UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Fábio Pio Dornas

**Investigação sorológica de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em
crianças atendidas no Centro de Saúde Escola Dr. Edgard Aché do
município de Ribeirão Preto, São Paulo**

Ribeirão Preto

2012

FÁBIO PIO DORNAS

**Investigação sorológica de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em
crianças atendidas no Centro de Saúde Escola Dr. Edgard Aché do
município de Ribeirão Preto, São Paulo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas á
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino
Quintana

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2012

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pio Dornas, Fábio

Investigação sorológica de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em crianças atendidas no Centro de Saúde Escola Dr. Edgard Aché do município de Ribeirão Preto, São Paulo. Ribeirão Preto 2012.

65 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Aquino, Victor Hugo.

1. Dengue. 2. Diagnóstico. 3. ELISA. 4. Soroprevalência.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fábio Pio Dornas

Investigação sorológica de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em crianças atendidas no Centro de Saúde Escola Dr. Edgard Aché do município de Ribeirão Preto, São Paulo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A minha mãe Solange pelo apoio, inspiração; sinônimo de guerreira

Ao meu pai Roberto, sinônimo de responsabilidade

Aos meus irmãos Fernando e Fellipe, sinônimos de amor

Aos meus amigos, sinônimos de confiança

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para finalizar esta caminhada e também:

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia e ao CSE Ipiranga por me dar condições para realizar meu trabalho;

Ao Professor Dr. Victor Hugo Aquino Quintana, meu mestre, que com paciência me orientou e abriu seu laboratório para realização dos meus experimentos; pela confiança que me deu; por toda ajuda e conversas que tanto contribuíram no meu crescimento pessoal, científico e intelectual;

À Vanessa por ser amiga; pelo acolhimento no laboratório desde minha chegada; pelo incentivo na realização dos meus sonhos pessoais e na realização deste trabalho; pela companhia no laboratório e na vida social; pelos abraços matinais; pela sempre preocupação comigo;

À Telma que me deu oportunidade de trabalhar junto dela em seu projeto de doutorado, se tornando uma companheira; pelo carinho e sensibilidade;

Ao Anibal, amigo e companheiro ao longo destes 3 anos no laboratório e vida social; pela troca de experiências pessoais; pela companhia;

Ao Alberto que me ajudou e incentivou na realização de um sonho e pelos diários conselhos pessoais e em alguns experimentos; pela amizade;

À Dê Gonçalves que sempre esteve presente em momentos especiais durante o mestrado; pela amizade; pelas conversas pessoais e profissionais;

Ao Rafael Augusto Arantes e Danusa Reis Heluy que auxiliaram no recrutamento e coletas das amostras analisadas neste projeto e a todos do Centro de Saúde Escola Dr. Edgard Aché (CSE Ipiranga) que de alguma forma ajudaram e assim, foram essenciais para realização deste trabalho;

Aos meus colegas e ex-colegas de laboratório Dri, Fernanda, Gabi, Jaseem, Larissa, Liz, Nat, Nicole, Nilton, Rafael, Raquel, Sabrina, Veridiana, pela convivência, companhia e ajudas;

Ao Professor Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca, ao Professor Dr. Michael Cappello e a Pró-reitoria de Pós-Graduação da USP por permitir e me ajudar na participação no “*Program YALE International Training Center for Global Infectious Disease Research*”;

Ao Professor Dr. Michael Cappello por ter provido todo suporte para realização do estágio em seu laboratório na *YALE University* e a Lisa Harrison pelo acompanhamento diário em meu trabalho nesta mesma universidade;

Ao professor Dr. Juan Arbiza pela oportunidade de estagiar em seu laboratório de Virologia na *Universidad de Montevideo* e a todos docentes e colegas que de alguma forma me ajudaram;

Ao IV Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa que muito contribui na minha formação durante a pós-graduação e que me permitiu fazer contatos científicos e amizades, em especial ao Nelson Aguiar (*in memorian*);

À Aline, Soraya e Suely pela constante ajuda técnica no Centro de Pesquisa em Virologia e no Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto;

À Rosana Florêncio, Henrique e demais funcionários da secretaria de pós-graduação pelo suporte administrativo e auxílios financeiros que sempre estavam de prontidão para ajudar;

Aos meus amigos Ana Lígia Leandrini, Denise Brentan, Jeziel Dener, Lorena Ayres, Magu, Marco Aurélio (Peti), Sandrinha pelo apoio, todas ajudas, pelas conversas, por me permitir fazer parte de suas vidas;

Aos meus amigos mineiros que me apoiaram a vir estudar em Ribeirão Preto, em especial Altamir Fernandes, Jairo Santana, Juliano Vasconcelos, Lucas Andrade, Marcos Castro e Rafael Gudar;

À minha mãe Solange, ao meu pai Roberto e meus irmãos, Fellipe e Fernando pela eterna inspiração, pelo apoio psicológico, moral e financeiro, pelo incentivo, pelo carinho, por apoiar e respeitar minhas escolhas, enfim por ser a razão do meu viver;

À toda minha família e parentes que de alguma forma ajudaram e incentivaram, em especial Tio Luís, Tia Ângela, avó Rute e avô Viriato (*in memorian*);

Ao Gabriel Valente, Cristina e demais funcionários da Biblioteca Central da USP-Ribeirão Preto pela revisão da formatação deste trabalho;

Aos docentes da FCFRP que sempre estão abertos a ajudar, em especial aos que tive oportunidade de ter aulas, as quais foram importantes para a concretização deste trabalho;

Às agências de fomento CAPES pela bolsa de estudo, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste projeto;

À todos que de alguma forma me ajudaram e por descuido deixei de citar.

Não conseguiria caminhar sem a ajuda de vocês!

Muito obrigado,

Fábio

“Só damos passos realmente quando nos dispomos a ir um pouco além do que estaria ao nosso alcance.”

Trigueirinho

“Ao longe, lá no briho do sol, estão minhas mais sublimes aspirações. Talvez eu nunca as alcance, mas consigo olhar para o alto e ver suas belezas, acreditar nelas, e tentar seguir por onde elas me guiam.”

Louisa May Alcott

RESUMO

DORNAS, F. P. **Investigação sorológica de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em crianças atendidas no Centro de Saúde Escola Dr. Edgard Aché do município de Ribeirão Preto, São Paulo.** 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A dengue é uma doença infecciosa viral transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* e é um importante problema de saúde pública mundial. A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos (DENV 1-4) pode apresentar diferentes quadros clínicos: pode ser assintomática, causar uma síndrome febril indiferenciada, ou a febre da dengue (DF), a evolução do quadro clínico pode levar a dengue hemorrágica com ou sem choque (DHF/DSS). Um número crescente de casos de infecção por dengue em crianças têm sido observados nos últimos anos. Estudos de prevalência da dengue em regiões endêmicas são importantes para avaliar a incidência da infecção por dengue em crianças. Assim, o objetivo deste estudo é investigar a prevalência de anticorpos anti-dengue IgM e IgG em crianças atendidas no Centro de Saúde Escola Dr. Edgard Aché, localizado na região oeste de Ribeirão Preto-SP. Crianças (n = 271) de 1-15 anos de idade foram recrutadas de março de 2010 até maio de 2011. Depois de um termo de consentimento ter sido assinado pelo responsável, uma amostra de sangue das crianças, participantes deste estudo, foi coletada. As crianças foram classificadas em assintomáticas (n= 174) ou sintomáticas (n = 97), quando estas apresentavam um ou mais de um sintoma sugestivo de dengue, de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde. Anticorpos IgM e IgG anti-dengue foram detectado nas amostras de soro por um ELISA de captura padronizado em nosso laboratório. O ELISA de captura para IgG mostrou uma positividade de 9,23% (25/271) e o ELISA de captura para IgM de 8,49% (23/271). O ELISA de captura para IgG foi positivo em 10,31% (10/97) das crianças sintomáticas e 8,62% (15/174) das crianças assintomáticas, enquanto que o ELISA de captura para IgM foi positivo em 15,46% (15/97) das crianças sintomáticas e 4,6% (8/174) em crianças assintomáticas. Este estudo mostrou a alta prevalência de anticorpos anti-dengue em crianças da região oeste do município de Ribeirão Preto; mostrou também que a infecção pode ser causada de forma assintomática, e que a infecção por este vírus pode ser um grave problema de saúde nesta população, servindo como um alerta às autoridades de saúde.

Palavras-chave: Dengue, Diagnóstico, ELISA, Soroprevalência.

ABSTRACT

DORNAS, F.P. **Serological Investigation of IgM and IgG antibodies anti-dengue in children attended by Health Center Dr. Edgard Aché in Ribeirão Preto city, São Paulo, Brazil.** 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Dengue is an infectious viral disease transmitted by the biting of mosquitoes of *Aedes* genus and it is an important public health problem worldwide. Infection with any of the four serotypes (DENV 1-4) may be asymptomatic or causes illness ranging from mild viral syndrome, dengue fever (DF) to dengue hemorrhagic fever (DHF). An increasing number of dengue infection cases in children have been noted in the last years. A dengue surveillance study might be an important tool in endemic region to evaluate the incidence of dengue infection in children. Thus, the aim of this study was to investigate the prevalence of anti-dengue IgM and IgG antibodies in children in the Primary Health Care Center, Dr. Edgard Aché, located in the west region of Ribeirão Preto-SP. Children (n=271) from 1 to 15 years old were recruited during March 2010 until May 2011. After a signed consent by the person responsible for the children to participate in this study, a blood sample was collected. The children were classified in asymptomatic (n=174) or symptomatic (n=97) when they had more than one symptom suggestive of dengue according to the World Health Organization criterions. Anti-dengue IgM and IgG were detected in serum samples by a capture ELISA standardized in our laboratory. IgG capture ELISA was positive in 9,23% (25/271) and IgM capture ELISA in 8,49% (23/271) of the children. IgG capture ELISA was positive in 10,31% (10/97) of the symptomatic children and 8,62% (15/174) in asymptomatic children; while IgM capture ELISA was positive in 15,46% (15/97) of symptomatic children and 4,6% (8/174) in asymptomatic children. This study showed the high prevalence of anti-dengue antibodies in children in the west region of Ribeirão Preto. In addition, a high prevalence of dengue-infected children without symptoms was observed. The present survey demonstrated that dengue virus infection might be a problem in children's from Ribeirão Preto city and serve as an alert to the health authorities.

Key word: Dengue, Diagnosis, ELISA, Seroprevalence.

RESUMEN

DORNAS, F.P. **La vigilancia serologica de anticuerpos IgM y IgG anti-dengue en niños atendidos en el Centro de Saúde Dr. Edgard Aché de la ciudad de Ribeirão Preto, São Paulo.** 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

El dengue es una enfermedad infecciosa viral transmitida por la picadura de los mosquitos del género *Aedes* y es un importante problema de salud pública en todo el mundo. La infección con cualquiera de los cuatro serotipos (DENV 1-4) pueden presentar diferentes cuadros clínicos: puede ser asintomática, causar un síndrome febril indiferenciada o fiebre del dengue (FD), la progresión de la enfermedad puede conducir a la fiebre hemorrágica del dengue con o sin shock (DH / SCD). Un número creciente de casos de dengue en los niños se han observado en los últimos años. Los estudios sobre la prevalencia del dengue en áreas endémicas pueden ser herramientas importantes para evaluar la incidencia de infección por dengue en los niños. El objetivo de este estudio es investigar la prevalencia de anticuerpos anti-dengue IgM e IgG en los niños en el Centro de Atención Primaria de Salud, Dr. Edgard Aché, ubicado en la región oeste de Ribeirão Preto-SP. Los niños (n = 271) 1-15 años de edad fueron reclutados a partir de marzo de 2010 hasta mayo de 2011. Después de un formulario de consentimiento firmado por los responsables, una muestra de sangre de los niños participantes en este estudio fueron recogidos. Los niños fueron clasificados como asintomáticos (n = 174) o sintomáticos (n = 97), cuando tenían uno o más de los síntomas sugestivos de dengue, de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud IgM e IgG anti-dengue fueron detectados en muestras de suero por ELISA de captura. Anticuerpos IgM y IgG anti-dengue fueron detectados en las muestras de suero por un ELISA de captura estandarizado en nuestro laboratorio. El ELISA de captura para IgG fue positivo en 9,23% (25/271) y para IgM 8,49% (23/271). El ELISA de captura IgG fue positiva en 10,31% (10/97) de los niños sintomáticos y 8,62% (15/174) de los niños asintomáticos, mientras que el ELISA de captura IgM fue positiva en 15,46% (15/97) de niños sintomáticos y 4,6% (8/174) en niños asintomáticos. Este estudio mostró una alta prevalencia de anticuerpos anti-dengue en los niños en la región oeste de la ciudad de Ribeirão Preto, y que la infección con este virus puede ser un grave problema de salud en esta población, que sirve como alerta a las autoridades sanitarias.

Palabras-clave: Dengue, Diagnóstico, ELISA, la soroprevalencia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sugestão de classificação de casos e níveis de gravidade. Modificado de: <i>Dengue: Guideline for diagnosis, treatment, prevention and control - New Edition, 2009</i>	3
Figura 2. Sorotipos de dengue isolados no Brasil por UF, janeiro a agosto 2011 (SVS,2011)	13
Figura 3. Mapa da cidade de Ribeirão Preto mostrando os Distritos de Saúde.....	22
Figura 4. Distribuição segundo o gênero das crianças incluídas no estudo	34
Figura 5. Distribuição segundo a idade das crianças incluídas no estudo (em anos).....	34
Figura 6. Porcentagem de IgM das crianças assintomáticas incluídas no estudo	36
Figura 7. Porcentagem de IgG das crianças assintomáticas incluídas no estudo	36
Figura 8. Porcentagem de IgM das crianças sintomáticas incluídas no estudo.....	38
Figura 9. Porcentagem de IgG das crianças sintomáticas incluídas no estudo	38
Figura 10. Sintomas apresentados pelas crianças incluídas no estudo	38
Figura 11. Porcentagem da infecção das crianças incluídas no estudo em relação à idade	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da padronização inicial do ELISA	29
Tabela 2. Avaliação do ELISA de captura para IgG utilizando os antígenos de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 extraídos do cérebro de camundongo	30
Tabela 3. ELISA de captura testando os antígenos extraídos de DENV-1, DENV-2 e DENV-4	30
Tabela 4. ELISA de captura comparando o diluente contendo 0,5% de BSA e 20% de SHN	30
Tabela 5. ELISA de captura para IgG comparando a diluição das amostras	31
Tabela 6. ELISA de captura comparando duas diluições de MIAF com anticorpo monoclonal anti-envelope	31
Tabela 7. Resultado do ELISA de captura utilizando as amostras testadas com o Kit PanBio.....	33
Tabela 8. Resultado de ELISA de captura para IgM e IgG das amostras de soro das crianças assintomáticas	35
Tabela 9. Resultado de ELISA de captura para IgM e IgG das amostras de soro das crianças sintomáticas.....	37
Tabela 10. Relação da detecção de IgM e o tempo de início dos sintomas.....	39
Tabela 11. Determinação do tipo de infecção das crianças positivas baseado na razão IgM/IgG	39
Tabela 12. Frequência de infecção primária e secundária por grupos etários nas crianças sintomáticas	40
Tabela 13. Dados demográficos das crianças incluídas no estudo	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	do inglês <i>Antibody Dependent Enhancement</i> , Realce Dependente de Anticorpos
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> , Albumina Bovina
CSE- Ipiranga	Centro de Saúde Escola do bairro Ipiranga
DC SIGN	do inglês <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> , células dendríticas
DENV	Vírus Dengue
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> , Ensaio imunoenzimático
Fc	do inglês <i>Fragment Crystallizable region</i> ; Região Cristalizável do anticorpo
FD	Febre de Dengue
FHD	Febre Hemorrágica de Dengue
IEC	Instituto Evandro Chagas
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
MAC- ELISA	do inglês <i>IgM Antibody Capture Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> , Elisa de Captura para anticorpos IgM
NS1	do inglês <i>Non-Structural 1 Protein</i> , Proteína não estrutural 1 da dengue
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> , Solução de Tampão Fosfato
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação de Polimerase em Cadeia
PNCD	Plano Nacional de Controle da Dengue
RNA	Ácido Ribonucléico
RT- PCR	do inglês <i>Reverse Transcription follow by Polymerase Chain Reaction</i> , Transcrição Reversa pela Reação de Polimerase em Cadeia
SCD	Síndrome de choque da Dengue
SHN	Soro Humano Normal
TNF	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i> , Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Ciclo de Transmissão	4
1.2 Patogênese	4
1.3 Diagnóstico Laboratorial	6
1.3.1 Isolamento Viral.....	7
1.3.2 Antígenos Virais	7
1.3.3 Detecção de Ácidos Nucléicos.....	8
1.3.4 Métodos Sorológicos	9
1.4 Tratamento e Perspectiva de Vacina	10
1.5 Profilaxia.....	10
1.6 Dengue no Brasil	11
1.7 Dengue em Ribeirão Preto	14
1.8 Justificativa para este trabalho de Mestrado	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 População de Estudo	21
3.1.1 Local do estudo.....	21
3.1.2 Cálculo Amostral	22
3.1.3 População de estudo.....	23
3.1.4 Amostras Clínicas	24
3.2 Extração do Antígeno Viral pelo Método de Sucrose-Acetona	24
3.3 Preparação de Fluídos Imunes Ascíticos de Camundongos (MIAF).....	25
3.4 Diluente Contendo Soro Humano Normal	25
3.5 Ensaio Imunoenzimático - ELISA	26
3.6 Definição sorológica de infecção pelo vírus da dengue	27

