reação de sequenciamento foi otimizada para um volume final de 10 µl contendo: 1 µl de *Big Dye* (*ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* [Applied Biosystem, EUA]), 2 µl do tampão 5x, 1 µl de primer 10 µM e DNA. A mistura de reação foi aquecida a 96 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de: 96 °C por 10 segundos 50 °C por 20 segundos, 60 °C por 2 minutos. O sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystem, EUA) foi utilizado na obtenção de eletroferogramas que foram analisados com os programas MEGA e BioEdit v.7.0.9¹⁴⁷ para montagem das sequências consenso e posteriormente submetidas à análise comparativa com sequências depositadas no *GenBank* utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information, EUA)¹⁴⁸.

3.10. Hemograma

O hemograma completo foi realizado em equipamentos automatizados do laboratório de hematologia do Hospital de Clínicas da FMRP, USP.

3.11. Análises estatísticas

Utilizamos estatística descritiva, com apresentação tabular e gráfica no Microsoft Excel para construção de gráficos e tabelas. A diferença entre os grupos foi analisada utilizando o teste t e considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. Resultados

Durante um período compreendido de março/2010 a outubro/2011 um total de 110 crianças atendidas no Serviço de Pediatria e Puericultura com queixas, sinais e/ou sintomas de doença febril aguda ou doença exantemática com 1-14 dias de instalação dos sinais e sintomas foram incluídas no estudo de modo contínuo. Sessenta e seis por cento (72/110) das crianças foram recrutadas entre 1 e 4 dias de início do quadro clínico e 34% (38/110) com mais de 5 dias de início do quadro. A média de idade foi de $9,3 \pm 3,7$ anos e a distribuição de gênero homogênea com 50 crianças do gênero masculino e 60 do gênero feminino (Tabela 2).

Tabela 2. Características gerais das 110 crianças incluídas no estudo

Variáveis		N	%
Sexo	Feminino	60	54
	Masculino	50	46
Idade em anos	1 a 5	27	24
	5 a 10	32	29
	Maior que 10	51	46
Dias de sintomas	1 a 4	72	66
	5 a 10	17	15
	Mais que 10	1	1
	Ignorado	20	18
Vacinação para febre amarela	Presente	90	82
	Ausente	20	18

De modo geral os sinais e sintomas relatados pelos pais ou responsáveis foram febre, cefaleia, mialgia, vômitos, exantema, dor abdominal, diarreia, dor retro-ocular, tosse, artralgia, prostração, otalgia e epistaxe. Os sinais e sintomas mais frequentes foram a febre em 95% dos pacientes (105/110), seguido de cefaleia em 60% (66/110), mialgia em 45% (49/110), vômitos em 25% (27/110) e exantema em 15% (16/110) (Figura 16).

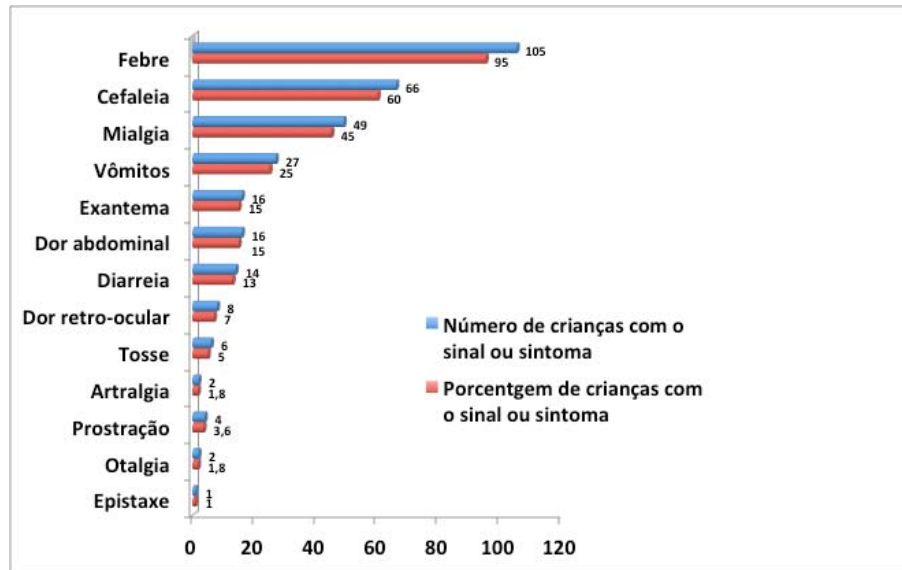


Figura 16. Gráfico representativo dos sinais e sintomas apresentados pelas 110 crianças incluídas no estudo. N: Número de crianças com o sinal ou sintoma; %: porcentagem de crianças com o sinal ou sintoma.

Hemograma completo foi realizado em 55% dos casos. O achado mais prevalente foi a hemoconcentração presente em 70% dos casos. Também detectamos leucopenia em 48% dos casos e plaquetopenia em 19% deles.

4.1. Confirmação da infecção pelo vírus da dengue em casos suspeitos e diferenciação em primária ou secundária.

A infecção pelo vírus da dengue foi confirmada em 96 das 110 crianças incluídas neste estudo considerando conjuntamente dos resultados de RT-PCR em tempo real, NS1 e IgM (Tabela 3). A diferenciação entre infecção primária e secundária foi baseada no índice IgM/IgG quando IgM e IgG foram positivos e, também, considerando a análise dos resultados de RT-PCR em tempo real, NS1 e IgM. Desta forma, a infecção primária ocorreu em 81 crianças enquanto 10 foram classificadas como tendo infecção secundária (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos testes de RT-PCR em tempo real, NS1, IgM e IgG das 110 crianças.

Criança	Dias de sintomas	RT-PCR em tempo real			Sorologia				Infecção	Sorotipo
		Soro	Saliva	Urina	NS1	IgM	IgG	IgM/IgG		
1	4	NC	P	P	D	0,524	0,426	NA	PRI	NT
2	2	P	N	P	N	0,276	0,997	NA	SEC	NT
3	2	N	N	N	D	0,170	0,210	NA	N	NT
4	1	P	P	P	N	0,315	0,500	NA	PRI	DENV 2
5	1	P	N	N	P	0,87	1,06	0,820	SEC	DENV 3
6	3	P	P	P	P	0,232	0,424	NA	PRI	DENV 2
7	2	N	P	P	N	0,950	0,692	1,372	PRI	NT
8	3	N	N	N	N	0,141	0,118	NA	N	NT
9	5	P	N	N	N	1,025	0,832	1,231	PRI	NT
10	2	N	N	P	D	0,170	0,210	NA	PRI	DENV 3
11	1	P	N	N	P	0,104	0,232	NA	PRI	DENV 1
12	4	N	P	N	D	0,274	0,150	NA	PRI	DENV 3
13	7	N	N	N	D	0,170	0,232	NA	N	NT
14	2	P	N	P	P	0,141	0,267	NA	PRI	DENV 1
15	2	P	N	P	N	0,315	0,161	NA	PRI	DENV 1
16	4	P	NC	NC	P	0,093	0,170	NA	PRI	DENV 3
17	5	NT	P	P	P	NT	NT	NA	NA	DENV 2
18	4	P	P	N	D	0,073	0,212	NA	PRI	DENV 3
19	2	P	N	P	P	0,424	0,118	NA	PRI	DENV 3
20	7	P	N	N	P	0,164	0,232	NA	PRI	NT
21	1	N	P	N	P	0,868	0,960	0,904	SEC	DENV 3
22	3	N	P	P	P	0,160	0,271	NA	PRI	NT
23	1	P	N	N	P	0,148	0,096	NA	PRI	DENV 2
24	4	P	P	N	P	0,187	0,250	NA	PRI	DENV 1
25	5	P	N	P	P	0,715	0,951	0,751	SEC	DENV 3
26	3	P	P	P	P	0,179	0,184	NA	PRI	DENV 2
27	4	P	P	P	P	0,768	0,547	NA	PRI	NT
28	5	P	P	N	P	0,255	0,161	NA	PRI	DENV 3
29	1	P	N	N	N	0,253	0,187	NA	PRI	DENV 3
30	i	N	NC	NC	P	0,186	0,324	NA	PRI	NT
31	3	N	N	N	P	0,332	0,216	NA	PRI	NT
32	i	N	NC	NC	P	NT	NT	NA	NA	NT
33	7	N	NT	NT	P	0,223	0,194	NA	PRI	NT
34	3	N	N	N	D	0,264	0,583	NA	N	NT
35	3	N	N	N	P	0,264	0,489	NA	PRI	NT
36	i	P	P	P	P	0,554	0,236	NA	PRI	DENV 1
37	i	P	P	P	P	0,109	0,557	NA	PRI	NT
38	3	P	P	P	P	0,543	0,385	NA	PRI	DENV 1
39	i	P	P	P	P	0,265	0,539	NA	PRI	NT
40	i	P	N	P	P	0,129	0,540	NA	PRI	NT
41	i	P	N	P	P	0,181	0,523	NA	PRI	DENV 1

Criança	Dias de sintomas	RT-PCR em tempo real			Sorologia				Infecção	Sorotipo
		Soro	Saliva	Urina	NS1	IgM	IgG	IgM/IgG		
42	i	N	P	N	P	0,517	0,190	NA	PRI	DENV 1
43	i	P	N	P	P	0,453	0,186	NA	PRI	NT
44	4	P	P	P	P	0,510	0,218	NA	PRI	DENV 1
45	i	P	N	N	P	0,213	0,227	NA	PRI	DENV 1
46	i	P	N	P	P	0,195	0,105	NA	PRI	DENV 1
47	2	N	N	N	P	0,332	0,216	NA	PRI	NT
48	5	P	P	P	P	1,012	0,537	NA	PRI	NT
49	2	P	P	N	D	0,324	0,253	NA	PRI	DENV 1
50	2	N	P	P	P	0,161	0,257	NA	PRI	NT
51	2	P	P	P	P	0,177	0,193	NA	PRI	NT
52	1	N	N	N	N	0,183	0,303	NA	N	NT
53	i	NT	NC	NC	P	NT	NT	NA	NA	NT
54	4	N	P	P	P	1,259	2,025	0,621	SEC	DENV 1
55	2	N	N	N	D	0,318	0,228	NA	N	NT
56	1	P	P	NC	P	0,179	0,201	NA	PRI	DENV 1
57	3	N	N	N	N	0,501	0,467	NA	N	NT
58	1	N	N	N	D	0,459	0,368	NA	N	NT
59	3	P	NC	NC	N	0,263	0,268	NA	PRI	DENV 1
60	5	P	P	N	N	0,287	0,298	NA	PRI	DENV 1
61	i	P	NC	NC	P	0,270	0,149	NA	PRI	DENV 1
62	1	P	N	NC	N	0,522	0,309	NA	PRI	DENV 1
63	3	P	N	P	P	0,298	0,543	NA	PRI	DENV 1
64	3	P	P	NC	D	0,286	0,241	NA	PRI	DENV 1
65	1	P	N	NC	N	0,490	0,378	NA	PRI	NT
66	2	P	P	P	N	0,109	0,256	NA	PRI	NT
67	6	P	P	P	P	0,907	0,555	NA	PRI	NT
68	1	P	P	N	P	0,222	0,101	NA	PRI	NT
69	2	P	P	N	P	0,173	0,215	NA	PRI	DENV 1
70	1	P	N	P	P	0,200	0,213	NA	PRI	NT
71	1	P	N	N	P	0,189	0,234	NA	PRI	NT
72	4	N	P	N	N	0,386	0,266	NA	PRI	NT
73	1	P	N	P	P	0,106	0,573	NA	PRI	DENV 2
74	i	N	N	N	N	NT	NT	NA	NA	NT
75	1	P	P	P	P	0,131	0,320	NA	PRI	DENV 1
76	1	N	N	P	P	NT	NT	NA	NA	NT
77	4	N	N	N	P	0,111	0,190	NA	PRI	NT
78	1	P	P	N	P	0,401	0,390	NA	PRI	NT
79	5	P	P	N	P	0,174	0,201	NA	PRI	NT
80	4	P	P	N	P	0,891	0,456	NA	PRI	NT
81	2	N	N	N	P	0,535	0,439	NA	PRI	NT
82	3	N	N	N	P	0,698	0,407	NA	PRI	NT
83	3	N	N	N	P	1,031	0,345	NA	PRI	NT
84	1	N	N	N	N	0,277	0,390	NA	N	NT

