

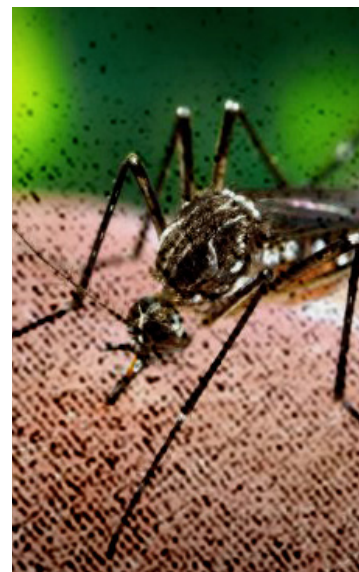
# Diagnóstico de Dengue em Laboratório de Saúde Pública

## DENGUE DIAGNOSIS IN PUBLIC HEALTH LABORATORY

**RESUMO:** Dengue em Goiás caracteriza-se por situação de hiperendemicidade e co-circulação dos quatro sorotipos virais. O diagnóstico e monitoramento da circulação dos vírus é realizado no laboratório de referência estadual (Lacen-GO) para agravos de importância em saúde pública. **Método:** Estudo descritivo das metodologias empregadas na rotina do diagnóstico laboratorial de dengue, no período de 1990 a 2016, através de pesquisa documental realizada na própria instituição. **Resultados:** A detecção de anticorpos IgM antidengue e o teste de isolamento viral dos DENV foram implantados na década de 90, frente ao aumento do número de casos notificados da doença em Goiás. A partir do ano 2000 a implantação das técnicas para detecção do antígeno viral NS1 e para detecção do material genético viral, aprimoraram as atividades do componente laboratorial no processo de vigilância epidemiológica da dengue em Goiás. **Conclusão:** Desde sua implantação, as técnicas de diagnóstico laboratorial da dengue realizadas no Lacen-GO, têm sido constantemente aprimoradas para atender aos desafios de diagnóstico relacionados às sucessivas epidemias de dengue ocorridas em Goiás.

**Palavras-chave:** Dengue. IgM. Testes Laboratoriais. Vigilância Epidemiológica.

**ABSTRACT:** Dengue is considered an endemic disease with epidemic peaks with current co-circulation of the four serotypes DENV-1 to 4 in Goiás state, Brazil. Lacen-GO is a reference laboratory in diagnosis of public health diseases. **Objective:** To describe methodologies applied to dengue diagnosis in Lacen-GO. **Method:** This article describes the methodologies used in routine of dengue diagnosis, from 1990 to 2016, through documentary research conducted at the institution. **Results:** The detection of anti-dengue IgM antibodies and the DENV virus isolation test were implemented in the 1990s, in the face of an increase in the number of reported cases of the disease in Goiás. Since 2000, techniques to detect vi-



Angela Ferreira L. Teive e Argolo Argolo<sup>1</sup>

Vinícius Lemes Silva<sup>1</sup>

Lucileis Fernandes Silva<sup>1</sup>

Maysa Madalena Silva<sup>1</sup>

Luiz Augusto Pereira<sup>1</sup>

Maria José Cunha<sup>1</sup>

Carmen Helena Ramos<sup>1</sup>

Maria Bárbara Helou Rodrigues<sup>1</sup>

Valéria Christina Rezende Féres<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, Secretaria de Estado da Saúde de Goiás.

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

ral antigen NS1 and detection of DENV RNA have been improved the activities of the laboratory component in the process of epidemiological surveillance of dengue in Goiás. **Conclusion:** Since its implementation, laboratory techniques applied at dengue diagnosis at Lacen-GO, has been constantly improved to attend the challenges of diagnosis of dengue in Goiás state.