4. RESULTADOS	29
4.1 Padronização do ELISA de captura para IgG e IgM	29
4.2 Seleção dos controles positivos e negativos	32
4.3 Dados demográficos das crianças	33
4.4 Análise Sorológica das Amostras de Soro.....	34
4.4.1 Prevalência de anticorpos anti-DENV	34
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	56

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Dengue é uma doença infecciosa viral causada pelo vírus da dengue (DENV). O DENV é envelopado, possui estrutura icosaédrica com genoma de RNA fita simples positiva de aproximadamente 11 kilobases. O RNA viral possui uma única fase de leitura, a qual codifica uma grande poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e virais em 3 proteínas estruturais (C-preM-E) e 7 proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5). DENV distingue-se antigenicamente em 4 sorotipos (DENV 1-4), mas são geneticamente relacionados e assim, pertencem ao mesmo gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*. (LINDENBACH; RICE, 2003; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

O vírus progenitor, condicionado ao ciclo silvestre, evoluiu em primatas não-humanos provavelmente a partir de um ancestral comum aproximadamente há 500-1000 anos, e com esta evolução, cada um dos DENV (DENV1-4) entrou no ciclo urbano de forma independente (GUZMÁN; KOURÍ, 2004; GUZMAN et al., 2010).

Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em mais de 100 países tropicais e subtropicais onde há transmissão do vírus acarretando mais de 50 milhões de infecções por ano incluindo 500 mil hospitalizações por dengue hemorrágica. Por isto, a dengue é um grande problema de saúde pública mundial (GUZMAN et al., 2010).

O DENV é transmitido ao homem através da picada de fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*. A espécie *Aedes aegypti* é atualmente a principal responsável pela transmissão urbana e o principal transmissor com importância epidemiológica nas Américas. As espécies *A. Albopictus*, *A. africanus* e *A. luteocephalus* são encontradas na África e são potenciais vetores do DENV (GUBLER; CLARK, 1995; HALSTEAD, 2008). Fatores facilitadores para a alta transmissão do vírus incluem o clima tropical, alta densidade populacional e altos níveis de infestação por *A. Aegypti* (WHO, 2009). O *A. aegypti* prefere reproduzir em recipientes de água artificial, embora recipientes naturais, como folhas de palmeiras e bromélias podem também atuar como locais de reprodução. É um mordedor hematófago diurno e é mais ativo logo após nascer do sol e pouco antes do pôr-do sol (TEIXEIRA et al., 2002).

Em 2001, um número recorde de 69 países relataram infecção pelo DENV à Organização Mundial de Saúde (OMS). Epidemias de dengue podem tem ônus econômico e de saúde nas regiões afetadas, tendo, em países endêmicos da Ásia e das Américas, uma carga similar ao de outras doenças da infância e de doenças tropicais, incluindo a tuberculose.

Associado com a globalização, viajantes de áreas endêmicas podem servir como veículos para espalhar ainda mais o agente infeccioso que o agrava ainda mais a situação da dengue a nível mundial (WHO, 2009).

A infecção pelo DENV pode produzir vários quadros clínicos que são condicionados pela idade e estado imunológico do indivíduo acometido pela infecção, apresentando características variáveis, podendo ser assintomáticas ou com sintomas de uma doença febril indiferenciada de duração média de 5 a 7 dias sendo neste caso denominada doença febril indiferenciada. A infecção por DENV também pode apresentar sintomas característicos como cefaléia frontal, dor retro-orbital, mialgias, artralgias, astenia e prostração (febre do dengue - FD). Pode chegar a quadros graves de síndrome do choque da dengue (SCD) que se caracteriza por hemorragias, insuficiência circulatória e choque hipovolêmico. Assim, infecções por DENV pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas o que torna a doença difícil de ser diagnosticada clinicamente tendo o diagnóstico laboratorial como diferencial nos primeiros sintomas de infecção por DENV (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; GUBLER; CLARK, 1995)

A OMS propunha que a infecção por DENV fosse classificada por FD, FHD, SCD de acordo com sinais e sintomas apresentados em indivíduos infectados por DENV e diante destes critérios era corrente interpretar erroneamente a infecção pelo DENV. Assim, a FD pode ter características graves não incluídas na definição de casos como manifestações não usuais de hepatites, encefalopatia e rabdomiólise. Por este motivo, em 2009, a OMS propôs uma nova classificação para tentar atender as necessidades de vigilância, planejamento em saúde pública, discriminação do início da infecção por DENV e desenvolvimento de estudos de investigação sobre a patogênese da dengue. Assim, atualmente a dengue é classificada como grave e não grave de acordo com os sinais e sintomas que o indivíduo apresenta. Na figura 1, é apresentada uma sugestão de classificação da OMS (WHO, 2009).

Figura 1. Sugestão de classificação de casos e níveis de gravidade. Modificado de: *Dengue: Guideline for diagnosis, treatment, prevention and control - New Edition, 2009*

1.1 Ciclo de Transmissão

Na África, Ásia e, possivelmente nas Filipinas, o vírus tem, juntamente com o ciclo humano urbano um ciclo silvestre, provavelmente envolvendo primatas não-humanos como reservatórios e transmitidos por mosquitos relacionados a arboviroses (FAGBAMI; MONATH; FABIYI, 1977; VASILAKIS et al., 2011). Inquérito sorológico em mamíferos sugere que a circulação de dengue segue padrões epidemiológicos, sem sinais clínicos detectáveis nestes hospedeiros (SALUZZO et al., 1986; SILVA et al., 1999).

Seres humanos, após serem picados pelo mosquito vetor, podem apresentar um período de incubação intrínseca de 3 a 14 dias, ou, mas comumente, de 4 e 7 dias. O mosquito, após picar um indivíduo que está em fase de viremia ingere sangue e junto cepas virais. Após um período de 8 a 10 dias no mosquito, dito período de incubação extrínseca, ele está pronto para infectar indivíduos susceptíveis. Um indivíduo infectado com dengue é transmissor para os mosquitos pouco antes do início dos sintomas e logo após o período de infecção (ESLER, 2009; GUZMÁN; KOURÍ, 2004).

Após a infecção de um hospedeiro susceptível, uma auto-limitada e aguda síndrome febril sistêmica segue. O final da infecção ocorre entre de 4 e 7 dias e está associado com uma robusta resposta imune inata e adaptativa. (DE PAULA; FONSECA, 2004).

1.2 Patogênese

A patogênese da dengue ainda não está totalmente esclarecida. Sabe-se que a infecção pelo DENV resulta em imunidade sorotipo-específica duradoura. Porém, essa imunidade é parcial e transitória no caso de infecções subsequentes que envolvam outro sorotipo (SABIN, 1950). Estudos realizados em Cuba, sugerem que um intervalo maior entre as infecções podem aumentar o risco de dengue grave (GUZMÁN; KOURÍ; VALDÉS et al., 2002). A dengue hemorrágica se apresenta de forma similar tanto em crianças quanto em adultos, com pequenas diferenças na frequência de manifestações. Petéquias, melena, dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, náuseas e vômitos são mais comuns em adultos, epistaxe, oligúria e hepatomegalia são mais frequentes em crianças (KITIGUL et al., 2007).

Os mecanismos para o desenvolvimento da dengue grave ainda não estão completamente esclarecidos, mas a hipótese atualmente mais aceita é conhecida como ADE (*antibody dependent enhancement*) na qual anticorpos subneutralizantes pré-existentes opsonizam o vírus em uma infecção secundária e aumentam sua entrada e replicação nos macrófagos/monócitos e células dendríticas via o receptor para Fc do anticorpo (HALSTEAD, 1970). Este processo de ADE aumenta o número de células apresentadoras de antígeno que estimulam células T CD4⁺ e CD8⁺; a ativação das células apresentadoras e das células T induzem a produção de mediadores e citocinas que causam o extravasamento capilar que leva ao choque (HO et al., 2001). O aumento da permeabilidade vascular, com consequente extravasamento plasmático, contribui de forma significativa para o agravamento dos casos. Então, a infecção secundária é o principal fator de risco para o desenvolvimento da dengue grave.

Aproximadamente um terço dos pacientes com dengue podem ter manifestações hemorrágicas leves associadas a trombocitopenia (GUBLER, 1998). A diminuição do nível plaquetário poderia estar relacionada à supressão da medula óssea induzida pela infecção (LA RUSSA; INNIS, 1995). Contudo, outros estudos sugerem que essas células podem ser destruídas por autoanticorpos anti-plaquetas ou pela formação de imunocomplexos na superfície por ligação direta do vírus às mesmas, assim as plaquetas seriam eliminadas por macrófagos e/ou pela ativação do complemento (OISHI et al., 2003; SAITO et al., 2004; WANG et al., 1995).

Outro importante fator que pode estar relacionado ao desenvolvimento da dengue grave é a epidemiologia molecular. Sabe-se que a cepa de DENV-2 do Sudeste Asiático é mais virulenta que a de DENV-2 nas Américas e consequentemente pode ocasionar maior número de casos graves, enquanto aqueles pertencentes ao genótipo Americano estão relacionados a formas mais leves de infecções por DENV (COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005). Isto pode ser comprovado, por exemplo, pela primeira epidemia de FHD/SCD ocorrida em Cuba no ano de 1981 quando foi isolado o genótipo Asiático de DENV-2 (GUZMAN et al., 1984).

A gravidade da dengue também pode estar relacionada a fatores do hospedeiro como doenças crônicas como diabetes e asma (GUZMÁN et al., 1987; LEE et al., 2006), sexo, antígeno leucocitário humano (HLA classe I), tipo sanguíneo e variantes genéticas como a do receptor DC-SIGN e do Fator de Necrose Tumoral (TNF), que também podem atuar neste contexto (KALAYANAROOJ et al., 2007; SAKUNTABHAI et al., 2005; STEPHENS et al., 2002).

Tem sido mostrado que crianças da América Central, Venezuela, e Colômbia podem não desenvolver aumento da permeabilidade vascular tão facilmente quanto crianças do Sudeste Asiático após infecção secundária de dengue (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011). Em crianças, casos graves de dengue têm sido relacionados com o declínio nos níveis de anticorpos maternos (HALSTEAD et al., 2002; CHAU et al., 2008). Em regiões endêmicas, o risco de crianças apresentarem quadros mais graves parece ser maior durante infecções secundárias do que em casos de terceiras e quartas infecções (GIBBONS et al., 2007).

1.3 Diagnóstico Laboratorial

Pacientes são considerados suspeitos de infecção por dengue quando tem febre de duração máxima de sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sinais/sintomas: cefaléia frontal, dor retroorbitária, mialgia, artralgia, prostração e exantema, e que tenha estado em áreas de transmissão de dengue ou com presença de *Aedes aegypti* nos últimos 15 dias (BRASIL, 2009; 2011).

O diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue, baseado em sinais e sintomas clínicos, não é totalmente confiável e por isto uma confirmação laboratorial precisa e eficiente é crucial, sendo também importante para vigilância-epidemiológica, para estudos sobre a patogênese e para pesquisa de vacinas. A confirmação laboratorial da infecção por DENV pode ser realizada através da detecção do vírus específico, do antígeno viral, sequência genômica e/ou anticorpos feitas através de diversas técnicas sendo o isolamento viral, técnicas de biologia molecular e testes sorológicos os mais utilizados (LIMA et al., 2010; PUTTIKHUNT et al., 2011; SHU; HUANG, 2004). Durante a fase inicial da infecção pelo DENV o diagnóstico da infecção é feito pelo isolamento viral, detecção de ácidos nucleicos ou de antígenos virais. No final da fase aguda da infecção testes sorológicos são a melhor escolha para diagnóstico da infecção (WHO 2009).

Achados laboratoriais associados com FD incluem neutropenia seguida por uma linfocitose, muitas vezes marcado por linfócitos atípicos e, possivelmente, nível elevado de aspartato aminotransferase no soro (KAO et al., 2005). Segundo o Manual do Ministério da Saúde, 2007, pacientes infectados são considerados confirmados pelo DENV, quando tiveram exames laboratoriais positivos. No curso de uma epidemia, a confirmação também pode ser

feita por critério clínico-epidemiológico, exceto nos primeiros casos da área, que deverão ter confirmação laboratorial. Descarta-se como casos de dengue, amostras pareadas que apresentaram os 2 resultados negativos para IgM, ou com um diagnóstico laboratorial de outra entidade clínica ou também, sem exame laboratorial, cujas investigações clínica e epidemiológica são compatíveis com outras patologias (BRASIL, 2009; 2011).

1.3.1 Isolamento Viral

Dentre os métodos disponíveis para detecção do vírus, o isolamento viral é o padrão ouro devido à especificidade. Uma das vantagens que o método oferece é a possibilidade dos sorotipos serem determinados utilizando anticorpos monoclonais sorotipos específicos marcados com isotiocianato de fluorescência (imunofluorescência). Porém, além deste método apresentar baixa sensibilidade, as instalações que permitem desenvolvê-lo nem sempre estão disponíveis e o método demanda muito tempo, precisando mais de 7 dias para sua realização. Profissionais treinados são também necessários (KAO et al., 2005).

1.3.2 Antígenos Virais

Ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) e radioimunoensaio detecta antígenos virais de dengue, contudo, a baixa sensibilidade destes testes não permite a frequente análise em laboratórios de rotina (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Antígenos virais também podem ser detectados em soros e células mononucleares do sangue periférico de pacientes em fase aguda através da técnica *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA). As células do sangue periférico de pacientes com dengue geralmente exibem uma maior taxa de detecção de antígenos de DENV do que em amostras de soro. A proteína não estrutural 1 do vírus da dengue (NS1) é um importante antígeno marcador da infecção, já que durante a fase aguda ela é secretada e pode ser detectado tanto associadas a células mononucleares do sangue periférico como ou na sua forma livre. (YOUNG et al., 2000; LIMA et al., 2010)

Para estudos patológicos, a detecção de antígenos virais do DENV por imunohistoquímica em biópsias ou tecidos de autópsia é muito útil fornecendo evidências da infecção. Várias técnicas, tais como colorações utilizando anticorpos monoclonais anti-DENV conjugado com imunoperoxidase ou anticorpos policlonais sorotipo-específicos, tem sido

criadas para a fixação e detecção de antígenos de DENV em tecidos congelados e a partir de espécimes de autópsia e necropsia. (ARYA; AGARWAL, 2010; LIMA et al., 2010; YOUNG et al., 2000).