Criança	Dias de sintomas	RT-PCR em tempo real			Sorologia				Infecção	Sorotipo
		Soro	Saliva	Urina	NS1	IgM	IgG	IgM/IgG		
85	2	P	N	N	P	0,331	0,327	NA	PRI	NT
86	4	N	NC	NC	D	NT	NT	NA	NA	NT
87	3	P	P	P	D	NT	NT	NA	PRI	NT
88	i	P	N	N	D	NT	NT	NA	NA	NT
89	6	P	P	P	N	NT	NT	NA	PRI	NT
90	3	N	P	N	N	0,550	0,577	NA	PRI	NT
91	2	N	N	N	N	0,583	0,266	NA	N	NT
92	i	P	P	P	D	0,208	0,511	NA	PRI	NT
93	2	P	P	P	P	0,170	0,211	NA	PRI	NT
94	5	P	P	P	P	0,903	0,201	NA	PRI	NT
95	7	P	P	P	P	1,059	0,602	NA	PRI	NT
96	4	P	N	P	P	0,300	0,222	NA	PRI	NT
97	2	N	P	P	P	0,425	0,119	NA	PRI	NT
98	2	P	N	P	P	0,145	0,552	NA	PRI	NT
99	i	P	P	N	P	0,096	0,108	NA	PRI	DENV 2
100	7	N	N	N	D	0,287	0,907	NA	N	NT
101	3	N	N	N	N	0,221	0,315	NA	N	NT
102	7	P	P	N	P	0,995	1,816	0,547	SEC	NT
103	4	P	P	P	P	0,144	0,250	NA	PRI	NT
104	4	P	P	N	P	0,990	1,16	0,853	SEC	NT
105	14	P	NC	NC	D	0,320	0,275	NA	PRI	DENV 2
106	i	P	N	N	P	1,090	1,012	1,07	SEC	NT
107	7	P	N	N	D	0,987	1,213	0,813	SEC	NT
108	1	P	N	N	P	1,093	1,127	0,969	SEC	DENV 2
109	i	P	N	N	NT	NT	NT	NA	NA	NT
110	i	P	NC	NC	P	NT	NT	NA	NA	NT

DO: densidade óptica; NC: amostra não coletada; N: negativo; P: positivo; D: duvidoso; i: ignorado. PRI: primária; SEC: secundária; NT: não testado; NA: não se aplica. *Cut off* IgM: 0,683. *Cut off* IgG: 0,651. Amostras cujo resultado da razão IgM/IgG foi maior ou igual 1,2 foram consideradas infecções primárias e com razão IgM/IgG menor que 1,2 infecção secundária⁹⁴.

Considerando em paralelo os testes de detecção de NS1 e de RT-PCR em tempo real nas 96 crianças em que a infecção pelo vírus da dengue foi confirmada, 85 amostras foram positivas na RT-PCR e 70 amostras foram positivas no teste de detecção da NS1. A proporção de amostras positivas não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,9601$) quando os dois testes foram comparados entre si (Figura 17).

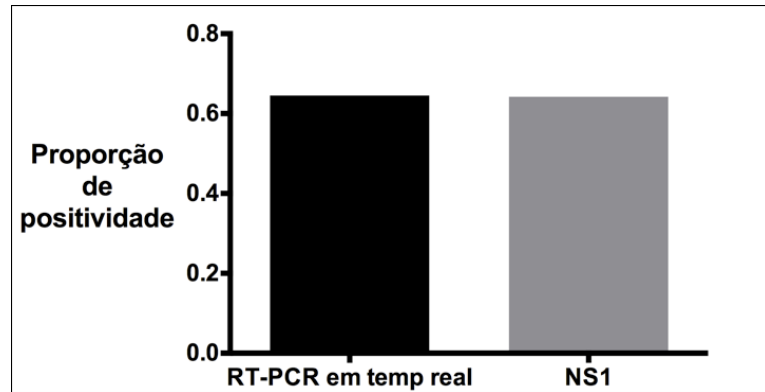


Figura 17. Gráfico representativo da proporção de positividade da RT-PCR em tempo real e do teste de detecção de NS1 em amostras de 96 crianças com infecção pelo vírus da dengue confirmada.

4.2. Determinação da carga viral em amostras de sangue, saliva e urina das crianças com dengue.

A carga viral foi determinada em 71 amostras de soro, 48 de saliva e 44 de urina por RT-PCR em tempo real. A carga viral foi significativamente maior no soro quando comparada à saliva e urina (Figura 18 A). Por outro lado, não houve diferença significativa na carga viral observada entre saliva e urina. Para uma melhor comparação da carga viral entre as amostras clínicas, 21 pacientes nos quais a RT-PCR em tempo real foi positiva para os três tipos de amostras foram analisadas, obtendo-se resultados similares aos observados na Figura 18A quando o total de amostras positivas foi analisado (Figura 18B).

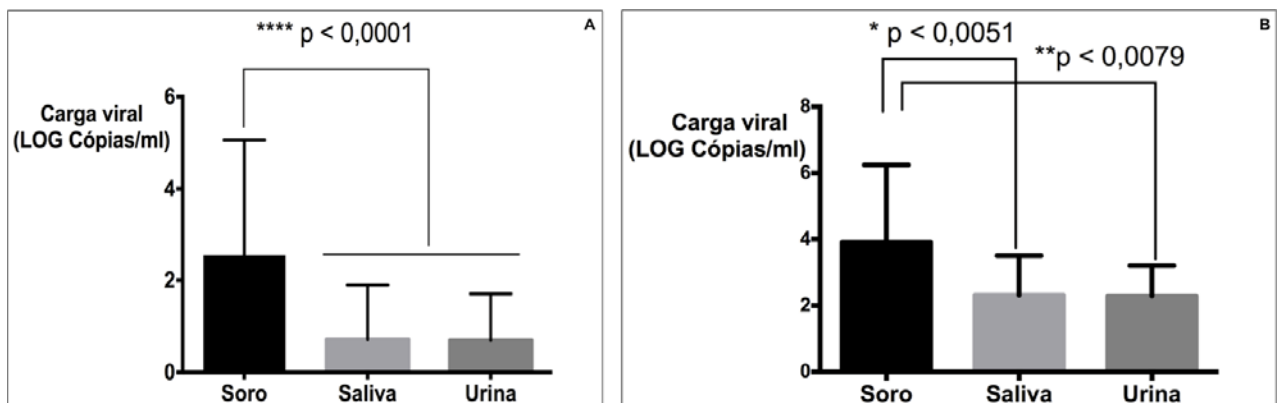


Figura 18. Gráfico representativo da comparação da carga viral em amostras de soro, saliva e urina. A: carga viral em 71 amostras de soro, 48 de saliva e 44 de urina. B: carga viral determinada em 21 crianças com RT-PCR em tempo real foi positivo para os três tipos de amostras.

O pico da viremia foi observado no terceiro dia após a instalação dos sintomas nas amostras de soro enquanto que a carga viral em saliva e urina se manteve constante e em menores níveis quando comparadas com a carga viral no soro até o sétimo de início da doença (Figura 19).

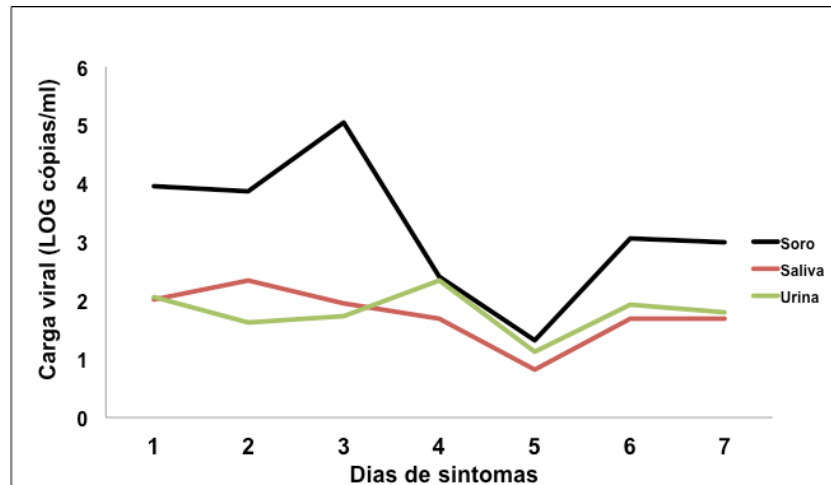


Figura 19. Gráfico representativo da cinética da carga viral nas amostras de soro, saliva e urina.

Não houve correlação entre os níveis de viremia com a proporção de detecção do vírus na saliva ou na urina. Não observamos diferença na carga viral nas amostras de soro tanto quando as amostras de saliva e/ou urina foram positivas como quando foram negativas ($p=0,5412$ e $p=0,774$, respectivamente).

Durante o estudo foi possível coletar 109 amostras de soro, 100 amostras de saliva e 96 amostras de urina, diferenças estas explicadas por intercorrências de ordem técnica e prática como, por exemplo, não concordância da criança ou seus responsáveis em coletar todos os fluidos, mas apenas um ou dois deles; dificuldade de acesso venoso; insucesso da micção após do longo período de permanência na unidade de saúde; ingestão de alimentos logo antes da coleta de saliva entre outros. Do mesmo modo os testes laboratoriais apresentam diferenças no número das amostras testadas a cada experimento principalmente por insuficiência ou esgotamento do material.

4.3. Avaliação da utilidade de urina e saliva como amostras complementares ao sangue para diagnóstico de infecção aguda pelo vírus da dengue por RT-PCR em tempo real.