1.3.3 Detecção de Ácidos Nucléicos

A detecção do genoma viral através de técnicas de biologia molecular podem fornecer evidências de infecção viral na fase precoce sendo importante para o controle de surtos de dengue. Diagnóstico molecular geralmente fornece uma detecção mais sensível e rápida do que métodos de isolamento viral porque amplifica o genoma mesmo para vírus não infecciosos. No entanto, as amostras devem ser cuidadosamente manejadas e acondicionadas para evitar a degradação do ácido ribonucleico (RNA). É difícil generalizar qual teste de detecção molecular é melhor, pois os oligonucleotídeos, as enzimas, os tampões, as condições da reação, os alvos de região genômica viral e as máquinas utilizadas para reação em cadeia da polimerase (PCR) podem influenciar o resultado da PCR apresentando alto risco de contaminação cruzada. Desenvolvimentos atuais da PCR em formato multiplex e/ou métodos de genotipagem/sorotipagem permitem obter importantes informações virológicas. Além das diversas vantagens apresentadas, quantificação do RNA por DENV em amostras de humanos infectados por DENV podem fornecer mais pistas para a realização de estudos de patogenia e monitorar o progresso de manifestação clínica.

Dentre os métodos existentes, a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é amplamente utilizada. Vários métodos de RT-PCR foram desenvolvidos na década passada para a detecção de infecção por DENV durante a fase aguda (FIGUEIREDO; BATISTA; IGARASHI, 1997a, 1997b; LANCIOTTI et al., 1992).

Uma variante da RT-PCR, a realizada em tempo real, é um ensaio totalmente automático e surgiu como uma possibilidade para o diagnóstico de rotina da infecção por DENV. RT-PCR em tempo real é mais rápida do que a RT-PCR convencional, apresenta uma maior sensibilidade, uma menor taxa de contaminação cruzada, padronização fácil, e a possibilidade de análises quantitativas (SANTOS et al., 2008).

1.3.4 Métodos Sorológicos

Apesar dos diversos métodos disponíveis, contudo, os testes sorológicos são mais comumente utilizados para o diagnóstico de infecção por DENV por serem relativamente baratos e apresentarem alta sensibilidade e especificidade comparando com os outros métodos disponíveis (VAUGHN et al., 1997; WHO, 1999). Dentre as técnicas sorológicas disponíveis para o diagnóstico de DENV, a inibição de hemaglutinação (HI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de IgM (MAC-ELISA), e o ELISA para IgG são as mais utilizados para o diagnóstico de infecções pelo vírus da dengue sendo que os dois últimos tornaram-se mais rotineiramente utilizados, devido a sua simplicidade, sensibilidade, especificidade (CLARKE; CASALS, 1958; WHO, 1999; GROEN et al., 2000; SHU et al., 2003). Estes testes detectam anticorpos que são principalmente dirigidos contra as proteínas do envelope do vírus (GUZMAN et al., 2010) ou dirigidos para a proteína não estrutural 1 do vírus dengue (NS1). Esta proteína também é muito utilizada em testes de diagnóstico de antígeno, sendo assim um importante marcador da infecção em amostras de soro, já que durante a fase aguda ela é secretada assim como associada como uma proteína de membrana, e então pode ser detectado em testes de ELISA para antígenos. No entanto, uma importante desvantagem dos testes sorológicos são as reações cruzadas que podem ocorrer devido a alta homologia existente entre os flavivírus (ALCON et al., 2002; LIMA et al., 2010; YOUNG et al., 2000).

A detecção de anticorpos anti-IgM pelo indivíduo infectado pode ser feita a partir do 3^o ao 5^o dia após o início dos sintomas de infecção pelo DENV, tendo um pico em média na 2^a semana e pode persistir de 2 a 3 meses. Já o IgG anti-DENV é detectado 1-14 dias após o início dos sintomas e pode permanecer detectável após vários meses, e provavelmente pelo resto da vida (LIMA et al., 2010; WHO, 2009). Níveis de IgG anti-dengue são mais baixos durante a infecção primária, mas a infecção secundária, muitas vezes resulta no aparecimento de altos níveis de IgG antes da resposta de IgM. Assim, além destes ensaios sorológicos serem importantes para diagnóstico, são também importantes para diferenciar infecções primárias de secundárias. Esta informação é relevante na análise de dados epidemiológicos para patologias, estudos clínicos e imunológicos (WHO 2009).

1.4 Tratamento e Perspectiva de Vacina

Atualmente não há nenhuma vacina ou drogas disponível para o tratamento da dengue. Óbitos por dengue são associados normalmente a sinais clínicos e resposta imunológica quando o indivíduo desenvolve quadros clínicos mais graves como DH ou SCD. Infecções graves podem ser tratadas com sucesso monitorando os sinais de alerta e com o início da terapia de reidratação intravenosa agressiva desde a fase febril inicial, cujos sintomas incluem febre, mal-estar, dor de cabeça, dores no corpo e erupção cutânea, na qual não se conseguem prever quais pacientes vão evoluir para doença grave. Indicativos de extravasamento de plasma e os iminência de choque como sangramento, trombocitopenia de menor de 100.000 plaquetas mm^3 , ascite, derrame pleural, hematócrito maior do que 20% sobre o valor basal de admissão do paciente e contínua dor abdominal, agitação e sonolência, vômitos persistentes e uma redução brusca de temperatura (temperatura de febre à subnormal) associados com a transpiração profusa, adinamia (perda de força ou vigor) e, às vezes desmaios, pode ser indicativos de evolução para as formas mais graves da doença e devem ser monitorados (BRASIL, 2009, 2011)

Diante da gravidade que a infecção por DENV pode atingir em indivíduos acometidos pela infecção, uma vacina contra a dengue tem sido uma prioridade da OMS (WEBSTER, FARRAR *et al.*, 2009). Atualmente, há uma série de vacinas em desenvolvimento para DENV, incluindo DNA recombinante, vírus atenuado ou inativado e vacinas de vetor viral, sendo que várias já estão submetidas a avaliação clínica (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; WEBSTER; FARRAR; ROWLAND-JONES, 2009). A candidata mais avançada entrou recentemente em testes de Fase III, sendo uma vacina tetravalente de vírus vivo atenuado recombinante da SANOFI-PASTEUR (GUIRAKHOO *et al.*, 2000; GUY, ALMOND; LANG, 2011; LAM *et al.*, 2011).

1.5 Profilaxia

Como atualmente nenhuma vacina ou droga para tratamento está disponível, tentativas de profilaxia da dengue são focadas no controle do mosquito vetor. Devido ao seu comportamento urbano e consequentemente associação com os seres humanos - por exemplo aos hábitos consumistas modernos - o principal vetor *A. Aegypti*, único transmissor com

importância epidemiológica nas Américas, requer o uso de uma combinação de métodos de saneamento ambiental e o controle químico baseado na aplicação de larvicidas e *sprays* adulticidas (GUZMAN et al., 2010; LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010).

Programas integrados de manejo de vetores têm se mostrado eficazes na redução do número total de vetores (ERLANGER; KEISER; UTZINGER, 2008). Porém, o custo de manter os programas de controle, a dificuldade de destruir todos os mosquitos em uma área, a urbanização não planejada e o consequente aumento da densidade populacional, associado às condições precárias de saneamento básico, moradia inadequada e o livre trânsito e comércio entre países são algumas limitações encontradas (LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010).

Novas ferramentas e estratégias na tentativa de melhorar o controle e prevenção da dengue estão disponíveis para profissionais da saúde pública. Estratégias globais para prevenção e controle da dengue incluem vigilância ativa com base em um sistema abrangente de informações de saúde, preparação para emergências, capacitação e treinamento e pesquisa do controle de vetores (HINO et al., 2010; LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010).

1.6 Dengue no Brasil

Atualmente no Brasil ocorre cerca de 80% dos casos de infecção por DENV do Hemisfério Ocidental (TEIXEIRA et al., 2009) e estas são descritas no Brasil desde o último século por meio de sinais clínicos, porém somente a partir da década de 1980 vêm acontecendo epidemias pelo DENV, ocorrendo cerca de três milhões de casos ao longo dos anos com significativo aumento na gravidade (MIAGOSTOVICH et al., 1993; BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003).

A primeira infecção por dengue confirmada por testes laboratoriais, ocorreu em 1981, em Boa Vista, Roraima, na região amazônica. O surto foi associado com os sorotipos 1 e 4 e foram estimados 11.000 casos registrados até agosto de 1982. Naquela época, o surto ficou restrito e nenhum outro isolado de DENV-4 foi relatado em qualquer parte do Brasil (LANCIOTTI; GUBLER; TRENT, 1997; OSANAI et al., 1983).

Porém o DENV-1 a partir de março de 1986, foi responsável pela primeira epidemia no sudeste com cerca de 95 mil casos de dengue notificados até 1987 e um número estimado de 3 milhões de pessoas infectadas na cidade do Rio de Janeiro (BALEOTTI; MORELI;

FIGUEIREDO, 2003; HINO et al., 2010). Nesta época isolou-se 80% de amostras coletadas até o quarto dia após o início da doença com sinais e sintomas sugestivos de infecção por DENV (MIAGOSTOVICH et al., 1993).

Após, surtos de DENV-1 foram relatados nos estados de Alagoas (junho de 1986) e Ceará, (setembro de 1986) caracterizando a disseminação da epidemia em direção ao nordeste e também na região centro-oeste do Brasil em 1987 (FUNASA, 2002).

Em abril de 1990, uma nova epidemia de dengue começou na região metropolitana do Rio de Janeiro com o isolamento pela primeira vez de DENV-2 (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003) causando surtos na região norte do Brasil (NOGUEIRA et al., 1992; ZAGNE et al., 1994; VASCONCELOS et al., 1993). Posteriormente, em Alagoas e Tocantins foi isolado o DENV-2 demonstrando que o país já estava acometido pela circulação de DENV-1 e DENV-2 (MIAGOSTOVICH et al., 1993). Casos de FHD foram relatados em regiões com alta densidade populacional do nordeste e sudeste, principalmente pela circulação de DENV-1 e DENV-2, já que uma reinfecção têm sido associado com um maior chance de desenvolver FHD (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003).

Em 1999, o primeiro caso autóctone de DENV-3 no Brasil foi relatado, a partir de um paciente que havia retornado da Nicarágua (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003), sugerindo que a qualquer momento o DENV-3 poderia ser introduzido no Brasil a partir da América Central e no norte da América do Sul. De fato, o primeiro surto de DENV-3 relatado em território brasileiro ocorreu no Rio de Janeiro em 2001 (NOGUEIRA et al., 2001) ocorrendo uma rápida expansão para outros estados (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003; CASALI et al., 2004; ALMEIDA et al., 2008). No início de 2002, durante o surto de DENV-3 no Rio de Janeiro foram notificados 854 casos de FHD/SCD, com 29 mortes. Até fevereiro de 2002, no Brasil havia sido notificado um total de 3.288 casos de FHD/SCD, mostrando que este número havia aumentado quatro vezes desde 1999, com uma taxa de mortalidade por FHD/SCD de 4,3% (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003). A fim de tentar conter a circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, em 2002, o Ministério da Saúde implantou o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que propunha intensificar ações existentes e implementar novas estratégias com maior abrangência operacional.

Em 2003, DENV1-3 já haviam sido isolados em 23 estados e observou-se um número crescente de internações por febre hemorrágica da dengue (DUARTE; FRANÇA, 2006).

Desde 2008 há relatos que o DENV-4 estaria circulando em regiões no Brasil, mas somente em 2010 o Ministério da Saúde confirmou DENV-4 no Brasil. Este ressurgimento do DENV-4 na região amazônica do Brasil provavelmente resultou da proximidade do Brasil

com Venezuela e Colômbia que são países endêmicos para DENV-4 (FIGUEIREDO, 2008). Assim, atualmente os 4 sorotipos circulam no Brasil. Nos estados Ceará, Bahia, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais DENV 1-4 já foram identificados. Somente no estado do Amapá ainda não foi identificado nenhum DENV. A doença, então está presente em 26 dos 27 estados brasileiros, e o mosquito vetor, em todos eles (FIGURA 2). Até setembro de 2011 a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou um total de 721.546 casos de dengue no país. A comparação com o mesmo período de 2010 mostrou uma redução de 24% no total de casos notificados. A Região Sudeste tem o maior número de casos, concentrando 47,6% dos mesmos. Até o momento, amostras inoculadas de diferentes estados mostraram um predomínio do DENV-1 (SVS, 2011).

A série histórica de incidências da dengue do Brasil revela uma tendência ascendente de transmissão da doença. Esse cenário alerta para a possibilidade de persistência da transmissão em níveis elevados no verão de 2012 (SVS, 2011). Diversos programas para o controle do vetor foram implantados pelas autoridades de saúde, como o “Brasil Unido contra a dengue”, mas nenhum foi realmente efetivo.

Figura 2. Sorotipos de dengue isolados no Brasil por UF, janeiro a agosto 2011 (SVS,2011)

O Estado de São Paulo seguiu a mesma tendência que no Brasil, tendo o primeiro surto ocorrido em 1987 no município de Guararapes com 30 casos notificados e em Araçatuba com 16 casos notificados (HINO et al., 2010). A maior incidência neste estado ocorreu em 2001, com 136,2 casos/100.000 habitantes. As curvas de transmissão, tanto do Brasil como a do Estado de São Paulo, apresentaram comportamento cíclico, intercalando anos com incidências mais altas e anos com incidências mais baixas (RIBEIRÃO PRETO, 2005).

1.7 Dengue em Ribeirão Preto

Em 1986, o vetor do vírus da dengue, o mosquito da espécie *Aedes aegypti*, foi identificado em Ribeirão Preto, mas somente em 1989 o município assumiu algumas ações de controle. Antes da primeira epidemia ocorrida em Ribeirão Preto, Figueiredo e colaboradores (1986) demonstraram através de um inquérito sorológico efetuado entre 1983 e 1984 que flavivírus estavam circulando na região de Ribeirão Preto, quando detectaram uma prevalência de anticorpos anti-flavivírus de 19,9% dos indivíduos investigados no estudo. Porém, o DENV-1 foi detectado pela primeira vez neste município em 1990, quando aconteceu a primeira epidemia no município, com 8.900 casos confirmados, representando uma incidência de 546,9 casos/100.000 habitantes da população até março de 1991 (SINAN, SMS, Ribeirão Preto). O número de casos foi maior nos bairros do distrito norte: Vila Albertina, Jardim Jandaia, Vila Recreio, Jd. Presidente Dutra, Ipiranga, Sumarezinho. No bairro Campos Eliseos, no distrito central, também ocorreram muitos casos. Neste mesmo período foi realizado um inquérito sorológico mostrando que crianças de 5 a 15 anos apresentaram uma prevalência da infecção pelo DENV de 5,4% (FIGUEIREDO et al., 1992). De 1992 a 1994, houve um período de transmissão limitada, com poucos casos confirmados. Em 1995 e 1996, houve um recrudescimento da transmissão, embora a níveis menos elevados do que a observada durante a epidemia de 1990 (RODRIGUES et al., 2002; HINO et al., 2010). Em 1997, a incidência apresentou tendência de diminuição e, nos primeiros seis meses do ano, esteve em torno de 25 casos por 100.000 habitantes. Entre as áreas onde a transmissão de dengue ocorreu em 1997, está localizada, uma instituição estatal de correção de adolescentes infratores, na qual foi realizado um inquérito sorológico e virológico da população de internos e funcionários. Este estudo mostrou uma incidência de 23,8% e 18,6% respectivamente entre internos e funcionários dessa instituição. (RODRIGUES et al., 2002). Em 1998, o DENV-2 foi introduzido no município, elevando o número de casos notificados no ano de 1999. Em 2000, o número de casos confirmados na população de Ribeirão Preto foi

de 41,6 casos/100.000 habitantes, enquanto que em crianças de até 14 anos foi de 20,96 casos/100.000 crianças, sendo que antes deste período não há registro do número de casos por faixa etária. Em 2001 houve uma epidemia com incidência de 619,65 casos/100.000 habitantes, caracterizando a segunda grande epidemia de DENV no município com o isolamento dos DENV-1 e DENV-2. Nessa epidemia, as regiões Norte e Oeste foram as que registraram maior números de casos. Neste período a incidência em crianças chegou a 226,4 casos confirmados por 100.000 crianças de até 14 anos. Neste mesmo ano, em 2001, foi confirmado o primeiro caso de FHD, importado do município de Igarapava. Em 2002, houve uma redução significativa com um coeficiente de incidência de 66,66 casos/100.000 habitantes, porém, nesta época o DENV-3 foi detectado pela primeira vez no município num caso importado e após em 3 casos autóctones. Neste mesmo ano 8 casos de infecção pelo vírus foram classificados como FHD. Em 2003 houve um aumento dos casos de dengue, com incidência de 151 casos/100.000 habitantes e em crianças de até 14 anos de 58,6 casos/100.000 crianças. Entre 2004 e 2005, o número de casos diminuíram, mas em 2006 o município passou por uma explosão de casos, registrando uma incidência de 1.071,5 casos/100.000 habitantes, sendo que em crianças a incidência foi de 506,4 casos/100.000 de crianças de até 14 anos. Durante esta epidemia houve o relato dos três primeiros casos de óbitos por infecção por DENV no município. Desde então o município tem apresentado comportamento endêmico. Em 2007, a incidência foi de 189,2 casos/100.000 habitantes com o registro de dois casos de óbitos por infecção de DENV. Com a co-circulação dos sorotipos 2 e 3 de DENV, em 2008, o coeficiente de casos confirmados na população de Ribeirão Preto de DENV foi de 189,2 casos/100.000 habitantes. Neste período 2007-2009 o número de casos em crianças foi menor do que o ano de 2006, variando de 123,6 casos/100.000 (2007) até 239,1 casos/100.000 crianças de até 14 anos (2008). Na população de Ribeirão Preto, em 2009, o número de casos confirmados aumentou para 479,3 casos/100.000 habitantes com a ocorrência de uma morte decorrente da infecção por DENV. Em 2010, o município passou pela maior epidemia de DENV com a co-circulação de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, e apresentou um valor de 29.588 casos confirmados de dengue, obtendo um coeficiente de 4.889,7 casos/100.000 habitantes tendo 12 óbitos ocasionados por infecção por DENV e em crianças de até 14 anos a incidência de 4.766,7 casos/100.000 crianças (SINAN, SMS, Ribeirão Preto). Até o mês de agosto de 2011, a incidência na população de Ribeirão Preto foi de 17.114 casos/100.000 e em crianças foi de 2.790 casos/100.000 crianças, com a confirmação de 27 óbitos.

1.8 Justificativa para este trabalho de Mestrado

Infecções por DENV tem sido documentadas nas Américas e no sudeste da Ásia por mais de dois séculos, mas o sudeste asiático é considerada uma área hiperendêmica para infecção por DENV, pois há a co-circulação dos quatro sorotipos do DENV. Nesta região, a maioria das infecções ocorrem em crianças, mas nas Américas, o DENV acomete principalmente adultos. Porém nas últimas três décadas houve um aumento de 4,6 vezes nos casos de dengue nas Américas, ocorrendo um aumento de incidência na faixa etária pediátrica (TEIXEIRA et al., 2009). Este aumento está também acontecendo em relação a incidência de dengue hemorrágica nas Américas que, embora seja menor do que no Sudeste da Ásia, apresentou um aumento de 8,3 vezes do número de casos de FHD nas últimas três décadas em vários países latino-americanos e do Caribe (GIBBONS, 2010; SAN MARTÍN et al., 2010).

Poucos estudos nas Américas têm investigado soroprevalência de anticorpos anti-DENV em populações saudáveis na faixa etária pediátrica. O primeiro estudo realizado em uma população saudável na América Central com indivíduos em idade escolar investigou a soroprevalência de sintomáticos e a incidência da infecção assintomática por DENV e demonstrou uma inesperada e alta soroprevalência de anticorpos anti-DENV em indivíduos muito jovens, sendo que na faixa etária de 4 anos o índice de prevalência de anticorpos anti-DENV foi de 75% e aos 16 anos 100% (BALMASEDA et al., 2010). Em geral, os dados disponíveis dos grandes centros urbanos nas Américas indicam níveis mais baixos de soroprevalência do que em Manágua-Nicarágua, sendo de 66 a 83% nos município de Iquitos, Peru (HAYES et al., 1996), Salvador, Brasil (TEIXEIRA et al., 2002) e Rio de Janeiro, Brasil (DA CUNHA et al., 1995). No entanto, em Santo Domingo, República Dominicana, a soroprevalência em idades mais avançadas é semelhante à Nicarágua, embora o aumento da soroprevalência por idade seja menos acentuado (YAMASHIRO et al., 2004).

No Brasil, onde atualmente ocorrem cerca de 60 a 70% dos casos de infecção por DENV do Hemisfério Ocidental, vem sendo observado, desde 2007, um aumento inesperado na incidência da doença em pessoas com idade inferior a 15 anos acompanhado pelo aumento de número de casos graves em crianças. Entre os anos de 1998 a 2001, a porcentagem de casos em crianças variou de 9,5% (em 1998) e 22,6% (em 2001). Até o ano de 2006 os casos de FHD ocorriam predominantemente na faixa etária dos 20 aos 40 anos de idade, mas em

2007, o número anual de casos de FHD mais do que dobrou e houve uma diferença na distribuição da faixa etária, 53% dos casos ocorreram em crianças menores que 15 anos (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011). A idade média das pessoas com dengue hemorrágica diminuiu de 38 anos em 2001 para 18 anos em 2008. Crianças menores de 10 anos de idade, que em 2001 representaram 5% de todos os casos, foram responsáveis por 33% dos casos em 2008. Neste mesmo ano, o Rio de Janeiro viveu uma alarmante epidemia, e 42% dos 123 óbitos, ocorreram em menores de 15 anos. No Ceará houve também um aumento da taxa de hospitalizações na faixa etária pediátrica devido ao aumento dos casos de DHF nesta faixa etária. A taxa de hospitalização por dengue entre crianças no Ceará seguiu um padrão semelhante ao de casos de dengue hemorrágica. Além disso, observou-se um aumento de casos em crianças menores que 10 anos de idade durante 2007-2008, particularmente devido a gravidade das duas epidemias, aumento do risco para a dengue hemorrágica, e número de hospitalizações por dengue durante este período (TEIXEIRA et al., 2008).

Uma das ferramentas úteis para estudar este aumento no número de casos em crianças é a realização de um inquérito soropidemiológico utilizando o ELISA para detectar anticorpos IgM e IgG anti-dengue. Este é um método barato apesar de ser um laboroso e é atualmente o padrão ouro para ensaios sorológicos na detecção de anticorpos anti-dengue nas Américas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Investigar a prevalência de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em crianças atendidas no Serviço de Pediatria e Puericultura do Centro de Saúde Escola Doutor Edgard Aché, bairro Ipiranga, Ribeirão Preto, São Paulo e determinar a frequência de infecção primária e secundária nestas crianças.

2.2 Específicos

- Padronizar uma técnica de ELISA para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-dengue.
- Determinar a prevalência de crianças com anticorpos IgM e IgG anti-dengue.
- Determinar a prevalência de infecções assintomáticas nas crianças.
- Determinar a frequência de infecção primária e secundária e sua relação com a idade das crianças com infecção recente pelo vírus da dengue a partir do ELISA de captura.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População de Estudo

3.1.1 Local do estudo

Este estudo foi realizado no município de Ribeirão Preto que se localiza a 313 quilômetros ao nordeste da capital do estado de São Paulo. Tem população total de 604.682 habitantes (IBGE, 2010), possui clima tropical com verão chuvoso (temperatura média de 25°C) e inverno seco (temperatura média de 19°C). Altitude aproximada de 544.800m e tem precipitação pluviométrica média de 1.426,80 mm/ano; o município possui condições climáticas ótimas para a proliferação do vetor da dengue, o mosquito *Aedes aegypti*, o qual, foi encontrado no município desde o ano de 1986. O município está dividido em cinco distritos de saúde: Norte, Sul, Leste, Oeste e Central (Figura 1). Este estudo foi realizado especificamente na Unidade Básica de Saúde Dom Pedro I, no bairro Ipiranga, onde funciona o Centro de Saúde Escola Doutor Edgard Aché (CSE-Ipiranga) ligado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, a qual se encontra localizada no Distrito Oeste. De acordo com a secretaria de saúde de Ribeirão Preto, o Distrito Oeste obteve o maior número de casos confirmados nos anos de 2007 e 2008, tendo respectivamente 31,16% e 38,97% do número total de Ribeirão Preto e por isto foi o distrito escolhido para a realização do estudo. No CSE-Ipiranga são oferecidos serviços de pediatria, ginecologia/obstetrícia, assistência domiciliar, enfermagem, teste do pezinho e vacinação à população de uma área que abrange, dentro do Distrito Oeste, os bairros Ipiranga, Vila Esmeralda e parte do Loteamento Planalto Verde. O Serviço de Pediatria e Puericultura do CSE-Ipiranga atualmente atende em média 270 consultas mensalmente que incluem casos novos, retornos e consultas eventuais (SINAN, SMS, Ribeirão Preto).

Figura 3. Mapa da cidade de Ribeirão Preto mostrando os Distritos de Saúde

3.1.2 Cálculo Amostral

O cálculo amostral para determinar a prevalência de anticorpos anti-DENV foi feito levando em consideração a equação estatística originada da distribuição normal padronizada:

$$N = \frac{(Z\alpha)^2 \times PQ}{e^2}$$

Onde:

N = tamanho da amostra;

$Z\alpha = 2,57$; tabela de distribuição normal padronizada, calculado a partir de 99% de nível de confiança;

P = Prevalência de casos em crianças, sendo o último inquérito realizado por Figueiredo, em 1995, em crianças de 5 a 15 anos, o qual obteve um resultado de 5,4%; assim, $P=0,054$ foi o valor adotado;

$Q = (1 - P) = 1 - 0,054 = 0,946$;

e = erro amostral, sendo considerado o valor adotado por Figueiredo em 1995, de 1,1%; portanto, $e = 0,011$.

Assim, a partir dessa equação, o tamanho amostral calculado foi de 2.789 coletas de crianças, de acordo com os critérios de inclusão adotados. Esse valor amostral, porém, seria

referente a um inquérito realizado na inteira população de Ribeirão Preto, que tem 604.682 habitantes (IBGE, 2010). A população atendida pelo posto de saúde Dr. Edgard Aché (CSE Ipiranga) é de 14.637 habitantes, segundo Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto; e esse valor representa 2,42% da população de Ribeirão Preto. Assim, para se calcular o tamanho amostral do inquérito realizado, considerou-se 2,42% de 2.789, resultando em um valor mínimo de 68 crianças a serem recrutados. Porém, foi possível coletar um total de 271 soros de crianças, contribuindo para a confiabilidade dos resultados, sendo 174 soros de crianças sem sintomas e 97 soros de crianças com sintomas.

3.1.3 População de estudo

Crianças atendidas no Serviço de Pediatria e Puericultura do CSE-Ipiranga foram incluídas no estudo de acordo com os seguintes critérios: ter idade de 1 a 16 anos; ser residente do Distrito Oeste; autorização do responsável da criança; não ser portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV) nem receber tratamento quimioterápico. As crianças atendidas no Centro de Saúde Escola Dr. Edgard Aché foram recrutadas, por um auxiliar de pesquisa, funcionário do Centro de Saúde Escola o qual explicava aos pais ou responsáveis os objetivos do projeto de pesquisa. Aos interessados era repassado o termo de consentimento livre e esclarecido e após assinatura do mesmo, as crianças eram cadastradas associando-as a um número no estudo. As crianças ainda eram classificadas em assintomáticas quando não apresentavam nenhum sintoma sugestivo de infecção pelo vírus da dengue ou sintomáticas quando apresentavam dor de cabeça, febre, vômito, dor retroorbital, mialgia, artralgia, exantema, manifestação hemorrágicas ou leucopenia, sendo estes sintomas sugestivos da infecção de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde. As crianças foram recrutadas entre março de 2010 a junho de 2011. Este estudo foi auxiliado por 2 técnicos de enfermagem, funcionários do Centro Saúde Escola Dr. Edgard Aché, sendo que um deles auxiliava no recrutamento e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e o outro realizava a coleta. O resultado foi posteriormente impresso e anexado no prontuário das crianças recrutadas no estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de acordo com o processo HCRP nº 8956/2009. O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

3.1.4 Amostras Clínicas

Das crianças recrutadas no estudo foi coletada uma amostra sanguínea sem anticoagulante mediante punção venosa em tubos à vácuo utilizando agulhas descartáveis esterilizadas. As amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo reciclável nas laterais até serem encaminhadas ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, onde o soro foi separado e aliquotado. As alíquotas foram armazenadas a -70°C até serem realizadas a pesquisa de anticorpos.

3.2 Extração do Antígeno Viral pelo Método de Sucrose-Acetona

Camundongos recém-nascidos foram inoculados pela via intra-cerebral com 20uL das diferentes cepas virais (DENV-1, Mochizucki; DENV-2, NGC; e DENV-4, H241). Após os animais apresentarem sinais de encefalite (paralisia dos membros traseiros e dificuldade de locomoção), foram sacrificados e armazenados a -70°C . Posteriormente, os cérebros infectados foram extraídos pesados e acrescentado à solução de sucrose 8,5%, num volume equivalente a quatro vezes o peso do cérebro dos camundongos. Não foi realizado a preparação de antígeno de DENV-3 pois não havia disponível em nosso laboratório uma cepa adaptada a cérebro de camundongo e os vírus disponíveis não causaram encefalite. Em seguida, o homogeneizado resultante foi adicionado lentamente a 20 volumes de acetona fria e repousado por 5 minutos no frio. Após o período de incubação, o sedimento decantou, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado o volume de acetona. A mistura foi agitada vigorosamente e repousada uma hora no frio. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi secado uma hora à temperatura ambiente em uma bomba de vácuo. Após a secagem, o antígeno foi hidratado com uma solução de NaCl a 8,5% em um volume igual a duas vezes, em gramas, o cérebro repousado *overnight* a 4°C . A solução foi então centrifugada a frio e o sobrenadante, que é o antígeno, foi aliquotado e armazenado a -70°C . Este método foi descrito por Clarke e Casals (1958) sendo eficiente se comparado com outros métodos de extração.