O RNA do vírus da dengue foi detectado por RT-PCR em tempo real em 77% (85/110) dos pacientes em pelo menos uma das amostras clínicas (soro, saliva e/ou urina) distribuídos da seguinte maneira: em 65% (71/109) dos soros, 48% (48/100) das salivas e 46% (44/96) das urinas das crianças. A análise mostrou que houve detecção significativamente maior em amostras de soro quando comparadas com amostras de urina e saliva. Estes resultados são similares aos observados considerando apenas as crianças nas quais foi possível coletar amostras dos três espécimes clínicos (n=95), onde o genoma do vírus foi detectado em 65% (62/95) das amostras de soro, 47% (45/95) das amostras de saliva e em 45% (43/95) amostras de urina (Tabela 3, Figura 20).

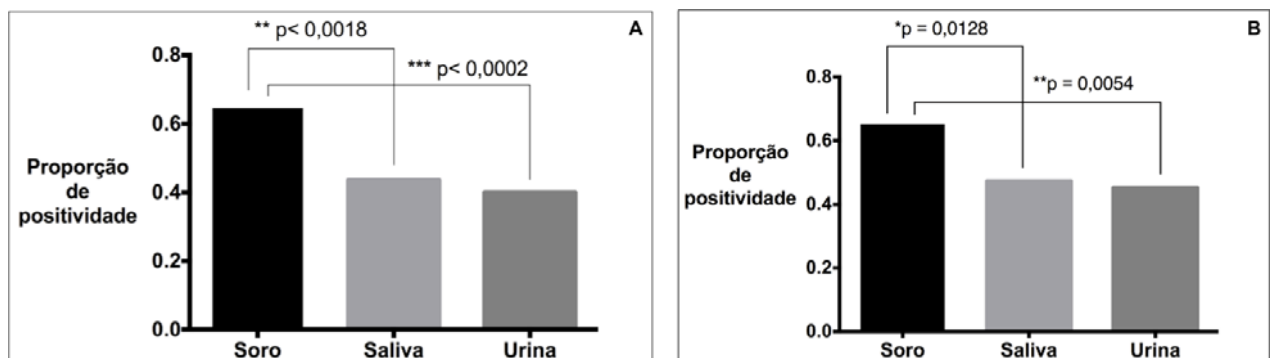


Figura 20. Gráficos representativos da proporção de amostras de soro, saliva e urina positivas na RT-PCR em tempo real. A: proporção de positividade em todas as 110 crianças incluídas no estudo. B: proporção de positividade das 95 crianças nas quais foi possível coletar os três tipos de amostras.

Apesar da proporção de detecção do genoma do vírus da dengue ter sido significativamente maior em amostras de soro, saliva e urina também são amostras nas quais o vírus pôde ser detectado e portanto com utilidade de amostras complementares no diagnóstico da doença (Figura 20).

4.4. Identificação dos tipos virais detectados nas crianças

Sequências nucleotídicas parciais do gene da proteína NS5 correspondente a vírus detectados em amostras de 39% (41/106) das crianças foram submetidas à análise comparativa com sequências depositadas no *GenBank* utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)¹⁴⁸. Embora em todos os pacientes com amostras positivas na RT-PCR em tempo real tenha sido feito a tentativa de amplificação para posterior sequenciamento, não foi possível obter *amplicons* adequados para purificação e sequenciamento. Porém, do ponto de vista epidemiológico sabe-se que em epidemias não há necessidade de sequenciar todas as amostras positivas para determinar o sorotipo circulante predominante no período. Os resultados mostraram a circulação de três sorotipos do vírus da dengue nesta população durante o período do estudo, assim distribuídos: 54% (22/41) pertenciam ao DENV-1; 22% (9/41) ao DENV-2 e 24% (10/41) ao DENV-3. No sequenciamento foi possível utilizar tanto amostras soro quanto amostras de saliva e urina para determinar o tipo viral envolvido na infecção (Tabela 4). Embora a porcentagem de DENV-1 tenha sido maior, a distribuição dos sorotipos está relacionada com o período de coleta das amostras. Assim, o DENV-3 circulou preferencialmente até o ano de 2010 quando progressivamente foi sendo substituído pelos DENV-1 e DENV-2.

Tabela 4. Sorotipos circulantes nas crianças durante o período do estudo.

Paciente	Data de coleta	Sorotipo	Material utilizado no sequenciamento (N)
4	30/03/10	DENV 2	soro
5	30/03/10	DENV 3	soro
6	15/04/10	DENV 2	soro
10	26/04/10	DENV 3	urina
11	30/04/10	DENV 1	soro
12	30/04/10	DENV 3	saliva
14	27/04/10	DENV 1	soro
15	27/04/10	DENV 1	soro
16	29/04/10	DENV 3	soro
17	05/05/10	DENV 2	saliva
18	07/05/10	DENV 3	saliva
19	06/05/10	DENV 3	soro e urina
21	10/05/10	DENV 3	soro e saliva
23	11/05/10	DENV 2	urina
24	14/05/10	DENV 1	soro
25	18/05/10	DENV 3	soro
26	18/05/10	DENV 2	saliva e urina

Paciente	Data de coleta	Sorotipo	Material utilizado no sequenciamento (N)
28	24/05/10	DENV 3	soro
29	24/05/10	DENV 3	soro
36	03/02/11	DENV 1	soro e saliva
38	04/02/11	DENV 1	soro e urina
41	08/02/11	DENV 1	urina
42	08/02/11	DENV 1	saliva
44	09/02/11	DENV 1	soro e urina
45	11/02/11	DENV 1	soro
46	11/02/11	DENV 1	soro e urina
49	17/02/11	DENV 1	soro
54	25/02/11	DENV 1	saliva e urina
56	26/02/11	DENV 1	soro
59	26/02/11	DENV 1	soro
60	26/02/11	DENV 1	soro
61	26/02/11	DENV 1	soro
62	01/03/11	DENV 1	soro
63	01/03/11	DENV 1	soro e urina
64	01/03/11	DENV 1	soro e saliva
69	17/03/11	DENV 1	soro
73	25/03/01	DENV 2	soro
75	28/03/11	DENV 1	soro
99	24/04/11	DENV 2	soro
105	26/05/11	DENV 2	soro
108	01/06/11	DENV 2	soro

4.5. Análise da sintomatologia e dos dados laboratoriais apresentados pelas crianças

As 110 crianças foram categorizadas por análise retrospectiva de prontuário médico de cada paciente em dois grupos de acordo com a apresentação clínica inicial. Grupo A quando a primeira impressão diagnóstica era a de caso suspeito de infecção pelo vírus da dengue de acordo com os critérios da OMS e Grupo B quando apresentavam critérios de doença febril aguda para inclusão neste trabalho, mas não se encaixavam no critério classificatório de caso suspeito de dengue. Deste modo, as crianças foram distribuídas como 56 pertencentes ao Grupo A e 54 ao Grupo B. Os principais sinais e sintomas apresentados pelas crianças classificadas nos Grupos A e B são apresentados na Figura 21.

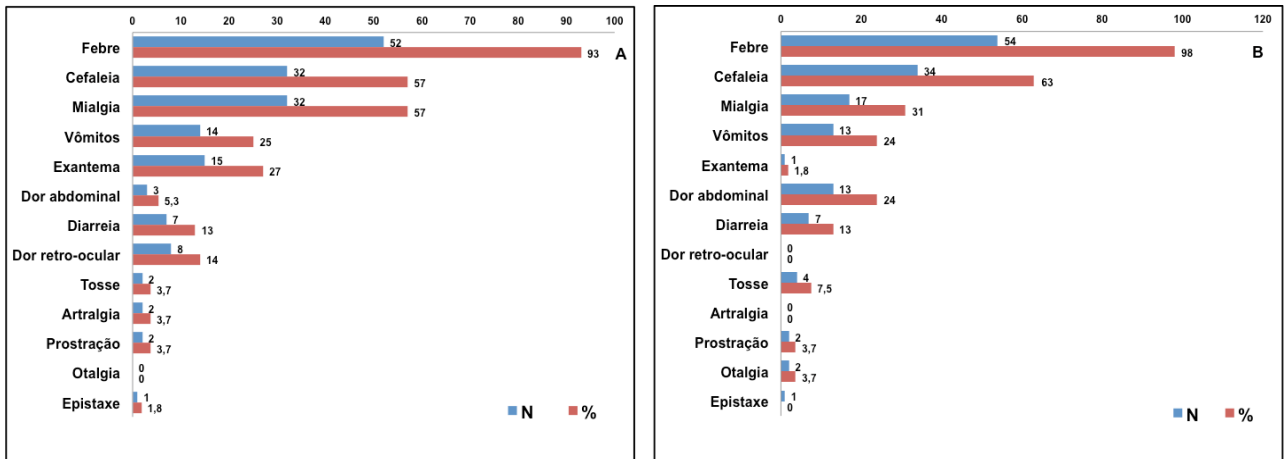


Figura 21. Sinais e sintomas encontrados nos dois grupos em que as crianças foram categorizadas. A: Gráfico representativo dos sinais e sintomas apresentados pelas crianças categorizadas no Grupo A, casos classificados como suspeitos de dengue de acordo com os critérios Organização Mundial da Saúde. B: Gráfico representativo dos sinais e sintomas apresentados pelas crianças categorizadas no Grupos B, casos que não foram classificados como suspeitos de dengue pelos critérios da Organização Mundial da Saúde. N: Número de crianças com o sinal ou sintoma; %: porcentagem de crianças com o sinal ou sintoma.

Em relação às crianças não classificadas como caso suspeito de dengue (Grupo B - 54 crianças), o diagnóstico laboratorial de dengue foi confirmado em 44 delas e a sintomatologia apresentada foi similar àquela apresentada pelo total das 110 crianças. Neste grupo também chama a atenção a pequena quantidade de pacientes com exantema e dor retro-ocular quando comparado com as crianças do Grupo A (Figura 22).

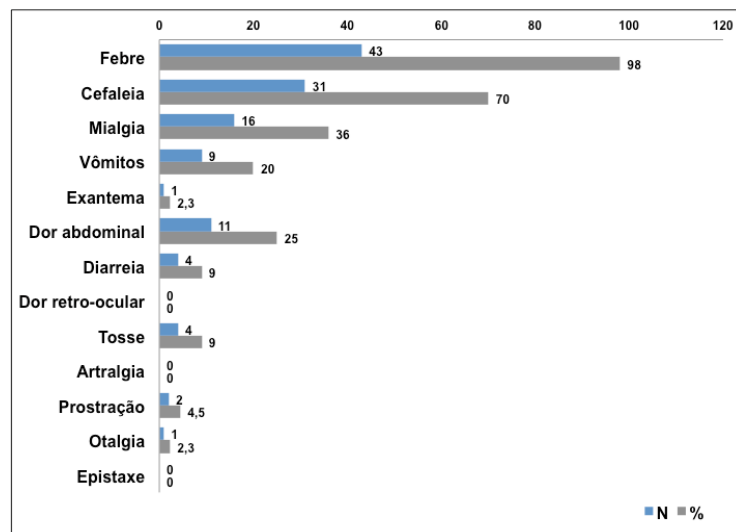


Figura 22. Gráfico representativo dos sinais e sintoma apresentados pelas 44 crianças inicialmente classificadas como não sendo caso suspeito de infecção pelo vírus da dengue (Grupo B), mas nas quais o diagnóstico foi confirmado laboratorialmente. Neste grupo há uma porcentagem menor de crianças com exantema e nenhuma com dor retro-ocular.

Quando comparamos o Grupo A com o Grupo B notamos que a proporção que cada sinal e/ou sintoma ocorre em cada grupo foi similar, exceto quanto à presença de exantema e dor retro-ocular, os quais foram mais frequentes nas crianças classificadas como caso suspeito de dengue (27% e 14%, respectivamente) do que nas crianças não classificadas como caso suspeito de dengue (1,8% e 0%, respectivamente) (Figura 23).

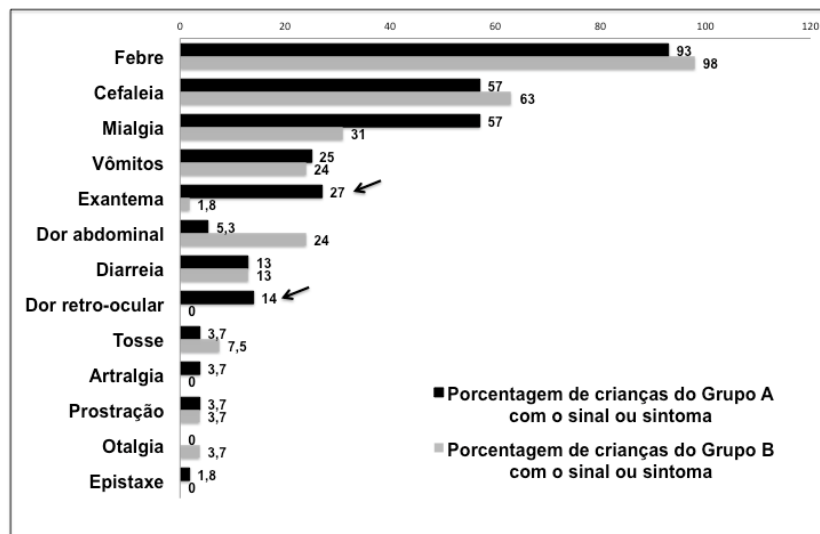


Figura 23. Gráfico representativo da comparação dos sinais e sintomas apresentados pelas crianças dos Grupos A e B. Nota-se a percentagem mais expressiva de crianças com exantema e dor retro-ocular no Grupo A (setas). N: Número de crianças com o sinal ou sintoma; %: percentagem de crianças com o sinal ou sintoma.

Em relação ao total geral de 110 crianças incluídas neste estudo, a hipótese diagnóstica inicial de dengue foi formulada pelo pediatra assistente em 56 (51%) delas após o exame clínico inicial. Após análise dos exames laboratoriais, o diagnóstico de dengue foi confirmado em 52/56 (93%) das crianças com suspeita de dengue. Entretanto, o diagnóstico de dengue foi também confirmado em 44 (81%) de 54 crianças sem hipótese diagnóstica inicial de dengue (Figura 24).

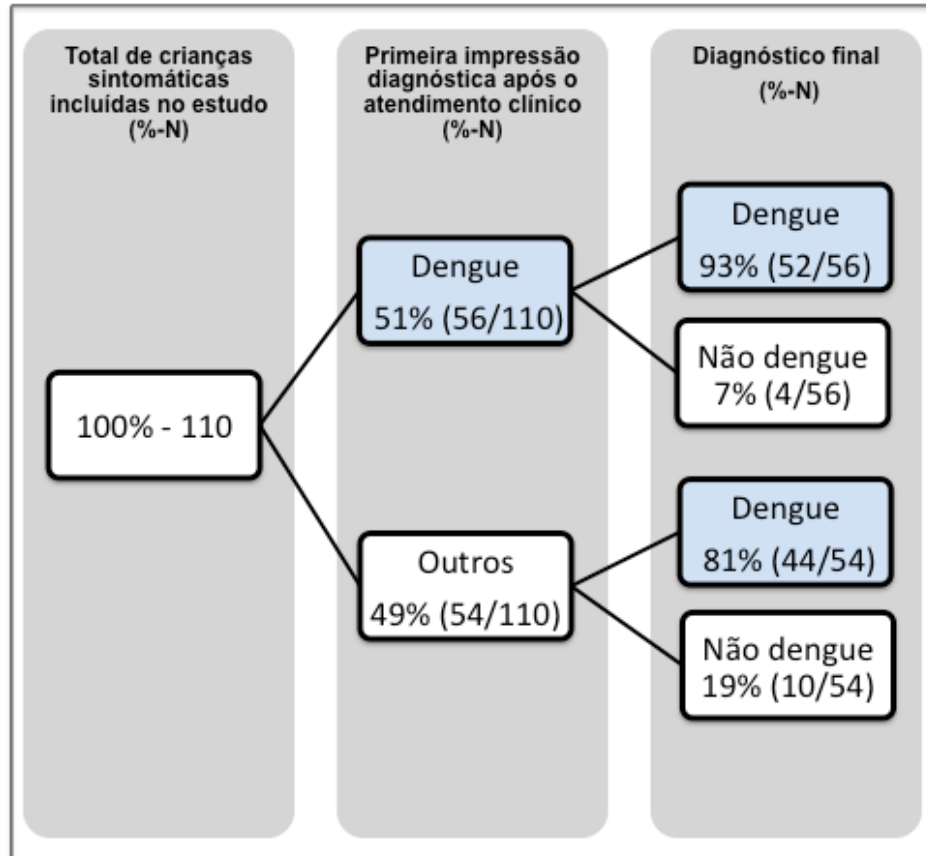


Figura 24. Fluxograma ilustrativo do subdiagnóstico de infecção pelo vírus da dengue que ocorre em crianças devido às peculiaridades da faixa etária pediátrica.

5. Discussão

A história natural da dengue em crianças, num cenário de comunidade, não tem sido tão bem investigada¹⁴⁹. Neste sentido nosso estudo é o primeiro, na cidade de Ribeirão Preto, a incluir um grupo de pacientes de faixa etária pediátrica, não hospitalizados, atendidos em uma Unidade de Saúde Pública que funciona como Centro de Saúde Escola através de convênio da prefeitura do município com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Apesar do diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue ser essencialmente clínico, sua confirmação requer testes laboratoriais que são também ferramentas para monitorar os sorotipos circulantes e para diagnóstico diferencial definitivo entre dengue e outras doenças febris de grande similaridade clínica^{150;151}. Neste trabalho utilizamos análise conjunta de resultados de detecção de NS1, do genoma viral e de detecção de IgM para o diagnóstico de dengue. Os métodos mais sensíveis para diagnóstico foram a detecção da NS1 por ELISA e do genoma viral por RT-PCR em tempo real. Em estudo recente, a RT-PCR em tempo real realizada neste trabalho utilizando SYBR Green mostrou-se altamente sensível para detecção do sorogrupo do vírus da dengue¹⁴⁵. A vantagem de se utilizar SYBR Green em lugar outros compostos fluorescentes, como por exemplo, sondas específicas é o menor custo. Num estudo conduzido por Lai et al. (2007) demonstrou-se que o uso do SYBR Green reduziu os custos com o diagnóstico em cerca da metade quando comparado com outros métodos que usam sondas¹⁵².

Embora a RT-PCR em tempo real e ELISA para detecção de NS1 tenham se mostrado com sensibilidades similares, a sensibilidade do NS1 pode variar dependendo do tipo de infecção; sendo menos sensível em infecções secundárias devido, provavelmente, à presença de imunocomplexos contendo a proteína NS1, que bloqueiam a exposição de epítomos e consequentemente reconhecimento pelos anticorpos monoclonais utilizados nos testes^{153; 154; 155}. A RT-PCR em tempo real não sofre a interferência com imunocomplexos porque o RNA viral é purificado das amostras. Além disso, a detecção de NS1 mostrou sensibilidade variável dependendo do sorotipo do vírus^{153; 156; 157; 158}. Este fato pode estar relacionado à presença de anticorpos pré-existentes em infecções secundárias ou a interações com o anticorpo monoclonal utilizado no teste, que pode reconhecer epítomos de alguns sorotipos do vírus melhor do que outros. A RT-PCR em tempo real utilizada neste estudo demonstrou sensibilidade semelhante para todos os sorotipos devido à especificidade dos *primers* que foram desenhados com base na extremidade 5' do genoma viral, a qual é altamente conservada em todos os quatro sorotipos¹⁴⁵. Este protocolo de RT-PCR em tempo real já vem sendo utilizado no nosso laboratório com bons resultados para a detecção do

genoma do vírus da dengue em soro humano, mas o método foi também útil para diagnóstico da doença em dois pacientes com quadro de febre e mialgia, utilizando amostras de saliva e urina, sugerindo que estes fluidos poderiam ser utilizados como amostras alternativas ao soro para diagnóstico da doença¹⁴². Neste trabalho de doutorado, embora tenha sido observado uma maior proporção de positividade em amostras de soro, as amostras de saliva e urina também se mostraram úteis para o diagnóstico da dengue. Apesar de não ser um fato novo a detecção e/ou isolamento do vírus da dengue em saliva e urina, o presente trabalho analisou um número de casos ainda não descrito na literatura. Saliva e urina mostraram-se amostras importantes para o diagnóstico da dengue por RT-PCR em tempo real em alguns pacientes.

A magnitude da carga viral nas amostras de soro não apresentou qualquer tipo de correlação com as proporções de positividade da RT-PCR em tempo real nas amostras de saliva e urina analisadas neste estudo, sugerindo que a presença do vírus na saliva e na urina possa representar multiplicação viral nas glândulas salivares e nos rins, pelo fato destas células não serem as células alvo preferenciais do vírus.

Hirayama et al. (2012), detectaram o vírus por um período maior em amostras de urina do que em sangue por RT-PCR em tempo real, sugerindo que a urina pode ser utilizada para diagnóstico de infecção pelo vírus da dengue após o desaparecimento da viremia¹⁵⁹. Entretanto em nosso estudo, o genoma viral foi detectado por um período de tempo maior após a instalação da doença em amostras de sangue e não em amostras de urina.

Embora a porcentagem de detecção do DENV-1 na população do estudo tenha sido maior, a distribuição dos sorotipos tem relação com o período de coleta das amostras. Assim, o DENV-3 circulou preferencialmente no ano de 2010 quando progressivamente foi sendo substituído pelos DENV-1 e DENV-2. O padrão de circulação encontrado no presente estudo é similar ao divulgado pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto no mesmo período, de modo que a amostra estudada reflete o que de fato ocorreu no município nesse período.

No presente trabalho foi pesquisada a prevalência da vacinação para febre amarela nesta população através da revisão do cartão de vacinas de cada paciente. A interação entre as infecções pelos vírus da febre amarela e da dengue tem sido estudada em humanos. Indivíduos expostos ou imunizados contra o vírus da febre amarela ou outros flavivírus e posteriormente expostos aos vírus da dengue apresentaram resposta imunológica atípica com altos títulos de anticorpos contra ambos os vírus. Portanto, a exposição prévia à vacina contra febre amarela e/ou infecção por outros flavivírus, poderia facilitar a resposta imunológica às vacinas contra dengue¹⁶⁰. Porém ainda não se demonstrou que indivíduos imunizados para

febre amarela podem receber vacina da dengue com segurança. Atualmente, o perfil imunológico de *flavivirus-naive* tem sido o mais utilizado na inclusão de voluntários humanos em estudos com vacina para dengue^{128; 161}. Neste trabalho, a pesquisa da situação vacinal para febre amarela mostrou que 82% das crianças já haviam sido imunizadas com esta vacina, indicando que esta população não seria a mais indicada para testes de vacinação contra o vírus da dengue.