3.3 Preparação de Fluidos Imunes Ascíticos de Camundongos (MIAF)

Suspensões de cepas virais (DENV-1, Mochizuki; DENV-2, NGC; DENV-3, H87; e DENV-4, H241) foram misturados separadamente com adjuvante Freund completo (DIFCO LABORATORIES, Michigan USA) na proporção 1:1. Após, 100µl desta mistura homogênea esbranquiçada, foi inoculada em camundongos jovens na região intra-peritoneal semanalmente por 4 semanas consecutivas, sendo que a partir da segunda semana, o adjuvante completo foi trocado pelo incompleto. Na quarta inoculação, além do procedimento acima, inoculou-se também 100µl de sarcoma da linhagem TGO-180 e observou-se o camundongo até apresentar ascite (em média de 8 a 10 dias). A partir de camundongos que apresentaram ascite volumosa foram coletados fluido ascítico em tubos falcon de 15 ou 20 ml. O fluido, que é rico em anticorpos, foi centrifugado a 2000RPM por 10 min e o sobrenadante aliquoteado e armazenado a -20°C.

3.4 Diluente Contendo Soro Humano Normal

Durante a padronização, testou-se dois diluentes das amostras de soro. Para tal, um deles foi preparado adicionando 500 ml de acetona (SYNTH, Brasil) sob agitação à temperatura ambiente a 10 ml de soro humano em um becker. A mistura foi colocada em repouso *overnight* com o becker inclinado para que as proteínas sedimentassem no menor ângulo. O sobrenadante foi decantado e novamente adicionou-se 50 ml de acetona e repetiu-se o processo de repouso *overnight*, decantando o sobrenadante no dia seguinte. O sedimento foi espalhado na parede do beaker em temperatura ambiente até a total evaporação da acetona (o sedimento tomava o aspecto de uma película transparente, revestindo a parede do becker). As proteínas extraídas foram hidratadas com 20 ml de PBS pH 7,4. A mistura foi agitada manualmente com movimentos circulares (lavando a parede do becker) várias vezes, para facilitar a hidratação e repousada em geladeira por 1 h. Após, o sedimento foi decantado, aliquoteado e estocado a -20°C até o momento da diluição em PBS 1x contendo 20% de soro humano normal.

3.5 Ensaio Imunoenzimático - ELISA

Placas de 96 wells, (GREINER BIO-ONE, Alemanha) foram sensibilizadas *overnight* à 4°C com 100µL de anticorpos anti-IgM ou anti-IgG humano (Sigma-Aldrick, EUA) diluídos com tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 na concentração de 1:500. Após incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com a solução de tampão fosfato-salino (PBS) na concentração 1x acrescentado de Tween 20 na concentração 0,05% (PBS 1x/Tween 0,05%). Posteriormente, foi realizado o bloqueio por 2 horas à temperatura ambiente com albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrick, EUA) diluída em PBS 1x até se ter uma concentração de 4%. Esta solução de bloqueio foi colocada em cada wells até o completo preenchimento; e ao término do tempo, a placa foi lavada por 5x com a solução PBS1x/Tween 0,05%. Em seguida, 50µL de cada amostra (controles positivos, controles negativos e os soros a serem analisados) foram adicionados às placas e incubados por 2 horas à 37°C. Duas diluições das amostras de soro (1:40 e 1:80) foram testadas. A diluição foi também testada utilizando como solvente duas soluções: PBS1x contendo BSA na concentração de 0,5% e solução de PBS1x contendo SHN na concentração de 20%. A temperatura de 37°C foi utilizada por ser próxima a temperatura corporal, sendo assim a temperatura ótima de ligação de anticorpos. Novamente foi realizado a lavagem por 5x com a solução PBS1x/Tween 0,05% e após a lavagem, 50 µL do antígeno previamente extraído com o método de sucrose-acetona foi adicionado à placa. Os diferentes sorotipos de DENV foram separadamente testados e também em uma mistura de DENV sem diluição e nas concentrações de 1:10 e 1:20. Uma mistura com os antígenos dos sorotipos de DENV também foram testados nestas mesmas concentrações. Após a placa ser incubada *overnight* à 4°C, foi lavada cinco vezes com a solução PBS1x/Tween 0,05% e novamente incubada à 37°C por 1 hora com 100 µL de líquido imune ascítico de camundongo (MIAF) preparado contra os quatro sorotipos, testando-se duas diferentes diluições (1:100 e 1:500). O ensaio foi também testado com anticorpo monoclonal anti-proteína do envelope na diluição 1:1000. Posteriormente, foram adicionados às placas 25 µL de anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase (SIGMA-ALDRICK, EUA) diluídos em BSA 0,5% até uma diluição de 1:2000. Após, a placa foi lavada cinco vezes com a solução PBS1x/Tween 0,05% e a ela foi adicionado 100 µL do substrato ABTS (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, KPL, Estados Unidos) (Lote 100683 para solução A e 100595 para solução B). Conforme especificações do fabricante, a leitura foi feita em aparelho de leitura automática de

microplaca (TP Reader NM Thermo Plate, Brasil) à 405nm após 30 minutos de incubação a 37°C.

3.6 Definição sorológica de infecção pelo vírus da dengue

O *cutoff* foi considerado como a média da triplicata do soro negativo somado a 3 vezes o desvio padrão (RIDGE; VIZARD, 1993). O ensaio foi considerado satisfatório quando a média da triplicata da absorbância do controle positivo foi superior ao *cutoff*. Quando o valor da média da absorbância das amostras foi menor que o *cutoff*, as amostras foram consideradas negativas; quando foi maior que o *cutoff* em até 0,09, as amostras foram consideradas duvidosas, e quando maior que o *cutoff* somado a 0,09, as amostras foram consideradas positivas.

As infecções sintomáticas ou assintomáticas pelo vírus da dengue foram consideradas do tipo primária quando testadas por ELISA, apresentarem razão IgM/IgG maior ou igual 1,2, e do tipo secundárias com razão IgM/IgG menor que 1,2 (SHU et al., 2003).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Padronização do ELISA de captura para IgG e IgM

O ELISA de captura foi inicialmente padronizado seguindo o protocolo descrito pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) descrito anteriormnete. No primeiro ensaio realizado utilizaram-se 50µL do antígeno (antígeno DENV-1 - lote G-1002540 - e do DENV-2 - lote G-985060) cedido pelo Instituto Evandro Chagas na diluição 1:10 em PBS contendo 20% de SHN. Como demonstrado na Tabela 1, a absorbância da amostra positiva foi maior que o *cutoff* para ambos os antígenos.

Tabela 1. Resultado da padronização inicial do ELISA

Antígeno	IgM				IgG			
	Soro (-)			Soro (+) Média Abs	Soro (-)			Soro (+) Média Abs
	Média da Absorbância	DP	Cutoff*		Média da Absorbância	DP	Cutoff *	
DENV-1 IEC	0,815	0,164	0,98	1,54	1,003	0,114	1,34	1,45
DENV-2 IEC	0,797	0,041	0,84	1,47	0,911	0,155	1,07	1,53

* Média Abs + (3 x Desvio Padrão); (+): positivo; (-): negativo

Após o teste das amostras positiva e negativa pelo ELISA de captura, começou a padronização do ELISA de captura em nosso laboratório, testando a preparação dos antígenos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 preparados em nosso laboratório a partir do cérebro de camundongos infectados. O ELISA de captura para IgG foi novamente realizado utilizando as condições mencionadas anteriormente para avaliar a funcionalidade dos antígenos e a concentração a ser utilizada. O teste foi realizado utilizando uma mistura dos antígenos correspondentes aos três sorotipos e como controle foram utilizados antígenos preparados a partir do cérebro de camundongos não infectados. Os resultados observados na Tabela 2 mostram que a mistura de antígenos não diluído e na diluição 1:10 apresentaram os melhores resultados. A partir deste momento, o antígeno foi utilizado na diluição 1:10 por questões de rendimento.

Tabela 2. Avaliação do ELISA de captura para IgG utilizando os antígenos de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 extraídos do cérebro de camundongo

Antígenos CI			Antígenos CNI		
Concentração	Cutoff*	Soro (+) (Abs)	Concentração	Cutoff*	Soro(+) (Abs)
SD	0,20	0,49	SD	0,17	0,18
1:10	0,16	0,40	1:10	0,16	0,16
1:20	0,14	0,28	1:20	0,15	0,15

CI: Cérebro Infectado; CNI: Cérebro não infectado; SD: sem diluição; Abs: Absorbância; *Média + (3 x Desvio Padrão); (+):positivo

Posteriormente, os antígenos de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 foram também avaliados no ELISA de captura para IgG e IgM, individualmente ou misturados mostrando que estavam funcionais (Tabela 3).

Tabela 3. ELISA de captura testando os antígenos extraídos de DENV-1, DENV-2 e DENV-4

Antígeno	IgM		IgG	
	Cutoff*	Soro(+) (Abs)	Cutoff*	Soro(+) (Abs)
DENV – 1	0,22	0.28	0,19	0.25
DENV – 2	0,31	0.78	0,15	0.34
DENV – 4	0,30	0.38	0,11	0.25
DENV -1 + DENV - 2 + DENV – 4	0,29	0.66	0,12	0.33
CNI	0,30	0.20	0,13	0.11

*Média + (3 x Desvio Padrão); CNI: Cérebro não infectado; (+): positivo

Dois solventes para diluição das amostras de soro dos pacientes também foram testados, PBS contendo 0.5% de albumina bovina (BSA) e PBS contendo 20% de soro humano normal (SHN).

Tabela 4. ELISA de captura comparando o diluente contendo 0,5% de BSA e 20% de SHN

Diluente	IgM		IgG	
	Cutoff*	Soro(+) (Abs)	Cutoff*	Soro(+) (Abs)
BSA 0.5%	0.53	0.64	0.68	0.92
SHN 20%	0.44	0.50	0.45	0.59

BSA: albumina bovina; SHN: Soro humano normal; *Média + (3xDesvio Padrão); (+): positivo

Como mostrado na Tabela 4, o ELISA de captura tanto para IgG quanto para IgM apresentaram resultados satisfatórios utilizando ambos os diluentes para as amostras de soro. Porém, pela maior diferença da média do controle positivo com relação ao cutoff e pela dificuldade da preparação do SHN, o diluente contendo 0,5% de BSA foi o escolhido para realizar os próximos ensaios.

Após selecionar o diluente testaram-se duas diferentes diluições das amostras de soro. A Tabela 5 mostra que ambas as diluições mostraram resultados positivos no ELISA de captura, mas como o protocolo do IEC utiliza diluições das amostras 1:40, escolheu-se esta diluição.

Tabela 5. ELISA de captura para IgG comparando a diluição das amostras

Concentração	Cutoff*	Soropositivo (Abs)
1:40	0.41	0.53
1:80	0.43	0.50

*Média + (3 x Desvio Padrão)

Neste momento passamos a avaliar o anticorpo primário: fluido imune ascítico de camundongo (MIAF) e um anticorpo monoclonal anti-proteína do envelope de DENV (Tabela 6). O ELISA com o MIAF na diluição 1:100 mostrou resultado similar ao observado com o anticorpo monoclonal diluído a 1:1000. Por questões de custo, foi selecionado o MIAF para desenvolver o ELISA.

Tabela 6. ELISA de captura comparando duas diluições de MIAF com anticorpo monoclonal anti-envelope

Ac Primário	IgM		IgG	
	Cutoff	Soro (+) Abs	Cutoff	Soro (+) Abs
MIAF 1:100	0,42	0,83	0,42	0,81
MIAF 1:500	0,42	0,60	0,41	0,46
Ac anti-env 1:1000	0,23	0,53	0,18	0,39

*Média + (3 x Desvio Padrão); Ac anti-env: anticorpo monoclonal anti proteína envelope DENV

Resumidamente, após a padronização observamos que as melhores condições para a realização do ELISA de captura para IgM e IgG foram as seguintes: sensibilização da placa com anticorpos de captura anti-IgM e anti-IgG humano na diluição 1:500 em tampão

carbonato/bicarbonato, bloqueio com 4% de albumina bovina em PBS, amostras de soro diluídas em PBS contendo 0,5% de BSA na proporção 1:40, antígeno viral na diluição 1:10, anticorpo primário (MIAF) diluído 1:100 em PBS contendo 0,5% de BSA, anticorpo secundário conjugados com peroxidase na diluição 1:2000 e 100 µl de substrato.

O *cutoff* foi considerado como a média da triplicata do soro negativo somado a 3 vezes o desvio padrão. O ensaio foi considerado satisfatório quando a média da triplicata da absorbância do controle positivo foi superior ao *cutoff*. Quando o valor da média da absorbância das amostras foi menor que o *cutoff*, as amostras foram consideradas negativas; quando foi maior que o *cutoff* em até 0,09, as amostras foram consideradas duvidosas, e quando maior que o *cutoff* somado a 0,09, as amostras foram consideradas positivas.

4.2 Seleção dos controles positivos e negativos

Amostras de soro previamente testadas no Laboratório de Virologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) utilizando o kit PANBIO para detecção de IgM e IgG foram utilizadas para avaliar o nosso ELISA de captura e para selecionar controles positivos e negativos para os testes posteriores. Os resultados estão demonstrados na Tabela 7. Das amostras negativas para IgM pelo kit PANBIO, 75% (6/8) foram também negativas no ELISA de captura; enquanto que das amostras positivas para IgM, todas (3/3) foram positivas no ELISA de captura. Das amostras negativas para IgG pelo kit PANBIO, 100% (5/5) foram também negativas no ELISA de captura; enquanto que das amostras positivas para IgG, 66,7% (4/6) foram positivas no ELISA de captura.

Tabela 7. Resultado do ELISA de captura utilizando as amostras testadas com o Kit PanBio

Amostras	IgM			IgG		
	Elisa de Captura*			Elisa de Captura**		
	Abs	Resultado	KIT Panbio	Abs	Resultado	KIT Panbio
1-FMRP	0,31	N	N	0,37	N	N
2-FMRP	0,34	D	N	0,39	N	N
3-FMRP	0,33	D	N	0,40	N	N
4-FMRP	0,31	N	N	0,42	N	N
5-FMRP	0,30	N	N	0,43	N	P
6-FMRP	0,30	N	N	0,49	D	P
7-FMRP	0,30	N	N	0,33	N	P
8-FMRP	0,45	P	P	0,48	D	P
9-FMRP	1,10	P	P	1,36	P	P
10-FMRP	0,97	P	P	0,97	P	P
11-FMRP	0,31	N	N	0,42	N	N

*Cutoff Elisa de captura para IgM=0,32; **Cutoff Elisa de captura para IgG=0,47; Abs: Absorbância

Amostras positivas para IgM (n=3: 9-FMRP, 10-FMRP e 11-FMRP) e para IgG (n=2: 9-FMRP, 10-FMRP) e negativas para IgM (n=6: 1-FMRP, 4-FMRP, 5-FMRP, 6-FMRP, 7-FMRP e 12-FMRP) e para IgG (n=5: 1-FMRP, 2-FMRP, 3-FMRP, 4-FMRP e 12-FMRP) tanto com o PANBIO (ELISA de captura para IgM e ELISA indireto para IgG) quanto com o ELISA de captura foram selecionadas para preparação de um *pool* a ser utilizada como controle positivo e outro como controle negativo do ELISA de captura, junto com a amostra sabidamente positiva e negativa utilizadas inicialmente na seleção das condições do ELISA de captura.

4.3 Dados demográficos das crianças

Dados demográficos das 271 crianças incluídas neste estudo no período de março de 2010 a junho de 2011 encontram-se no apêndice A. A distribuição segundo o gênero estão demonstrados na figura 4.

Figura 4. Distribuição segundo o gênero das crianças incluídas no estudo

A proporção de sexo das crianças foram similares.

Figura 5. Distribuição segundo a idade das crianças incluídas no estudo (em anos)

A maioria das crianças (40,2 %) pertenciam à faixa etária de 1 a 5 anos e uma pequena porcentagem das crianças não teve a data de nascimento registrada.