Em relação ao diagnóstico, é considerado caso suspeito de dengue, devendo ser notificado, todo paciente que apresente febre com duração máxima de 7 dias e, pelo menos, dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro-orbitária, exantema, prostração, mialgia, artralgia segundo critérios de classificação de caso suspeito de dengue da Organização Mundial da Saúde (OMS)¹¹. Embora a sintomatologia apresentada pelas crianças com diagnóstico de dengue confirmado laboratorialmente tenha sido suficientemente adequada para classificação como caso suspeito de dengue de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde, cerca de metade dessas crianças não recebeu diagnóstico clínico de dengue na avaliação inicial pelo pediatra assistente. Esta ocorrência pode ser atribuída principalmente a dois fatores: a similaridade dos sintomas da dengue com os de outras doenças febris em pediatria e a mudança da prevalência da doença da faixa etária adulta para a infantil. Os sinais e sintomas da dengue em crianças são, por um lado sintomas constitucionais inespecíficos como febre sem foco aparente, choro persistente, adinamia e irritabilidade e, por outro lado, muito similares aos de outras doenças febris agudas comuns e prevalentes na infância. No diagnóstico diferencial de dengue em pediatria estão incluídas diversas doenças febris como, por exemplo, rubéola, sarampo, escarlatina, exantema súbito, doença de Lyme, influenza, enterovirose, parvovirose, eritema infeccioso, mononucleose infecciosa, hepatite infecciosa, hantavirose, febre amarela, sepsis, meningococemia, leptospirose, malária, riquetsioses, síndromes purpúricas (síndrome de Henoch-Schönlein, doença de Kawasaki, púrpura autoimune), farmacodermias e alergias cutâneas, abdome agudo na criança, além de outras patologias que devem ser consideradas conforme a situação epidemiológica¹⁶². Desde a reintrodução do *Aedes aegypti* no final da década de 70 e a reemergência da dengue a partir dos anos 80 no Brasil, a doença sempre foi mais prevalente na população adulta tanto na forma de febre clássica da dengue quanto na forma de febre hemorrágica da dengue. Este padrão brasileiro se mostrava diferente daquele que já ocorria no Sudeste Asiático onde a incidência, seja na forma clássica ou grave da doença, é maior na população infantil^{163; 164}. Entretanto, a partir do ano de 2006 ocorreu uma súbita mudança no padrão da doença no Brasil com aumento da proporção de casos de febre hemorrágica da dengue em menores de 15

anos de idade, situação observada principalmente na região nordeste no ano de 2007³⁷; ³⁸. Durante a epidemia que ocorreu no Rio de Janeiro nos primeiros meses do ano de 2008, metade dos casos de dengue e 86% dos óbitos ocorreu em indivíduos abaixo dos 15 anos de idade³⁸. Este fenômeno não foi transitório e a cada ano o número de casos de dengue vêm aumentando progressivamente nesta faixa etária apresentando evolução semelhante à que ocorreu no Sudeste Asiático desde a década de 50. Portanto, passa a ser crucial que médicos encarregados da assistência direta à população pediátrica sejam cada vez mais treinados na readaptação do raciocínio clínico no sentido de evitar o subdiagnóstico da doença. Diante do exposto, fica clara a dificuldade de diagnóstico definitivo de dengue em crianças baseado puramente em aspectos clínicos, sem apoio do diagnóstico laboratorial. Diagnóstico rápido e precoce dos casos suspeitos de infecção pelo vírus da dengue é de suma importância, tanto para um melhor atendimento ao paciente quanto para auxiliar as autoridades sanitárias na elaboração e efetivação dos planos de contingência das epidemias. Neste sentido, Eric Martínez Torres (2005, p. 276), ressalta que:

[...] Sem confirmação da infecção por dengue e sem vigilância apoiada pelo laboratório, nenhum programa de prevenção e controle pode avançar. O diagnóstico laboratorial do dengue permite a clínicos e epidemiologistas fazer seu trabalho com qualidade e orienta os especialistas de controle de vetores para onde dirigir seus esforços. O investimento que cada instituição ou cada governo possa fazer em laboratórios para o diagnóstico sorológico e virológico do dengue será recuperado pela economia de gastos de hospitalização, medicamentos e inseticidas, bem como com a diminuição do custo social de doença e morte.

Nossos resultados confirmam que as infecções pelo vírus da dengue em crianças podem passar despercebidas em grande número de casos. Exemplo disto foi observado na América Central no primeiro estudo prospectivo nas Américas para investigar a soroprevalência e a incidência de infecção sintomática e assintomática pelo vírus da dengue em crianças, documentando uma alta prevalência de anticorpos antidengue em crianças com história patológica pregressa negativa para dengue: aos 5 anos de idade, 80% da população estudada tinha sido exposta ao vírus e aos 7 anos de idade mais de 90%¹⁶⁵. Neste contexto, embora o soro ainda seja a melhor amostra, urina e saliva são amostras importantes no diagnóstico da dengue.

6. Conclusões

1. As crianças que tiveram diagnóstico laboratorial de dengue confirmado apresentavam sinais e sintomas compatíveis para classificação como caso suspeito de dengue de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde.
2. A análise clínica inicial falhou em classificar como caso suspeito de dengue um expressivo número de casos confirmados laboratorialmente, principalmente quando estavam ausentes exantema e dor retro-ocular. Isto indica a necessidade de adequação do raciocínio clínico à mudança do perfil epidemiológico da doença ocorrida recentemente.
3. Embora a carga viral tenha sido maior e a detecção do vírus mais frequente em soro, amostras de saliva e urina podem ser utilizadas como alternativa para diagnóstico de dengue através da detecção do genoma viral por RT-PCR em tempo real.
4. Os sorotipos virais circulantes na população do estudo foram DENV-3, principalmente durante o ano de 2010, e DENV-1 e DENV-2, predominantemente no ano de 2011.
5. Houve predomínio de casos de dengue sem sinais de alarme, com quadro clínico leve sem complicações, provavelmente explicados pela maior frequência de infecções primárias em relação às secundárias.

7. Referências

- 1 RIGAU-PÉREZ, J. G. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 2, p. 272-4, Aug 1998. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715945> >.
- 2 FIGUEIREDO, L.; FONSECA, B. **Dengue**. **In: Roberto Focaccia. Tratado de infectologia**. 3ª Ed. Sao Paulo: 2005.
- 3 BRASIL. **CID-10 Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde**. SAÚDE/ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, C. C. D. O. P. A. C. D. D. E. P. C. B. D. C. D. D. F. D. S. P. D. U. D. S. P. O. M. D. Sao Paulo. 1 2008.
- 4 **Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. Academia Brasileira de Letras**. Brasil. 1: 976 p. 2009.
- 5 HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-52, Nov 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993365> >.
- 6 MOUSSON, L. et al. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. **Genet Res**, v. 86, n. 1, p. 1-11, Aug 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16181519> >.
- 7 HALSTEAD, S. B. **Epidemiology**. London Imperial College Press 2008.
- 8 LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 5, p. e646, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20520794> >.
- 9 GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerg Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 55-7, 1995 Apr-Jun 1995. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8903160> >.
- 10 DEEN, J. L. et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 170-3, Jul 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829301> >.
- 11 **World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. 2009.
- 12 TAUIL, P. L. [Urbanization and dengue ecology]. **Cad Saude Publica**, v. 17 Suppl, p. 99-102, 2001. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426270> >.
- 13 SHEPARD, D. et al. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 84 n. 2, p. 200–207 2011.

- 14 SCHATZMAYR, H. G. [New perspectives in viral vaccines]. **Hist Cienc Saude Manguinhos**, v. 10, n. Suppl 2, p. 655-69, 2003. ISSN 0104-5970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14964313> >.
- 15 WHO, W. H. O. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** 2009.
- 16 GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 480-96, Jul 1998. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665979> >.
- 17 CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **J Hist Med Allied Sci**, v. 26, n. 3, p. 243-62, Jul 1971. ISSN 0022-5045. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4938938> >.
- 18 MCSHERRY, J. A. Some medical aspects of the Darien scheme: was it dengue? **Scott Med J**, v. 27, n. 2, p. 183-4, Apr 1982. ISSN 0036-9330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7046045> >.
- 19 RUSH, A. B. **An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. Medical enquiries and observations.** . HALL., P. A. Philadelphia, Pa.: p. 104.117 p. 1789.
- 20 HALSTEAD, S. B. **Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever.** CAB International. New York, NY.: In: Gubler DJ, Kuno G, eds. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. 1997.
- 21 MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat Med**, v. 10, n. 12 Suppl, p. S98-109, Dec 2004. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577938> >.
- 22 GUBLER, D. J. **Dengue and dengue hemorrhagic fever: Its history and resurgence as a global health problem.** New York: CAB International.: 1997.
- 23 HAMMON, W. M. A. et al. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. **Trans Assoc Am Physicians**, v. 73, p. 140-55, 1960. ISSN 0066-9458. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13711073> >.
- 24 MARTÍNEZ TORRES, E. [Preventing deaths from dengue: a space and challenge for primary health care]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 20, n. 1, p. 60-74, Jul 2006. ISSN 1020-4989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018226> >.
- 25 MAIRUHU, A. T. et al. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 6, p. 425-33, Jun 2004. ISSN 0934-9723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15148655> >.
- 26 HAMMOND, S. N. et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n.

- 6, p. 1063-70, Dec 2005. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354813> >.
- 27 PFC., V. et al. *Aedes aegypti*, dengue and re-urbanization of yellow fever in Brazil and other South American countries-past and present situation and future perspectives. . **Dengue Bull** 23: 55-66., 1999.
- 28 OSANAI, C. H. et al. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-4, 1983 Jan-Feb 1983. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6879054> >.
- 29 SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245-6, 1986 Apr-Jun 1986. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3587006> >.
- 30 NOGUEIRA, R. M. et al. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 219-25, 1988 Apr-Jun 1988. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2593823> >.
- 31 _____. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiol Infect**, v. 111, n. 1, p. 163-70, Aug 1993. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8348928> >.
- 32 ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 43, n. 1, p. 55-7, 2001 Jan-Feb 2001. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11246285> >.
- 33 NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-6, Oct 2001. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685256> >.
- 34 MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 8, p. 869-72, Aug 2002. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12185377> >.
- 35 DE SIMONE, T. S. et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 9, p. 553-62, Sep 2004. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251405> >.
- 36 HALSTEAD, S. B. A. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Rev Panam Salud Publica**, v. 20, n. 6, p. 407-15, Dec 2006. ISSN 1020-4989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341332> >.