4.4 Análise Sorológica das Amostras de Soro

4.4.1 Prevalência de anticorpos anti-DENV

4.4.1.1 Prevalência de anticorpos IgM anti-DENV nas crianças assintomáticas

As amostras de soro das crianças foram analisadas em duplicata pelo ELISA de captura para IgM e IgG (Tabelas 9 e 10).

Tabela 8: Resultado de ELISA de captura para IgM e IgG das amostras de soro das crianças assintomáticas

Código da Criança	IgM	IgG	Código da Criança	IgM	IgG	Código da Criança	IgM	IgG	Código da Criança	IgM	IgG
1	N	N	64	P	P	122	D	N	195	N	N
3	P	P	69	N	N	123	N	N	196	N	N
4	N	N	70	N	N	124	D	N	197	N	N
5	N	N	72	N	N	125	D	N	198	N	N
6	N	P	77	N	N	126	N	N	199	N	N
7	N	N	78	N	N	127	N	N	200	N	N
8	N	N	80	N	N	128	D	N	201	N	N
9	N	N	82	N	N	129	D	D	202	N	N
10	N	D	83	N	N	130	D	N	203	N	N
11	N	D	84	N	N	131	N	N	204	N	N
12	N	N	86	N	N	132	D	D	205	P	D
13	N	D	87	N	N	133	D	N	206	N	N
16	N	N	88	N	N	134	D	N	211	N	N
17	N	N	89	N	N	135	D	N	212	N	N
18	N	N	90	N	N	136	D	N	213	N	N
19	N	D	92	N	N	137	P	D	214	N	N
20	N	D	93	N	N	138	D	P	215	N	N
21	N	D	94	N	N	139	D	P	216	N	N
22	N	P	95	N	N	140	P	D	217	N	N
23	N	N	96	N	N	141	N	N	220	N	N
25	N	N	97	D	N	142	N	D	221	D	N
26	N	N	98	N	N	143	N	N	222	N	N
27	N	N	37	P	P	144	D	N	226	N	N
28	N	N	99	N	N	145	N	P	227	N	N
29	N	N	100	D	N	146	D	P	228	N	N
30	N	N	101	N	N	147	N	D	230	N	N
32	D	N	102	N	N	148	N	N	231	N	N
33	N	N	103	D	N	149	N	N	233	N	N
34	N	N	104	D	N	150	N	N	234	N	N
35	N	N	105	D	N	151	N	N	235	N	N
36	N	N	106	D	N	152	N	D	236	N	N
38	P	P	107	N	N	156	N	D	237	N	N
40	N	N	108	D	N	161	N	N	245	N	N
41	N	N	109	D	N	162	N	N	253	N	N
42	N	N	110	N	N	163	N	N	254	D	N
43	N	N	111	D	N	167	N	N	264	P	P
44	N	N	112	D	N	175	N	N	269	N	D
47	N	N	113	N	N	185	N	N	270	N	D
48	N	N	114	N	N	186	N	N	271	N	N
55	N	N	116	N	N	187	N	N	278	N	P
56	N	N	118	N	N	188	D	N	279	N	P

57	N	N	119	N	N	193	N	N	280	N	P
58	N	N	120	N	N	194	N	N	281	N	P
63	N	N	121	N	N						

Anticorpos IgG anti-dengue foram detectados em 8,62% (n=15) das crianças assintomáticas, sugerindo que tiveram contato prévio com o DENV. Anticorpos IgM anti-dengue foram detectados em 4,6% (n=8) das crianças sugerindo que tiveram uma infecção recente pelo DENV (Figura 3 e 4). Anticorpos IgM e IgG anti-dengue foram detectados em 2,87% (n=5) das crianças. As três crianças (1,72%) positivas somente para IgM tiveram, provavelmente, uma infecção primária e assintomática por DENV.

Figura 6. Porcentagem de IgM das crianças assintomáticas incluídas no estudo

Figura 7. Porcentagem de IgG das crianças assintomáticas incluídas no estudo

4.4.1.2 Prevalência de anticorpos IgM anti-DENV nas crianças sintomáticas

Tabela 9: Resultado de ELISA de captura para IgM e IgG das amostras de soro das crianças sintomáticas

Código da Criança	IgM	IgG	Código da Criança	IgM	IgG	Código da Criança	IgM	IgG	Código da Criança	IgM	IgG
2	N	N	76	N	N	178	D	N	240	P	N
14	N	D	79	N	N	179	N	N	241	N	N
15	P	P	81	N	N	180	N	N	242	P	N
24	N	N	85	N	N	181	N	N	243	D	N
31	N	N	115	N	N	182	N	N	244	N	N
37	N	N	117	N	N	183	N	N	255	N	N
39	P	P	153	N	N	184	N	N	256	N	N
45	N	N	154	N	N	189	N	N	257	N	N
46	N	N	155	N	N	190	N	N	258	N	N
49	N	N	157	N	N	191	N	N	259	P	N
50	N	N	158	N	N	192	N	N	260	P	N
52	N	N	159	N	N	207	N	N	261	N	N
53	N	N	160	N	N	208	P	N	262	N	N
54	N	N	164	N	N	209	N	N	263	N	N
61	N	N	165	N	N	210	N	N	265	N	N
60	N	N	166	N	N	218	N	N	266	N	P
62	N	N	168	N	N	219	N	N	267	N	N
65	P	P	169	N	N	223	N	N	268	P	P
66	N	N	170	P	N	224	N	N	272	N	N
67	N	N	171	N	N	225	N	N	273	N	D
68	N	N	172	N	N	229	N	N	274	N	N
71	P	P	173	N	N	232	N	N	275	P	P
73	N	N	174	N	N	238	N	N	276	P	P
74	P	N	177	P	P	239	N	N	277	N	P
75	N	N									

Anticorpos IgM anti-dengue foram detectados em 15,46% (n=15) das crianças sintomáticas. Anticorpos IgG anti-dengue foram detectados em 10,31% (n=10) das crianças (Figura 5 e 6). Anticorpos IgM e IgG anti-dengue foram detectados em 8,25% (n=8) das crianças; sete crianças (7,22%) foram positivas somente para IgM e duas crianças (2,06%) positivas somente para IgG.

Figura 8. Porcentagem de IgM das crianças sintomáticas incluídas no estudo

Figura 9. Porcentagem de IgG das crianças sintomáticas incluídas no estudo

Figura 10. Sintomas apresentados pelas crianças incluídas no estudo

As crianças sintomáticas tiveram na grande maioria febre, sendo também a cefaléia e a mialgia sintomas frequentes. Outros sintomas como vômitos, diarreia, dor retrocular, exantema foram observados mas em menor proporção (Figura 10).

Tabela 10. Relação da detecção de IgM e o tempo de início dos sintomas

Dias de início dos sintomas	Nº de crianças	%
1 a 3 dias	3	20,00
4 a 7 dias	11	73,33
Desconhecido	1	6,67
TOTAL	15	

As crianças com 4 a 7 dias do início dos sintomas tiveram uma detecção maior de anticorpos IgM anti-dengue no ELISA de captura do que as crianças de 1 a 3 dias (Tabela 11).

Tabela 11. Determinação do tipo de infecção das crianças positivas baseado na razão IgM/IgG

Código da Criança	Idade	IgM			IgG			Razão 1/2	Tipo de infecção
		Cutoff (X)	Absorbância (Y)	Y-X (1)	Cutoff (X)	Absorbância (Y)	Y-X (2)		
15	11	0.70	0.87	0.17	0.91	1.06	0.15	1.1	S
39	4	0.64	0.90	0.26	0.99	1.12	0.13	2.0	P
65	14	0.91	1.46	0.55	1.15	1.58	0.43	1.3	P
71	4	0.60	0.86	0.26	0.92	1.08	0.16	1.6	P
177	7	0.62	1.22	0.60	0.95	1.81	0.86	0.7	S
268	11	0.53	1.11	0.58	0.71	0.93	0.22	2.6	P
275	8	0.53	0.65	0.12	0.71	0.93	0.22	0.5	S
276	12	0.53	0.76	0.23	0.71	1.16	0.45	0.5	S

P:Primária, S:Secundária

A diferença da absorbância com o *cutoff* de anticorpos IgM anti-dengue dividida pela diferença da absorbância com o *cutoff* da absorbância de anticorpos IgG anti-dengue foi utilizada para calcular a frequência de infecção primária e secundária das crianças (Tabela

12). Razão maior ou igual a 1,2 foi considerada como infecção primária e menor que 1,2 infecção secundária (SHU et al., 2003)

A frequência de infecção primária e secundária por grupos etários está demonstrada na Tabela 13 que incluiu também as sete crianças sintomáticas (código 74, 170, 208, 240, 242, 259, 260) que somente apresentaram anticorpos IgM anti-dengue positivo e possivelmente tiveram infecção primária por DENV.

Tabela 12. Frequência de infecção primária e secundária por grupos etários nas crianças sintomáticas

Intervalo de Idade	Tipo de infecção			%
	P	S	P+S	
1-5 anos	2	-	2	13,33
6-10 anos	4	2	6	40,00
11-15 anos	5	2	7	46,67
TOTAL	11	4		

P:Primária, S:Secundária

Em relação ao número total de infecções, a porcentagem de crianças com infecção primária foi de 73,33% (n=11), sendo maior do que aquelas com infecção secundária 26,67% (n=4). O número de infecções por DENV em crianças com idade mais baixa foi menor do que em crianças mais velhas, mostrando uma curva ascendente.

Figura 11. Porcentagem da infecção das crianças incluídas no estudo em relação à idade

Discussão

5. DISCUSSÃO

A detecção dos anticorpos IgM e IgG anti-dengue tem sido muito utilizada para o diagnóstico da infecção pelo DENV, assim como para investigações soro-epidemiológicas. A similaridade de sintomas com outras doenças tropicais dificulta um diagnóstico clínico consistente e, assim, é de suma importância um diagnóstico laboratorial eficaz. Apesar dos diversos métodos disponíveis, os testes sorológicos são mais comumente utilizados para o diagnóstico de infecção por DENV por serem relativamente baratos e apresentarem sensibilidade e especificidade comparando com os outros métodos sorológicos (VAUGHN et al., 1997; WHO, 1999). Dentre as técnicas sorológicas disponíveis para o diagnóstico de DENV, a inibição de hemaglutinação, o MAC-ELISA, o ELISA para IgG são as mais utilizados (CLARKE; CASALS, 1958; GROEN et al., 2000; INNIS et al., 1989; MAKINO et al., 1994; WHO, 1999). Devido à sua alta sensibilidade, especificidade e simplicidade, o ELISA para IgG e o MAC-ELISA tem se tornado mais rotineiramente utilizados, sendo o último adotado como padrão ouro para diagnóstico sorológico na maioria dos países das Américas, além de ser utilizado como parâmetro de diagnóstico em infecções recentes causadas pelos quatro sorotipos de DENV que circulam no mundo (CLARKE; CASALS, 1958; SHU et al., 2003; NUNES et al., 2011).

Após o início dos sintomas, anticorpos IgM anti-DENV são detectados, em média, a partir do terceiro até o quinto dia, podendo persistir de 3 a 5 meses. Anticorpo IgG anti-DENV torna-se elevado de 1 a 14 dias após o início dos sintomas, dependendo se o paciente tem infecção primária ou secundária. Devido a estas características, tanto o IgM quanto o IgG são biomarcadores úteis para o diagnóstico de infecção por DENV (LIMA et al., 2010) (WHO, 1999).

Neste trabalho padronizamos um ELISA de captura para anticorpos IgM e IgG anti-dengue, para realização de uma investigação sorológica em crianças. Este método foi padronizado utilizando como antígeno DENV obtido de cérebro de camundongos infectados e anticorpos primários obtidos de líquido imune ascítico de camundongos infectados. O método de sucrose-acetona utilizado neste trabalho para preparação do antígeno é eficiente, principalmente quando comparado com outros métodos de extração, como acetona-éter e suspensão alcalina aquosa (CLARKE; CASALS, 1958). A razão para não ser amplamente utilizada é que a manipulação de grandes volumes de acetona são necessários e torna o

procedimento um pouco inconveniente. Este método de extração ainda continua sendo utilizado em padronizações, aperfeiçoamentos de ELISAs e no diagnóstico de infecções por arbovírus no Instituto Evandro Chagas, Ministério da Saúde (NUNES et al., 2011).

O líquido imune ascítico (anticorpos policlonais) produzido em camundongos para desenvolvimento do ensaio sorológico é mais barato do que anticorpos monoclonais comerciais desenvolvidos para DENV. Mistura de líquidos imunes ascíticos produzidos com os diferentes sorotipos de DENV são utilizados para aumentar a sensibilidade e especificidade de testes de diagnóstico de DENV (DIGOUTTE et al., 1992; GAMBLE et al., 1985).

Infecções por DENV tem sido cada vez mais frequente entre as doenças febris agudas na infância e sua apresentação clínica é muito semelhante àquela de outras doenças em crianças. Entre os indivíduos mais propensos a apresentar dengue graves estão aqueles pertencentes à faixa etária pediátrica (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). No Sudeste Asiático, uma região hiperendêmica da doença, há a circulação simultânea de todos os sorotipos do DENV, e assim, há uma maior possibilidade de reinfecção pelo DENV. Esta reinfecção por DENV está associada a quadros graves da doença e grande número de hospitalizações, principalmente, em crianças (GRAHAM et al., 1999). A transmissão da dengue nas Américas era tida como menos intensa do que no Sudeste Asiático, porém, ao realizar um estudo em crianças escolares em Managuá, Nicarágua, Balmaseda e colaboradores (2004) observaram uma prevalência de anticorpos IgG anti-dengue de até 90% nesta população. Diversas hipóteses tem sido propostas para explicar estas diferenças. Foi observado que crianças da América Central, Venezuela, e Colômbia podem não desenvolver permeabilidade tão facilmente quanto crianças do sudeste asiático após infecção secundária de dengue (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011). Também é sugerido que pode-se ter uma alta prevalência de genes de resistência entre populações negras do Brasil e do Caribe (BALMASEDA et al., 2006). Uma explicação adicional para o baixo número de DHF em países das Américas pode ser menos reportado do que casos que ocorrem, devido a dificuldades técnicas ou uma capacidade limitada para realizar diagnóstico de acordo com os critérios de definição de casos da OMS. Nenhuma destas explicações são totalmente satisfatórias em explicar as diferenças entre as duas regiões (KOURI et al., 1989; HALSTEAD et al., 2001; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011).

No Brasil, onde ocorrem mais de 60% dos casos de FD das Américas (OPAS, 2007), o atual comportamento endêmico apresentado pela doença tem sido acompanhado pelo aumento

de número de casos graves em crianças, o que nos leva a perguntar se a doença em nosso país está assumindo um padrão à semelhança do que ocorre no Sudeste Asiático (HALSTEAD, 2006). Entre os anos de 1998 a 2006, a porcentagem de casos em crianças variou de 9,5% (em 1998) a 22,6% (em 2001). A idade média das pessoas com dengue hemorrágica diminuiu de 38 anos em 2001 para 18 anos em 2008. Crianças menores de 10 anos de idade, que em 2001 representaram 5% de todos os casos, foram responsáveis por 33% dos casos em 2008. A taxa de hospitalização por dengue entre crianças no Ceará seguiu um padrão semelhante ao de dengue hemorrágica e houve um aumento para as crianças menores que 10 anos de idade. A diferença imunológica entre os adultos pode ter causado a maior incidência de dengue entre as crianças no Ceará durante 2007-2008, particularmente tendo em vista a gravidade das 2 epidemias, aumento do risco para a dengue hemorrágica e o número de hospitalizações por dengue durante este período (TEIXEIRA et al., 2008). Enquanto até 2006 a maioria dos casos de DHF no Brasil ocorriam entre adultos de 20 a 40 anos, em 2007 o número anual de casos de DHF mais do que dobrou e uma diferença na distribuição da faixa etária foi relatada (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2008). Em 2007, 53% de casos ocorreram em crianças menores que 15 anos. A mudança foi maior na região nordeste, onde 65% do número total de casos de DHF aconteceram em crianças, enquanto outras regiões como a Centro-oeste e o Norte não experimentou uma significativa mudança e a maioria dos casos DHF continuou a ocorrer entre adultos (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2008).