- 37 CAVALCANTI, L. P. et al. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 132-4, Jan 2011. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192876> >.
- 38 TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 25 Suppl 1, p. S7-18, 2009. ISSN 1678-4464. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287868> >.
- 39 FIGUEIREDO, R. M. et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 4, p. 667-9, Apr 2008. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18394292> >.
- 40 **BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE.SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil . EPIDEMIOLOGICA, D. D. V. N. Esplanada dos Ministérios, Edifício Sede, 1o andar 70.058-900 Brasília-DF Tel. 3315 2755/2812 2010.**
- 41 FIGUEIREDO, L. T. et al. Dengue serologic survey in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 29, n. 1, p. 59-69, Mar 1995. ISSN 0085-4638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7757124> >.
- 42 DOHERTY, R. Australia's contribution to tropical health: past and present. **Med J Aust**, v. 158, n. 8, p. 552-7, Apr 1993. ISSN 0025-729X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8487721> >.
- 43 CLELAND, J. B.; BRADLEY, B. Dengue Fever in Australia: Its History and Clinical Course, its Experimental Transmission by *Stegomyia fasciata*, and the results of Inoculation and other Experiments. **J Hyg (Lond)**, v. 16, n. 4, p. 317-418, Jan 1918. ISSN 0022-1724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20474653> >.
- 44 CLELAND, J. B.; BRADLEY, B.; MACDONALD, W. Further Experiments in the Etiology of Dengue Fever. **J Hyg (Lond)**, v. 18, n. 3, p. 217-54, Oct 1919. ISSN 0022-1724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20474685> >.
- 45 FIGUEIREDO, L. T. [Viral hemorrhagic fevers in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 2, p. 203-10, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699651> >.
- 46 WEAVER, S. C. Host range, amplification and arboviral disease emergence. **Arch Virol Suppl**, n. 19, p. 33-44, 2005. ISSN 0939-1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16358422> >.
- 47 GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. **Flaviviruses**. 5th. Philadelphia, PA 19106 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS AND WOLTERS KLUWER BUSINESS, 2007. 1550
- 48 CHAN, M.; JOHANSSON, M. A. The incubation periods of dengue viruses. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50972, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226436> >.

- 49 CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 5, p. 775, May 2005. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15898174> >.
- 50 TAMBYAH, P. A. et al. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. **N Engl J Med**, v. 359, n. 14, p. 1526-7, Oct 2008. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832256> >.
- 51 THAITHUMYANON, P. et al. Dengue infection complicated by severe hemorrhage and vertical transmission in a parturient woman. **Clin Infect Dis**, v. 18, n. 2, p. 248-9, Feb 1994. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8161636> >.
- 52 BOUSSEMARY, T. et al. Prenatal transmission of dengue: two new cases. **J Perinatol**, v. 21, n. 4, p. 255-7, Jun 2001. ISSN 0743-8346. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533844> >.
- 53 FATIMIL, L. E. et al. Vertical transmission of dengue: first case report from Bangladesh. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 34, n. 4, p. 800-3, Dec 2003. ISSN 0125-1562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15115091> >.
- 54 SIRINAVIN, S. et al. Vertical dengue infection: case reports and review. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, n. 11, p. 1042-7, Nov 2004. ISSN 0891-3668. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545860> >.
- 55 ASHBURN, P. M.; CRAIG, C. F.; DISEASES, U. A. B. F. T. S. O. T. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. 1907. **J Infect Dis**, v. 189, n. 9, p. 1747-83; discussion 1744-6, May 2004. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15116315> >.
- 56 SABIN, A. B. The dengue group of viruses and its family relationships. **Bacteriol Rev**, v. 14, n. 3, p. 225-32, Sep 1950. ISSN 0005-3678. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14772197> >.
- 57 HOTTA, S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. **J Infect Dis**, v. 90, n. 1, p. 1-9, 1952 Jan-Feb 1952. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14888958> >.
- 58 HAMMON, W. M. B.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 3407, p. 1102-3, Apr 1960. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14399343> >.
- 59 SWEET, B. H.; SABIN, A. B. Properties and antigenic relationships of hemagglutinins associated with the dengue viruses. **J Immunol**, v. 73, n. 5, p. 363-73, Nov 1954. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13212058> >.

- 60 VIRUSES., I.-I. C. O. T. O. **Virus Taxonomy: 2012 Release (current)**. 2012.
- 61 LINDENBACH, B.; THIEL, H.; RICE, C. **Flaviviridae: The viruses and their replication**. . 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins., 2007.
- 62 LOZACH, P. Y. et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **J Biol Chem**, v. 280, n. 25, p. 23698-708, Jun 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855154> >.
- 63 LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res**, v. 59, p. 23-61, 2003. ISSN 0065-3527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696326> >.
- 64 MAROVICH, M. et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 6, n. 3, p. 219-24, Dec 2001. ISSN 1087-0024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11924831> >.
- 65 DIAMOND, M. S. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. **Immunol Cell Biol**, v. 81, n. 3, p. 196-206, Jun 2003. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752684> >.
- 66 HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale J Biol Med**, v. 42, n. 5, p. 350-62, Apr 1970. ISSN 0044-0086. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5419208> >.
- 67 _____. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Rev Infect Dis**, v. 11 Suppl 4, p. S830-9, 1989 May-Jun 1989. ISSN 0162-0886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2665015> >.
- 68 MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nat Med**, v. 9, n. 7, p. 921-7, Jul 2003. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808447> >.
- 69 GREEN, S. et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. **J Infect Dis**, v. 179, n. 4, p. 755-62, Apr 1999. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068569> >.
- 70 STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bull World Health Organ**, v. 83, n. 4, p. 308-14, Apr 2005. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15868023> >.
- 71 **Brasil. Dengue - diagnóstico e manejo clínico**. SAÚDE, M. D.; VIGILÂNCIA, S. D., et al. Brasil 2007.
- 72 COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **J Virol**, v. 79, n. 2, p. 853-9, Jan

2005. ISSN 0022-538X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613313>>.
- 73 GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis**, v. 8, n. 2, p. 69-80, Mar 2004. ISSN 1201-9712. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732325>>.
- 74 FARRAR, J. **Clinical Features of Dengue** London Imperial College Press 2008. ISBN ISBN-13 978-1-84816-228-0 ISBN-10 1-84816-228-6
- 75 CAMPAGNA, D. E. S. et al. Etiology of exanthema in children in a dengue endemic area. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 5, p. 354-8, 2006 Sep-Oct 2006. ISSN 0021-7557. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951800>>.
- 76 ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 257, n. 1, p. 1-6, Apr 1999. ISSN 0042-6822. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208914>>.
- 77 WILLS, B. A. et al. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 3, p. 277-85, Aug 2002. ISSN 1537-6591. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115093>>.
- 78 NARVAEZ, F. et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 11, p. e1397, Nov 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087348>>.
- 79 SANTOS, N. Q. et al. Guillain-Barré syndrome in the course of dengue: case report. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, n. 1, p. 144-6, Mar 2004. ISSN 0004-282X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122449>>.
- 80 CHEN, T. Y.; LEE, C. T. Guillain-Barré syndrome following dengue fever. **Ann Emerg Med**, v. 50, n. 1, p. 94-5, Jul 2007. ISSN 1097-6760. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572299>>.
- 81 SOARES, C. N. et al. Oligosymptomatic dengue infection: a potential cause of Guillain Barré syndrome. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 66, n. 2A, p. 234-7, Jun 2008. ISSN 0004-282X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18545789>>.
- 82 SERAVALI, M. R. et al. Spontaneous splenic rupture due to dengue fever: report of two cases. **Braz J Infect Dis**, v. 12, n. 6, p. 538-40, Dec 2008. ISSN 1678-4391. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287846>>.
- 83 LEE, L. K. et al. Clinical relevance and discriminatory value of elevated liver aminotransferase levels for dengue severity. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, p. e1676, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679523>>.

- 84 UEHARA, P. M. et al. [Liver involvement in patients with dengue hemorrhagic fever: a rare phenomenon?]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 6, p. 544-7, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308699> >.
- 85 SOUZA, J. et al. Acalculous cholecystitis in dengue. Case reports. **Rev Bras Clin Med**, v. 7, 2009.
- 86 CHITRA, T. V.; PANICKER, S. Maternal and fetal outcome of dengue fever in pregnancy. **J Vector Borne Dis**, v. 48, n. 4, p. 210-3, Dec 2011. ISSN 0972-9062. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22297282> >.
- 87 CHYE, J. K. et al. Vertical transmission of dengue. **Clin Infect Dis**, v. 25, n. 6, p. 1374-7, Dec 1997. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431381> >.
- 88 WATANAVEERADEJ, V. et al. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. **Am J Trop Med Hyg**, v. 69, n. 2, p. 123-8, Aug 2003. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13677366> >.
- 89 DA MOTA, A. K. et al. [Maternal mortality and impact of dengue in Southeast Brazil: an ecological study, 2001-2005]. **Cad Saude Publica**, v. 28, n. 6, p. 1057-66, Jun 2012. ISSN 1678-4464. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666810> >.
- 90 KARIYAWASAM, S.; SENANAYAKE, H. Dengue infections during pregnancy: case series from a tertiary care hospital in Sri Lanka. **J Infect Dev Ctries**, v. 4, n. 11, p. 767-75, Nov 2010. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252457> >.
- 91 OLIVEIRA, E. C. et al. [Hematological abnormalities in patients with dengue]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 6, p. 682-5, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209355> >.
- 92 KAO, C. L. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 38, n. 1, p. 5-16, Feb 2005. ISSN 1684-1182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15692621> >.
- 93 PHILIP SAMUEL, P.; TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 5, p. 615-28, May 2006. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873905> >.
- 94 SHU, P. Y. 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. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 10, n. 4, p. 622-30, Jul 2003. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853395> >.

- 95 KITTIGUL, L. et al. Comparison of dengue virus antigens in sera and peripheral blood mononuclear cells from dengue infected patients. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 15, n. 4, p. 187-91, Dec 1997. ISSN 0125-877X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9579611> >.
- 96 JESSIE, K. et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **J Infect Dis**, v. 189, n. 8, p. 1411-8, Apr 2004. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073678> >.
- 97 MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol**, v. 16, n. 4, p. 204-8, 1997 Jul-Aug 1997. ISSN 0722-5091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9266146> >.
- 98 YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 3, p. 1053-7, Mar 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698995> >.
- 99 ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 376-81, Feb 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825945> >.
- 100 LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v. 186, n. 8, p. 1165-8, Oct 2002. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12355369> >.
- 101 LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 3, p. 545-51, Mar 1992. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372617> >.
- 102 GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 6, p. 621-7, Nov 1996. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8914749> >.
- 103 BARKHAM, T. M. et al. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, n. 2, p. 142-8, Feb 2006. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212996> >.
- 104 NIESTERS, H. G. Clinical virology in real time. **J Clin Virol**, v. 25 Suppl 3, p. S3-12, Dec 2002. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467772> >.