Antes da primeira epidemia ocorrida em Ribeirão Preto, Figueiredo et al. (1992) demonstraram através de um inquérito sorológico efetuado entre 1983 e 1984 que flavivírus estavam circulando na região de Ribeirão Preto, quando detectaram uma prevalência de anticorpos anti-flavivírus de 2,0% na população menor que 20 anos. Naquela época, o DENV-1 foi detectado pela primeira vez neste município em 1990, caracterizando a primeira grande epidemia no município com 8.900 casos confirmados. Posteriormente, no ano 1998 foi introduzido o DENV-2 que juntamente com a circulação do DENV-1 elevaram o número de casos notificados em 1999. Em 2001 houve a segunda grande epidemia no município com 3.190 casos confirmados (Dados da Secretaria Municipal de Saúde). No ano 2002 foi isolado o DENV-3, mas em 2003 o número de casos confirmados foram mais elevados que em 2002. Atualmente os três sorotipos de DENV co-circulam no município e tem causado frequentes epidemias desde 2006, quando ocorreram 5.997 casos de infecção por DENV, caracterizando a terceira grande epidemia na cidade (Dados da Secretaria Municipal de Saúde). Dados da

Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto mostram que o número de casos em crianças tem aumentado consideravelmente desde o ano de 2000, quando foi observado uma incidência de 20,96 casos confirmados/100.000 crianças e após 10 anos chegou a 4.766,7 casos/100.000 crianças de até 14 anos (Dados da Secretaria Municipal de Saúde). Este aumento de casos em crianças, sugere que este município pode estar assumindo padrões semelhantes ao sudeste asiático onde o maior número de infecções por DENV acontece em crianças. Nosso estudo, realizado através de um inquérito soropidemiológico, mostrou uma prevalência de anticorpos IgG anti-dengue de 8,62% - 9,23% em crianças de 1 a 15 anos. Em um estudo realizado por Figueiredo e colaboradores em 1992 no município de Ribeirão Preto, foi observado uma prevalência de 5,4% de positividade para anticorpos IgG anti-DENV na população de 5 a 15 anos, mas especificamente no Distrito Oeste, a prevalência média foi de 9,3%, variando de 0% a 22% em diferentes pontos neste distrito. Nosso estudo obteve um valor de prevalência, após várias epidemias relatadas na cidade de Ribeirão Preto, similar ao estudo realizado por Figueiredo e colaboradores após primeira epidemia relatada na cidade, no entanto, esperávamos que esta prevalência fosse maior que aquela observada em 1992. Devido ao número de infecções por DENV variar entre regiões, prevalências são difíceis de serem comparadas. Assim, presume-se que esta prevalência observada em nosso estudo seja similar aquela observada em 1992, mas sabe-se que naquele estudo diversas regiões no distrito oeste tiveram prevalência analisada, obtendo uma variação de prevalência entre 0% e 22%, e não se conhece qual região o Posto de Saúde Dr. Edgard Aché está situado. Também, não se conhece qual a variação ocorrida no período entre os dois estudos, podendo a prevalência entre as crianças ter tido uma alta oscilação ou ter diminuído ao longo destes 11 anos e somente por agora estar em ascensão.

Partindo-se de uma prevalência similar dos dois estudos e se o número dos casos confirmados em crianças neste município aumentou consideravelmente de 2000 a 2010, pode-se sugerir que o número de casos sintomáticos aumentaram ao longo deste período. Este dado pode estar relacionado com o aumento de infecções secundárias que em nosso estudo foi de 26,7% entre as crianças com infecção recente de dengue ou por outro lado, ao aparecimento de cepas mais virulentas nestes últimos anos.

Embora a prevalência da infecção pelo vírus da dengue parece ter se mantido a mesma desde 1992, este valor é considerado muito alto em relação a inquéritos sorológicos realizados em outras cidades do Brasil, como um inquérito realizado na cidade de Belo Horizonte entre 2006 e 2007 que não detectou nenhuma criança de até 10 anos soropositiva para anticorpos

anti-dengue (PESSANHA et al., 2010) e em Campinas no estudo realizado em 1998 com o resultado de prevalência de anticorpos anti-DENV de 0,03% em crianças de 0 a 14 anos (LIMA et al., 2007). Outros inquéritos sorológicos realizados no Brasil foram relatados, mas todos encontraram valores de prevalência de infecção por DENV na população total, não apresentando valores por faixa etária (FIGUEIREDO; SIMÕES; CAVALCANTE, 1989; VASCONCELOS et al., 1993; VASCONCELOS et al., 1999).

Admitindo uma prevalência de 9,23% e que o Distrito Oeste possui uma população de 30.694 habitantes de até 14 anos, o possível número de casos no Distrito Oeste observado em nosso estudo foi de 2.833 casos ao longo dos anos do estudo (2009-2011). Porém, segundo a Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto, o número de casos confirmados neste município neste mesmo período foram de 9.127 casos em crianças de até 14 anos e em média o distrito oeste apresentou uma porcentagem de 22,97% dos casos confirmados em Ribeirão Preto, e então, presume-se 2.096 casos em crianças de até 14 anos no distrito. Este número é similar ao encontrado pela prevalência em nosso estudo. Esta diferença poderia ser maior já que sabe-se que a quantidade de casos confirmados é bem inferior ao verdadeiro valor que acomete a população e a confirmação laboratorial é de suma importância já que a dengue possui características clínicas muito parecidas com outras doenças febris em crianças. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO 1999) e a Organização Pan Americana de Saúde (PAHO 1994), o número de casos notificados corresponde a 10% do total de infecções causadas pelo vírus do dengue. Ou seja, para cada caso notificado devem ocorrer pelo menos nove outros que não foram notificados ou apresentaram infecção assintomática ou oligosintomática do dengue (VASCONCELOS et al., 2000). Ainda, durante a epidemia de 2010, 78,4% dos casos foram confirmados apenas clinicamente, sendo que nos outros anos mais de 60% dos casos foram confirmados laboratorialmente. Esta alta porcentagem de confirmação clínica pode incluir falsos positivos, superestimando o número de casos, chegando a um valor próximo ao obtido em nosso estudo.

A prevalência de infecções assintomáticas observada em nosso estudo foi de 1,72% e baseando no número de habitantes do Distrito Oeste na faixa etária estudada, estimou-se que esta região apresentou 528 casos. Este número, apesar de pequeno em relação a população do Distrito Oeste possui importância epidemiológica pois esses indivíduos tornam-se virêmicos e servem de fonte de infecção para o *Aedes aegypti*, ajudando na dispersão do vírus e, como estes indivíduos não apresentam sinais e sintomas da infecção, não procuram atendimento médico e não são notificados. Além disto, esses indivíduos podem levar o vírus para áreas

infestadas pelo vetor, mas sem circulação do vírus, servindo de fonte “silenciosa” de entrada e dispersão do dengue (VASCONCELOS et al., 1993).

A análise sorológica das crianças sintomáticas mostrou uma prevalência de 15,46% para anticorpos IgM anti-dengue. Uma limitação para o diagnóstico de infecção de DENV por ELISA de captura deve-se ao fato de anticorpos IgM serem detectados em média de 3-5 dias após o início dos sintomas (WHO 2009). Isto corrobora com os resultados obtidos em nosso estudo que demonstrou que 73,33% dos resultados positivos correspondiam a amostras coletadas de crianças que apresentavam início dos sintomas de 4 a 7 dias. Assim, antes desta fase, conhecida como fase aguda, o diagnóstico mais recomendado é a detecção de um antígeno e do genoma viral (WHO 2009).

No grupo de crianças que apresentaram infecções recentes pelo DENV foi possível observar uma porcentagem ascendente do número de casos em relação aos intervalos de idade, demonstrando que crianças com idade mais avançada foram mais acometidas do que crianças mais jovens. Além disto, o número de casos de infecções primárias foi maior do que o número de casos de infecções secundárias. Este fato não é o mesmo do observado em regiões hiperendêmicas, como o sudeste asiático, onde crianças apresentam maiores índices de infecção secundária do que infecção primária (HALSTEAD, 1970, 2006). Nosso estudo ainda demonstrou uma prevalência de 5,5% de positividade de anticorpos IgG anti-dengue entre a faixa etária de 1-4 anos, não relatada em nenhum inquérito epidemiológico até então, mostrando que crianças mais jovens estão sendo acometidas pela infecção por DENV.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

1. O ELISA de captura para IgM e IgG foi padronizado, sendo utilizado para determinar a prevalência de anticorpos IgM e IgG anti-dengue das crianças incluídas no estudo.
2. A prevalência de anticorpos IgG anti dengue entre as crianças atendidas no Serviço de Pediatria e Puericultura do Centro de Saúde Escola Doutor Edgard Aché, bairro Ipiranga, Ribeirão Preto, São Paulo foi de 9,23%.
3. A prevalência de anticorpos IgG anti-dengue em crianças na faixa etária de 1 a 4 anos foi de 5,5%.
4. Infecções assintomáticas (apenas IgM positivo) foram observadas em 1,72% das crianças estudadas.
5. Anticorpos IgM anti-dengue foram detectadas em 73,33% das crianças sintomáticas, 4 a 7 dias após o início dos sintomas.
6. A infecção foi mais frequente em crianças com idade mais avançada.

Apêndice

Apêndice A:

Dados demográficos das crianças

Dados demográficos das 271 crianças incluídas neste estudo no período de março de 2010 a junho de 2011 encontram-se na Tabela 8.

Tabela 13: Dados demográficos das crianças incluídas no estudo

Código da Criança	Data da Coleta	Idade (anos)	Sexo	Código da Criança	Data da Coleta	Idade (anos)	Sexo
1	26/03/2010	2	M	139	3/1/2011	15	F
2	26/03/2010	5	F	140	5/1/2011	1	M
3	26/03/2010	1	F	141	12/1/2011	15	F
4	26/03/2010	3	M	142	12/1/2011	4	F
5	26/03/2010	3	F	143	17/01/2011	1	M
6	21/05/2010	10	F	144	31/01/2011	1	M
7	29/03/2010	4	M	145	3/2/2011	13	F
8	13/05/2010	3	F	146	3/2/2011	2	F
9	29/03/2010	4	M	147	2/2/2011	11	F
10	29/03/2010	8	M	148	2/2/2011	4	M
11	29/03/2010	6	M	149	2/2/2011	10	M
12	29/03/2010	1	M	150	2/2/2011	14	M
13	4/7/2010	9	F	151	2/2/2011	?	M
14	30/3/2010	11	F	152	2/2/2011	?	M
15	30/03/2010	11	F	153	3/2/2011	11	F
16	4/7/2010	4	F	154	3/2/2011	14	F
17	29/03/2010	7	F	155	4/2/2011	8	M
18	4/6/2010	1	M	156	7/2/2011	1	M
19	4/7/2010	4	M	157	8/2/2011	9	F
20	4/7/2010	4	M	158	8/2/2011	8	M
21	4/7/2010	1	F	159	8/2/2011	12	F
22	4/7/2010	4	F	160	8/2/2011	5	F
23	8/4/2010	8	M	161	8/2/2011	1	F
24	8/4/2010	7	F	162	8/2/2011	7	M
25	8/4/2010	1	M	163	8/2/2011	8	M
26	12/4/2010	5	F	164	9/2/2011	6	F
27	14/04/2010	11	F	165	9/2/2011	5	F
28	15/04/2010	1	M	166	11/2/2011	11	F
29	15/04/2010	3	F	167	11/2/2011	15	M
30	15/04/2010	10	F	168	11/2/2011	14	F
31	15/04/2010	13	F	169	15/02/2011	5	F
32	16/04/2010	2	M	170	16/02/2011	10	F
33	22/04/2010	9	F	171	17/02/2011	3	F
34	22/04/2010	4	M	172	17/02/2011	10	M

35	22/04/2010	7	M	173	17/02/2011	10	M
36	22/04/2010	4	M	174	22/02/2011	13	F
37	22/04/2010	10	M	175	23/02/2011	13	F
38	25/04/2010	12	M	177	25/02/2011	7	F
39	25/04/2010	15	F	178	23/02/2011	8	F
40	25/04/2010	13	M	179	26/02/2011	14	M
41	25/04/2010	10	F	180	26/02/2011	8	F
42	25/04/2010	6	M	181	26/02/2011	5	M
43	25/04/2010	8	M	182	26/02/2011	11	M
44	15/04/2010	4	M	183	26/02/2011	8	M
45	30/04/2010	10	M	184	26/02/2011	3	M
46	29/04/2010	12	M	185	28/02/2011	13	F
47	6/5/2010	?	M	186	28/02/2011	4	M
48	28/04/2010	7	M	187	26/02/2011	3	F
49	29/04/2010	12	F	188	26/02/2011	10	F
50	28/04/2010	11	F	189	1/3/2011	5	F
52	27/04/2010	12	M	190	1/3/2011	10	M
53	27/04/2010	15	M	191	1/3/2011	2	F
54	29/04/2010	5	M	192	1/3/2011	10	F
55	28/04/2010	1	M	193	1/3/2011	11	F
56	29/04/2010	?	M	194	1/3/2011	9	F
57	28/04/2010	2	F	195	2/3/2011	5	F
58	6/5/2010	5	M	196	2/3/2011	6	F
60	7/5/2010	9	M	197	10/3/2011	6	F
61	5/6/2010	13	F	198	10/3/2011	10	M
62	5/10/2010	3	M	199	10/3/2011	13	F
63	5/10/2010	9	M	200	10/3/2011	8	F
64	5/10/2010	6	M	201	11/3/2011	13	F
65	10/5/2010	14	M	202	17/03/2011	9	F
66	10/5/2010	5	M	203	17/03/2011	4	M
67	12/5/2010	15	M	204	17/03/11	1	M
68	14/05/2010	11	M	205	17/03/11	12	M
69	17/05/2010	6	F	206	16/03/11	8	F
70	17/05/2010	6	M	207	17/03/11	14	F
71	18/05/2010	4	F	208	17/03/11	6	F
72	19/05/2010	4	M	209	17/03/11	11	M
73	18/05/2010	14	F	210	17/03/11	7	F
74	18/05/2010	11	F	211	21/03/11	3	F
75	24/05/2010	10	M	212	21/03/11	11	M
76	24/05/2010	13	F	213	21/03/11	14	M
77	31/05/2010	4	F	214	21/03/11	14	M
78	31/05/2010	2	F	215	21/03/11	4	F
79	9/6/2010	15	F	216	21/03/11	1	F
80	10/6/2010	2	M	217	21/03/11	1	M
81	10/6/2010	8	F	218	21/03/11	4	M
82	9/6/2010	5	M	219	21/03/11	7	M

83	12/6/2010	7	M	220	24/03/11	9	F
84	7/7/2010	13	F	221	24/03/11	2	F
85	14/07/2010	15	F	222	24/03/11	15	M
86	4/8/2010	7	F	223	25/03/11	9	F
87	16/08/2010	3	F	224	25/03/11	12	F
88	16/08/2010	10	M	225	25/03/11	9	F
89	16/08/2010	12	F	226	23/03/11	4	M
90	12/7/2010	4	F	227	23/03/11	4	M
92	29/07/2010	5	M	228	23/03/11	7	M
93	29/07/2010	2	M	229	28/03/11	11	F
94	29/07/2010	7	F	230	28/03/11	8	F
95	29/07/2010	7	F	231	29/03/11	4	M
96	29/07/2010	5	F	232	28/03/11	11	F
97	29/07/2010	6	F	233	4/4/2011	11	M
98	4/8/2010	?	M	234	4/4/2011	1	M
91	2/6/2010	4	M	235	30/03/11	9	M
99	18/08/2010	13	F	236	4/4/2011	3	F
100	18/08/2010	2	M	237	4/4/2011	1	F
101	23/08/2010	4	M	238	4/4/2011	9	M
102	23/08/2010	9	M	239	4/4/2011	14	F
103	25/08/2010	5	F	240	4/4/2011	7	F
104	30/08/2010	10	F	241	7/4/2011	4	F
105	30/08/2010	10	M	242	11/4/2011	13	M
106	1/9/2010	2	M	243	11/4/2011	11	F
107	1/9/2010	13	M	244	18/03/11	4	F
108	8/9/2010	4	M	245	18/03/11	?	F
109	13/09/2010	7	F	253	14/04/2011	?	M
110	15/09/2010	11	M	254	14/04/2011	?	F
111	20/09/2010	3	M	255	12/4/2011	13	F
112	20/09/2010	1	M	256	12/4/2011	15	F
113	20/09/2010	5	F	257	13/04/2011	5	M
114	20/09/2010	1	M	258	15/04/2011	13	F
115	10/9/2010	3	M	259	18/04/2011	10	M
116	27/09/2010	4	M	260	18/04/2011	12	M
117	22/09/2010	12	M	261	18/04/2011	14	M
118	29/09/2010	2	F	262	19/04/2011	11	M
119	29/09/2010	3	M	263	19/04/2011	9	M
120	6/10/2010	13	F	264	14/04/2011	?	F
121	6/10/2010	7	F	265	25/04/2011	14	M
122	13/10/2010	1	F	266	26/04/2011	11	F
123	13/10/2010	9	F	267	18/05/2011	5	M
124	27/10/2010	4	F	268	20/05/2011	11	M
125	3/11/2010	6	F	269	23/05/2011	1	M
126	6/10/2010	1	F	270	23/05/2011	2	M
127	27/10/2010	7	F	271	23/05/2011	1	M
128	27/10/2010	?	F	272	23/05/2011	11	M

129	24/11/2010	3	F	273	25/5/2011	11	M
130	24/11/2010	5	F	274	26/05/2011	5	F
131	24/11/2010	10	M	275	27/05/2011	8	F
132	24/11/2010	5	M	276	27/05/2011	12	F
133	29/11/2010	1	M	277	1/6/2011	5	F
134	29/11/2010	1	M	278	30/05/2011	5	M
135	13/12/2010	6	M	279	30/05/2011	?	M
136	29/11/2010	2	F	280	30/05/2011	?	F
137	29/11/2010	6	M	281	9/6/2011	6	F
138	3/1/2011	2	F				

M: masculino; F:feminino; *Média + (3 x Desvio Padrão);

Referências

REFERÊNCIAS

- 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. 376-381, Feb. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825945>>. Acesso em: 18 jan. 2012.
- ALMEIDA, M. C. et al. Intra-urban dynamics of dengue epidemics in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1996-2002. **Cad Saude Publica**, v. 24, n. 10, p. 2385-2395, Oct. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949240>>. Acesso em: 18 jan. 2012.
- ARYA, S. C.; AGARWAL, N. Seroprevalence of dengue virus antibodies in healthy Jamaicans. **Hum Antibodies**, v. 19, n. 1, p. 27; author reply 29-30, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20555128>>. Acesso em: 18 jan. 2012.
- BALEOTTI, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. Brazilian Flavivirus phylogeny based on NS5. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 379-382, Apr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886419>>. Acesso em: 18 jan. 2012.
- BALMASEDA, A. et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 3, p. 449-456, Mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525106>>. Acesso em: 18 jan. 2012.
- _____. Trends in patterns of dengue transmission over 4 years in a pediatric cohort study in Nicaragua. **J Infect Dis**, v. 201, n. 1, p. 5-14, Jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929380>>. Acesso em: 18 jan. 2012.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue : diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.
- CASALI, C. G. et al. The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 4, p. 296-299, July/Aug. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15334261>>. Acesso em: 18 jan. 2012.
- CHAU, T. N. et al. Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. **J Infect Dis**, v. 198, n. 4, p. 516-524, Aug. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598189>>. Acesso em: 18 jan. 2012.
- CLARKE, D. H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **Am J Trop Med Hyg**, v. 7, n. 5, p. 561-573, Sep.

1958. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13571577>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, Dec. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928749>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. 853-859, Jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613313>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

DA CUNHA, R. V. et al. Secondary dengue infection in schoolchildren in a dengue endemic area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 37, n. 6, p. 517-21, 1995 Nov-Dec 1995. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8731265>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Braz J Infect Dis**, v. 8, n. 6, p. 390-398, Dec. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15880229>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

DIGOUTTE, J. P. et al. Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. **Res Virol**, v. 143, n. 6, p. 417-422, Nov./Dec. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1297177>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

DUARTE, H. H.; FRANÇA, E. B. Data quality of dengue epidemiological surveillance in Belo Horizonte, Southeastern Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 40, n. 1, p. 134-142, Feb. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410994>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

ERLANGER, T. E.; KEISER, J.; UTZINGER, J. Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis. **Med Vet Entomol**, v. 22, n. 3, p. 203-221, Sep. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18816269>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

ESLER, D. Dengue - Clinical and public health ramifications. **Aust Fam Physician**, v. 38, n. 11, p. 876-879, Nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893833>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

FAGBAMI, A. H.; MONATH, T. P.; FABIYI, A. Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 71, n. 1, p. 60-65, 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/404737>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

FIGUEIREDO, L. T. et al. Laboratory diagnosis and symptoms of dengue, during an outbreak in the Ribeirão Preto region, SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 34, n. 2, p. 121-130, Mar./Apr. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1340025>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

FIGUEIREDO, L. T.; BATISTA, W. C.; IGARASHI, A. A simple reverse transcription-polymerase chain reaction for dengue type 2 virus identification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**,

v. 92, n. 3, p. 395-398, May/June 1997a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9332607>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

FIGUEIREDO, L. T.; BATISTA, W. C.; IGARASHI, A. Detection and identification of dengue virus isolates from Brazil by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 39, n. 2, p. 79-83, Mar./Apr. 1997b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9394519>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

FIGUEIREDO, L. T.; SIMÕES, M. C.; CAVALCANTE, S. M. Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using infected mosquito cells as antigen. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 83, n. 5, p. 702-707, Sep./Oct. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2575811>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GAMBLE, W. C. et al. Effect of adjuvant vaccines on dengue virus type 2 immune ascitic fluid production. **J Clin Microbiol**, v. 21, n. 3, p. 452-453, Mar. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3980697>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GIBBONS, R. V. Dengue conundrums. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, p. S36-S39, Nov. 2010. Supplement 1. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696556>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GIBBONS, R. V. et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 5, p. 910-903, Nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984352>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GRAHAM, R. R. et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 3, p. 412-419, Sep. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497982>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GROEN, J. et al. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 7, n. 6, p. 867-871, Nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063489>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUBLER, D. J. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. **Ann Acad Med Singapore**, v. 27, n. 2, p. 227-234, Mar. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9663316>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. 55-57, Apr./June 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8903160>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUIRAKHOO, F. et al. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. **J Virol**, v. 74, n. 12, p. 5477-5485, June

2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823852>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUY, B.; ALMOND, J.; LANG, J. Dengue vaccine prospects: a step forward. **Lancet**, v. 377, n. 9763, p. 381-382, Jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277439>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUZMÁN, M. G. et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Bull Pan Am Health Organ**, v. 21, n. 3, p. 270-279, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3442718>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue haemorrhagic fever in Cuba. I. Serological confirmation of clinical diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 78, n. 2, p. 235-238, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6464113>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12, p. S7-S16, Dec. 2010. Supplement 1. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079655>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G.; BRAVO, J. et al. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **Int J Infect Dis**, v. 6, n. 2, p. 118-124, June 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121599>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G.; VALDÉS, L. et al. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. **Rev Panam Salud Publica**, v. 11, n. 4, p. 223-227, Apr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049030>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis**, v. 8, n. 2, p. 69-80, Mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732325>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HALSTEAD, S. B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Rev Panam Salud Publica**, v. 20, n. 6, p. 407-415, Dec. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341332>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. **Annu Rev Entomol**, v. 53, p. 273-291, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17803458>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HALSTEAD, S. B. et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 12, p. 1474-1479, Dec. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498666>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HALSTEAD, S. B. et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 3, p. 180-183, Sep. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11561700>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale J Biol Med**, v. 42, n. 5, p. 350-362, Apr. 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5419208>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. 1063-1070, Dec. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354813>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HARRIS, E. et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. **Am J Trop Med Hyg**, v. 63, n. 1-2, p. 5-11, July/Aug. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357995>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HAYES, C. G. et al. The epidemiology of dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the Amazon region of Peru. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 4, p. 459-63, Oct 1996. ISSN 0002-9637. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8916809>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HINO, P. et al. Temporal evolution of dengue fever in Ribeirão Preto, São Paulo State, 1994-2003. **Cien Saude Colet**, v. 15, n. 1, p. 233-238, Jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169249>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

HO, L. J. et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **J Immunol**, v. 166, n. 3, p. 1499-1506, Feb. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160189>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

IBGE, Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem Populacional, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>> Acesso em: 18 jan. 2012.

INNIS, B. L. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **Am J Trop Med Hyg**, v. 40, n. 4, p. 418-427, Apr. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2540664>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

KALAYANAROOJ, S. et al. Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. **J Infect Dis**, v. 195, n. 7, p. 1014-1017, Apr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17330792>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15692621>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

KITTIGUL, L. et al. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. **J Clin Virol**, v. 39, n. 2, p. 76-81, June 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507286>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

KOURI, G. P. et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bull World Health Organ**, v. 67, n. 4, p. 375-380, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2805215>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

LA RUSSA, V. F.; INNIS, B. L. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. **Baillieres Clin Haematol**, v. 8, n. 1, p. 249-270, Mar. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7663049>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

LAM, S. K. et al. Call for a World Dengue Day. **Lancet**, Dec. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189046>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20520794>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. 545-551, Mar. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372617>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **J Gen Virol**, v. 78, (Pt 9), p. 2279-2284, Sep. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292015>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

LEE, M. S. et al. Clinical characteristics of dengue and dengue hemorrhagic fever in a medical center of southern Taiwan during the 2002 epidemic. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 39, n. 2, p. 121-129, Apr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16604244>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

LIMA, M. A. R. et al. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, p. e738, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20625558>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

LIMA, V. L. et al. Dengue: sero-epidemiological survey and virological surveillance in Campinas, São Paulo, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 23, n. 3, p. 669-680, Mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334580>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res**, v. 59, p. 23-61, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696326>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

MAKINO, Y. et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. **Microbiol Immunol**, v. 38, n. 12, p. 951-955, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7723688>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 35, n. 2, p. 149-154, 1993, Mar./Apr. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284599>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 1, p. 13-22, Jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608696>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 587-619, Apr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219187>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, Oct. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685256>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

NOGUEIRA, R. M. et al. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. **Res Virol**, v. 143, n. 6, p. 423-427, 1992, Nov./Dec. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1297178>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

NUNES, M. R. et al. Evaluation of an immunoglobulin M-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for rapid diagnosis of dengue infection. **J Virol Methods**, v. 171, n. 1, p. 13-20, Jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946918>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

OISHI, K. et al. Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. **J Med Virol**, v. 71, n. 2, p. 259-264, Oct. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12938201>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

OSANAI, C. H. et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, Jan./Feb. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6879054>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

PESSANHA, J. E. et al. Dengue fever in three sanitary districts in the city of Belo Horizonte, Brazil: a population-based seroepidemiological survey, 2006 to 2007. **Rev Panam Salud Publica**, v. 27, n. 4, p. 252-258, Apr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512227>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

PUTTIKHUNT, C. et al. The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus. **J Clin Virol**, v. 50, n. 4, p. 314-319, Apr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277249>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

RIBEIRÃO PRETO, Plano de Contingência para Epidemias de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), Departamento de Vigilância em Saúde e Planejamento, Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, 2005

RIDGE, S. E.; VIZARD, A. L. Determination of the optimal cutoff value for a serological assay: an example using the Johne's Absorbed EIA. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 5, p. 1256-1261, May 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8501227>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue: a literature review and case study of travelers from the United States, 1986-1994. **J Travel Med**, v. 4, n. 2, p. 65-71, June 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815484>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

RODRIGUES, E. M. et al. Epidemiology of dengue infection in Ribeirão Preto, SP, Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 36, n. 2, p. 160-165, Apr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045796>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e935, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245922>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SABIN, A. B. The dengue group of viruses and its family relationships. **Bacteriol Rev**, v. 14, n. 3, p. 225-32, Sep 1950. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14772197>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SAITO, M. et al. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. **Clin Exp Immunol**, v. 138, n. 2, p. 299-303, Nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15498040>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SAKUNTABHAI, A. et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nat Genet**, v. 37, n. 5, p. 507-513, May 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838506>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SALUZZO, J. F. et al. Dengue 2 in eastern Senegal: serologic survey in simian and human populations. 1974-85. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 79, n. 3, p. 313-322, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3769119>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SAN MARTÍN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. **Am J Trop Med Hyg**, v. 82, n. 1, p. 128-135, Jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20065008>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. 1426-1433, Aug. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551599>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. 622-630, July. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853395>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 4, p. 642-650, July 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242935>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SILVA, A. M. et al. Serologic evidence for an epizootic dengue virus infecting toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, n. 2, p. 300-306, Feb. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072155>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SILVA, J. B. et al. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. **Epidemiol Bull**, v. 23, n. 1, p. 3-6, Mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12197500>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

STEPHENS, H. A. et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 4, p. 309-318, Oct. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12472660>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

SVS, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, boletim; Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue; Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011, 2011

TEIXEIRA, M. A. G. et al. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. **Trop Med Int Health**, v. 7, n. 9, p. 757-762, Sep. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12225506>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 25, p. S7-S18, 2009. Supplement 1. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287868>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 10, p. 1663, Oct. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18826842>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

VASCONCELOS, P. F. et al. A dengue epidemic in Ipuipara and Prado, Bahia. A seroepidemiologic survey. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, n. 1, p. 61-67, Jan./Feb. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10881120>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

VASCONCELOS, P. F. et al. A seroepidemiological survey on the island of São Luis during a dengue epidemic in Maranhão. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 2, p. 171-179, Mar./Apr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228368>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

VASCONCELOS, P. F. et al. Outbreak of classical fever of dengue caused by serotype 2 in Araguaiana, Tocantins, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 35, n. 2, p. 141-148, Mar./Apr. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284598>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 7, p. 532-541, July 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666708>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. **J Infect Dis**, v. 176, n. 2, p. 322-330, Aug. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237696>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

WANG, S. et al. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. **Virology**, v. 213, n. 1, p. 254-257, Oct. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7483271>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

WEBSTER, D. P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 11, p. 678-687, Nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850226>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Dengue guidelines for diagnosis, treatment prevention and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Publications of the World Health Organization**, New Edition, Geneva, 2009

YAMASHIRO, T. et al. Seroprevalence of IgG specific for dengue virus among adults and children in Santo Domingo, Dominican Republic. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 2, p. 138-43, Aug 2004. ISSN 0002-9637. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306701>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

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. 1053-1057, Mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698995>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

ZAGNE, S. M. et al. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 88, n. 6, p. 677-679, Nov./Dec. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7886768>>. Acesso em: 18 jan. 2012.