- 105 DE OLIVEIRA POERSCH, C. et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **J Clin Virol**, v. 32, n. 4, p. 272-7, Apr 2005. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780804> >.
- 106 MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 6, p. 1292-305, Mar 2002. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884626> >.
- 107 VENKATA SAI, P. M.; DEV, B.; KRISHNAN, R. Role of ultrasound in dengue fever. **Br J Radiol**, v. 78, n. 929, p. 416-8, May 2005. ISSN 0007-1285. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845934> >.
- 108 SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **N Engl J Med**, v. 366, n. 15, p. 1423-32, Apr 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494122> >.
- 109 TRICOU, V. et al. Correction: A Randomized Controlled Trial of Chloroquine for the Treatment of Dengue in Vietnamese Adults. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, Jun 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761965> >.
- 110 DE DUVE, C. Lysosomes revisited. **Eur J Biochem**, v. 137, n. 3, p. 391-7, Dec 1983. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6319122> >.
- 111 FARIAS, K. J.; MACHADO, P. R.; DA FONSECA, B. A. Chloroquine inhibits dengue virus type 2 replication in vero cells but not in c6/36 cells. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 282734, 2013. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431254> >.
- 112 PREMARATNA, R. et al. Effect of a single dose of methyl prednisolone as rescue medication for patients who develop hypotensive dengue shock syndrome during the febrile phase: a retrospective observational study. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 6, p. e433-4, Jun 2011. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530348> >.
- 113 _____. Repeated dengue shock syndrome and 'dengue myocarditis' responding dramatically to a single dose of methyl prednisolone. **Int J Infect Dis**, v. 16, n. 7, p. e565-9, Jul 2012. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521778> >.
- 114 NGUYEN, N. M. et al. A Randomized, Double-Blind Placebo Controlled Trial of Balapiravir, a Polymerase Inhibitor, in Adult Dengue Patients. **J Infect Dis**, Aug 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22807519> >.
- 115 OSTRONOFF, M. et al. Serious thrombocytopenia due to dengue hemorrhagic fever treated with high dosages of immunoglobulin. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 12, p. 1623-4, Jun 2003. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12802766> >.

- 116 DIMAANO, E. M. et al. Lack of efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin treatment of severe thrombocytopenia in patients with secondary dengue virus infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 6, p. 1135-8, Dec 2007. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165536> >.
- 117 UNDEM, J. B.; LICHTENSTEIN, L. M. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10th. MacGraw-Hill companies, Inc., 2005. 1647 ISBN 0-07-135469-7.
- 118 COIMBRA, R.; MELBOSTAD, H.; HOYT, D. B. Effects of phosphodiesterase inhibition on the inflammatory response after shock: role of pentoxifylline. **J Trauma**, v. 56, n. 2, p. 442-9, Feb 2004. ISSN 0022-5282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960994> >.
- 119 SALGADO, D. et al. Use of pentoxifylline in treatment of children with dengue hemorrhagic Fever. **Pediatr Infect Dis J**, v. 31, n. 7, p. 771-3, Jul 2012. ISSN 1532-0987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481426> >.
- 120 SPERANÇA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 425-33, Jun 2007. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612761> >.
- 121 SHEPARD, D. S. et al. Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine. **Vaccine**, v. 22, n. 9-10, p. 1275-80, Mar 2004. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003657> >.
- 122 BRICKS, L. *Dengue vaccines: perspectives* **Pediatria (São Paulo)**, v. 26(4):268-81 2004.
- 123 GALLER, R.; BONALDO, M. C.; ALVES, A. M. Dengue vaccines: closer but not there yet. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 905-6, Dec 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22241108> >.
- 124 RAVIPRAKASH, K. et al. A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. **Virology**, v. 353, n. 1, p. 166-73, Sep 2006. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814355> >.
- 125 WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 7, p. 518-28, Jul 2007. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558424> >.
- 126 ROTHMAN, A. L. et al. Induction of T lymphocyte responses to dengue virus by a candidate tetravalent live attenuated dengue virus vaccine. **Vaccine**, v. 19, n. 32, p. 4694-9, Sep 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535318> >.
- 127 CALVERT, A. E. et al. Non-structural proteins of dengue 2 virus offer limited protection to interferon-deficient mice after dengue 2 virus challenge. **J Gen Virol**, v.

- 87, n. Pt 2, p. 339-46, Feb 2006. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432020> >.
- 128 SABCHAREON, A. et al. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, n. 2, p. 99-109, Feb 2004. ISSN 0891-3668. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14872173> >.
- 129 LANG, J. Recent progress on sanofi pasteur's dengue vaccine candidate. **J Clin Virol**, v. 46 Suppl 2, p. S20-4, Oct 2009. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800562> >.
- 130 GUY, B. et al. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7229-41, Sep 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21745521> >.
- 131 MAHONEY, R. T. et al. Cost of production of live attenuated dengue vaccines: a case study of the Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil. **Vaccine**, v. 30, n. 32, p. 4892-6, Jul 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406455> >.
- 132 KATZ, T. M.; MILLER, J. H.; HEBERT, A. A. Insect repellents: historical perspectives and new developments. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, n. 5, p. 865-71, May 2008. ISSN 1097-6787. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272250> >.
- 133 KOREN, G.; MATSUI, D.; BAILEY, B. DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. **CMAJ**, v. 169, n. 3, p. 209-12, Aug 2003. ISSN 0820-3946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900480> >.
- 134 MENON, K. S.; BROWN, A. E. Exposure of children to Deet and other topically applied insect repellents. **Am J Ind Med**, v. 47, n. 1, p. 91-7, Jan 2005. ISSN 0271-3586. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15597352> >.
- 135 **CDC-ATSDR. DEET (N,N-Diethyl-meta-toluamide). Chemical Technical Summary for Public Health and Public Safety Professionals. Atlanta, Georgia 2004.**
- 136 ROSS, E. A. et al. Insect repellent [correction of repellent] interactions: sunscreens enhance DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) absorption. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 8, p. 783-5, Aug 2004. ISSN 0090-9556. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258101> >.
- 137 **ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Utilização do DEET em preparações de repelentes para insetos. Brasil 2006.**

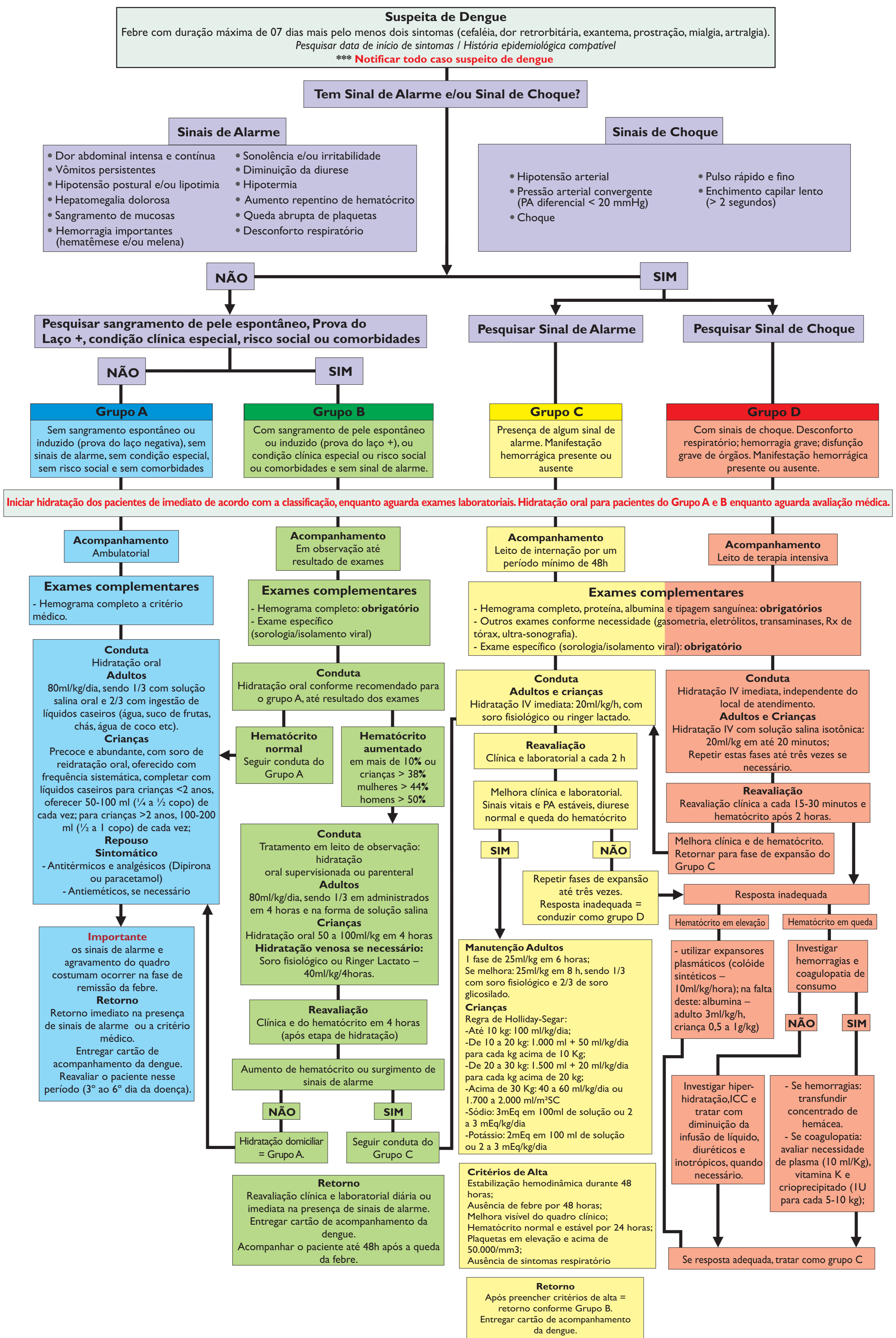
- 138 ABRAMOWITZ. Picaridin - A New Insect Repellent **The Medical Letter on Drugs and Therapeutics** n. 1210 p. 46, 2005. Disponível em: < <http://secure.medicalletter.org/w1210b> >.
- 139 HALLEM, E. A. et al. Olfaction: mosquito receptor for human-sweat odorant. **Nature**, v. 427, n. 6971, p. 212-3, Jan 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14724626> >.
- 140 SHAPIRO, R. Prevention of vector transmitted diseases with clove oil insect repellent. **J Pediatr Nurs**, v. 27, n. 4, p. 346-9, Aug 2012. ISSN 1532-8449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22703681> >.
- 141 TRONGTOKIT, Y. et al. Laboratory and field trial of developing medicinal local Thai plant products against four species of mosquito vectors. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 35, n. 2, p. 325-33, Jun 2004. ISSN 0125-1562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691131> >.
- 142 POLONI, T. R. et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. **Virol J**, v. 7, p. 22, 2010. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105295> >.
- 143 **BRASIL-IBGE. Censo demográfico 2010. ESTATÍSTICA, I. B. D. G. E. 2010.**
- 144 ANDRIOLO, A. et al. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso 2ª Edição.** Barueri, São Paulo: 2010. 115 ISBN 978-85-98416-94-6
- 145 DOS SANTOS, H. W. et al. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. **J Med Virol**, v. 80, n. 8, p. 1426-33, Aug 2008. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551599> >.
- 146 DE MORAIS BRONZONI, R. V. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 696-702, Feb 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695666> >.
- 147 TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 8, p. 1596-9, Aug 2007. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488738> >.
- 148 **Basic Local Alignment Search Tool.**
- 149 BISWAS, H. H. et al. Early clinical features of dengue virus infection in nicaraguan children: a longitudinal analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 3, p. e1562, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22413033> >.
- 150 BALASUBRAMANIAN, S.; RAMACHANDRAN, B.; AMPERAYANI, S. Dengue viral infection in children: a perspective. **Arch Dis Child**, v. 97, n. 10, p. 907-12, Oct

2012. ISSN 1468-2044. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806236> >.
- 151 CORDEIRO, M. T. Laboratory diagnosis for dengue. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 54 Suppl 18, p. S10-2, Oct 2012. ISSN 1678-9946. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23011452> >.
- 152 LAI, Y. L. et al. Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for Dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 935-41, Mar 2007. ISSN 0095-1137. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215345> >.
- 153 HANG, V. T. et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 1, p. e360, 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19156192> >.
- 154 DUSSART, P. et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 11, p. 1185-9, Nov 2006. ISSN 1556-6811. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988003> >.
- 155 KUMARASAMY, V. et al. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. **Singapore Med J**, v. 48, n. 7, p. 669-73, Jul 2007. ISSN 0037-5675. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609831> >.
- 156 GUZMAN, M. G. et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 8, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824173> >.
- 157 BESSOFF, K. et al. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 10, p. 1513-8, Oct 2008. ISSN 1556-679X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685015> >.
- 158 FELIX, A. C. et al. Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 12, p. 1972-6, Dec 2012. ISSN 1556-679X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100478> >.
- 159 HIRAYAMA, T. et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 6, p. 2047-52, Jun 2012. ISSN 1098-660X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22442323> >.

- 160 KANESA-THASAN, N. et al. Atypical antibody responses in dengue vaccine recipients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 69, n. 6 Suppl, p. 32-8, Dec 2003. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14740953> >.
- 161 DURBIN, A. P. et al. A single dose of any of four different live attenuated tetravalent dengue vaccines is safe and immunogenic in flavivirus-naïve adults: a randomized, double-blind clinical trial. **J Infect Dis**, v. 207, n. 6, p. 957-65, Mar 2013. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329850> >.
- 162 **BRASIL. Dengue - diagnóstico e manejo clínico - criança.** SAÚDE, M. D.; VIGILÂNCIA, S. D., et al. Brasil: 52 p. 2011.
- 163 OOI, E. E.; GOH, K. T.; GUBLER, D. J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 6, p. 887-93, Jun 2006. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707042> >.
- 164 GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 1, p. 33-42, Jan 2002. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11892494> >.
- 165 BALMASEDA, A. A. et al. High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. **Trop Med Int Health**, v. 11, n. 6, p. 935-42, Jun 2006. ISSN 1360-2276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772016> >.

DENGUE

Classificação de Risco e Manejo do paciente



Condições clínicas especiais e/ou risco social ou comorbidades: lactentes (menores de 2 anos), 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), doença renal crônica, doença ácido-peptica e doenças auto-imunes. Estes pacientes podem apresentar evolução desfavorável e devem ter acompanhamento diferenciado.

Exames complementares: hemograma obrigatório e outros exames laboratoriais de acordo com a condição clínica associada.

Reclassificar os pacientes após cada avaliação clínica e resultado de exames seguindo protocolo da dengue e vigilância clínica específica (condições associadas).

Obs: consultar manual do MS para conduta em condições clínicas especiais.

Prova do Laço
Verificar a PA (deitada ou sentada); Calcular o valor médio: (PA sistólica + PA diastólica)/2;
Insuflar novamente o manguito até o valor médio e manter por cinco minutos em adulto (em crianças, 3 minutos) ou até o aparecimento de micro petéquias ou equimoses;
Desenhar um quadrado de 2,5 cm (ou uma área ao redor da falange distal do polegar) no antebraço.
Contar o número de micro petéquias no quadrado. A prova será positiva se houver 20 ou mais petéquias em adultos e 10 ou mais em crianças.

Todo caso suspeito de dengue deve ser notificado à vigilância epidemiológica, sendo imediata a notificação das formas graves.



Ministério da Saúde





www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 19 de janeiro de 2010

Ofício nº 113/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado "**ESTUDO PROSPECTIVO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE EM CRIANÇAS NO MUNICÍPIO DE RIBEIRÃO PRETO, SÃO PAULO**" foi analisado "AD REFERENDUM" e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 10075/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

TELMA REGINA RAMOS SILVA POLONI

PROF. DR. VICTOR HUGO AQUINO QUINTANA (Orientador)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO – CENTRO DE PESQUISA EM
VIROLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “Estudo prospectivo da infecção pelo vírus da dengue em crianças no município de Ribeirão Preto, São Paulo”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: TELMA REGINA RAMOS SILVA POLONI– CRM-SP 102.999
PROF. DR. VICTOR HUGO AQUINO QUINTANA - Orientador

PROMOTORES DA PESQUISA: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

SUPORTE FINANCEIRO: Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia (INTC) em Dengue.

CONVITE: Gostaria de convidá-los e solicitar a sua autorização para que o senhor(a) e seu filho(a) participem de um estudo sobre a infecção causada pelo vírus da dengue.

MOTIVO DO ESTUDO

A dengue é uma doença transmitida pela picada do mosquito *Aedes*. A infecção pelo vírus da dengue é muito comum e quando alguém já teve dengue pela primeira vez, fica com mais chance de ter a forma mais grave (hemorrágica) se pegar a doença pela segunda ou terceira vez. Ainda se sabe pouco do que esta infecção pode causar nas crianças. Quando o médico suspeita de dengue e a criança recebe logo o tratamento de hidratação, a melhora pode ser mais rápida, mas quase todas as crianças que tem infecção pelo vírus da dengue parecem iguais aquelas com outra virose na hora em que o médico examina. Existem quatro tipos de vírus: Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 e Dengue 4 e este estudo quer saber se a criança já teve algum deles antes e se quando seu filho(a) estiver com febre isto pode ser por causa do vírus da dengue.

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO NECESSÁRIOS PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Se o senhor(a) aceitar o nosso convite e concordar em participar dando a sua autorização, será colhido um pouco de sangue do seu filho(a) para fazer o exame e verificar se ele(a) já teve esta infecção alguma vez. Se, durante este estudo, seu filho(a) tiver alguma febre ou manchas na pele, o senhor(a) deverá trazê-lo para ser atendido e colher sangue, urina e saliva para saber se o que está provocando a doença é o vírus da dengue. Será colhido 3ml de sangue com agulha fina própria para crianças, por uma pessoa experiente e treinada para colher sangue de crianças. Esta pessoa fará apenas uma tentativa de colher o sangue e se não conseguir na primeira vez não tentará mais. Todo o material a ser utilizado é descartável. Será colhida 5ml de urina nas crianças menores de 2 anos com saquinhos plásticos coletores sem risco de machucar seu filho(a). A urina das crianças maiores será colhida com coletor universal (tipo potinho). A saliva será colhida com um tubinho de plástico (1,5ml) colocado na parte de dentro da bochecha, sem nenhum risco de machucar a boca do seu filho(a). Estes materiais coletados de seu filho(a) serão levados para o Laboratório do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para fazer exames para dengue.

Se o senhor(a) concorda em participar do estudo, solicitamos que preencha um formulário e que concorde em fazer o acompanhamento do seu filho neste ambulatório para que o prontuário de seu filho(a) possa ser analisado caso seja necessário. A participação não lhe trará nenhum gasto. Não haverá nenhuma despesa para você além daquela que normalmente você teria que ter para trazer o seu filho(a) para o acompanhamento. Sempre que possível será solicitado o assentimento da criança.

RISCOS E/OU DESCONFORTOS

Não é esperado que o seu filho(a) corra risco algum ao participar deste estudo. Na coleta de sangue é esperado um pequeno desconforto pela agulha, mas ela é fina, apropriada para cada idade e a coleta será feita de modo muito cuidadoso. Poderá ficar uma pequena marca levemente arroxeadada no local, mas para evitar isto será feito um pequeno curativo com material esterilizado. Na coleta de urina o único desconforto será naquelas crianças muito pequenas que deverão ficar um pouco de tempo com o saquinho plástico coletor até urinar. Na coleta da saliva o único desconforto esperado é o tubinho de plástico que será colocado no canto da bochecha para colher um pouco de saliva sem machucar a boca do seu filho(a).

BENEFÍCIOS ESPERADOS

O seu filho(a) pode se beneficiar ao participar deste estudo, pois se soubermos que ele tem infecção pelo vírus da dengue, o médico poderá tomar as medidas necessárias mais rapidamente. Não haverá nenhuma despesa para você com relação ao tratamento da criança. O resultado deste estudo pode no futuro ajudar outras crianças com esta infecção. Mesmo que o seu filho(a) não tenha tido contato com a dengue ou não adoença com dengue durante o estudo, sua participação pode nos ajudar a entender como a infecção age nas crianças e se é possível fazer o exame que mostra se a pessoa tem dengue usando urina ou saliva. Assim, no futuro, poderemos tentar ajudar a diagnosticar a infecção em grande número de crianças. Após este estudo acabar, os resultados serão divulgados para todas as pessoas que possam ter benefícios com este conhecimento e também serão publicados, mas o seu nome e o nome de seu filho(a) nunca serão identificados.

LESÃO RELACIONADA COM O ESTUDO

Como foi descrito acima, não há riscos importantes em participar deste estudo, para o seu filho(a). Caso seu filho(a) sofra algum tipo de lesão como resultado deste estudo, o CSE-Ipiranga dará a ele o tratamento necessário e imediato. Este estudo não modificará nenhum tratamento de rotina que o seu médico fornecerá a você e seu filho(a), nas questões relacionadas a saúde dele(a). Não há nenhum programa de compensação monetária por meio deste estudo, mas seu filho(a) não estará renunciando a nenhum direito legal ao assinar este termo de consentimento. Caso o senhor(a) assine, mas depois resolva não participar mais, pode fazer isto a qualquer momento com toda a liberdade bastando somente avisar da sua saída.

ASSINATURAS

O tratamento e todos os cuidados de seu filho(a) estarão garantidos em qualquer tempo, mesmo que você não concorde em participar. Se tiver lido o termo de consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você) e tiver entendido a informação, e concorda voluntariamente em permitir que seu filho(a) participe deste estudo, por favor assine abaixo. Você receberá um via deste termo e a outra ficará guardada no arquivo dos pesquisadores responsáveis. O endereço dos pesquisadores é: Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Avenida Bandeirantes, 3900 – CEP14049900 – Ribeirão Preto. Telefones: (16)36024506 e (16)36024510. Nosso site na internet: <http://www.fmrp.usp.br/virologia/index.htm>

Nome do responsável pelo voluntário

Assinatura do responsável

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Eu expliquei o motivo deste estudo ao responsável pela criança. Estou certo de que ele (a) entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios deste estudo.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura _____

Data:

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Telma Regina Ramos Silva Poloni