**Keywords:** Dengue. IgM. Laboratory Assays. Epidemiological Surveillance.

## INTRODUÇÃO

Dentre as arboviroses que acometem os humanos, a dengue é considerada uma doença de grande importância em saúde pública e acomete principalmente as populações que vivem em países tropicais e subtropicais. A doença representa uma preocupação mundial por afetar o sistema de saúde, o trabalho e o turismo com repercussões econômicas e sociais<sup>(1,2)</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 100 milhões de infecções por dengue ocorrem anualmente, com aproximadamente 500.000 casos graves e 22 mil óbitos<sup>(3)</sup>. O vírus dengue (DENV) possui quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, 2, 3 e 4), pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*<sup>(4)</sup>, cujo principal vetor responsável pela transmissão é o mosquito fêmea do gênero *Aedes spp.*

Dengue é uma doença febril aguda que apresenta um espectro clínico amplo o qual pode variar desde infecção auto limitada, caracterizada por febre, geralmente alta, de início abrupto, associada à cefaleia, mialgia, artralgia, dor retro-orbitária, com presença ou não de exantema e/ou prurido, podendo evoluir para doença grave e óbito<sup>(5)</sup>. Atualmente o diagnóstico laboratorial da doença é baseado na detecção direta dos vírus e/ou de seus componentes (ácido nucléico e antígenos virais), em amostras coletadas durante a fase de viremia da doença. Na fase aguda da infecção o uso de técnicas sorológicas para a pesquisa de anticorpos antidengue IgM e IgG são empregadas<sup>(6,7)</sup>.

Em 1990, frente à crescente demanda para a confirmação laboratorial dos casos de dengue, nas regiões endêmicas do país, o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (Sis-lab) fortaleceu a capacidade dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen), para realizar grande parte dos testes de diagnóstico da dengue. Esta rede de laboratórios foi estruturada com o suporte e colaboração dos Laboratórios de Referência Nacional para a realização de testes complementares<sup>(8,9)</sup>.

No estado de Goiás, região Centro-Oeste do Brasil, o Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (Lacen-GO) é a unidade de referência para o diagnóstico e monitoramento da circulação dos vírus dengue. O atual cenário epidemiológico da dengue no Estado é caracterizado por uma hiperendemicidade da doença com co-circulação dos quatro sorotipos virais, aumento expressivo no número de casos notificados, casos graves e óbitos, seguindo a tendência epidemiológica da doença no país<sup>(9,10,11)</sup>.

Neste contexto, este artigo aborda em caráter retrospectivo e descritivo as metodologias empregadas na rotina do diagnóstico laboratorial de dengue, realizadas no Lacen-GO, no período de 1990 a 2016, através de uma pesquisa documental, nos protocolos de reação e nos relatórios periódicos produzidos pelas seções, realizada na própria instituição.

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DENGUE NO LACEN-GO DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTIDENGUE

Testes sorológicos podem detectar anticorpos específicos antidengue produzidos pelos indivíduos infectados por um dos quatro sorotipos virais. Os ensaios imunoenzimáticos (EIE) são amplamente utilizados e apresentam como vantagem baixo custo-efetivo de sua utilização comparado aos testes de diagnóstico virológico, assim como a possibilidade de processamento simultâneo de um grande número de amostras. Os anticorpos específicos antidengue IgM são marcadores de infecção aguda que, de modo geral, são detectados no soro ou plasma a partir do sexto dia após o início dos sintomas, durante o curso de uma infecção primária<sup>(12,13)</sup>. Entretanto, durante uma infecção secundária heterotípica, baixos títulos destes anticorpos são produzidos e, em muitos casos, tornam-se indetectáveis<sup>(14,15)</sup>.

No início da década de 90, com o aumento das notificações dos casos de dengue em Goiás, foi implantado no Lacen-GO a técnica sorológica *in house* para detecção de anticorpos IgM antidengue (MAC-ELISA), segundo o protocolo do *Center for Disease Control* (CDC, Atlanta, USA). Esta implantação foi possível através de uma cooperação técnica e científica do Instituto Evandro Chagas (IEC). Atualmente este teste é empregado na rotina do diagnóstico laboratorial da dengue no Lacen-GO, conjuntamente ao uso de *kits* comerciais, os quais passaram a ser disponibilizados pelo MS no final da década de 90.

## DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

### Isolamento e identificação dos vírus dengue

A técnica de isolamento viral (IV) e identificação dos DENV realizada no Lacen-GO, segue o protocolo da OMS a qual envolve cultura celular, usualmente de linhagem de mosquito (clone C6/36, *Aedes albopictus*)<sup>(16)</sup> seguida de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais contra os quatro sorotipos virais<sup>(17)</sup>. No Brasil, esta técnica é amplamente utilizada nos laboratórios de saúde pública como ferramenta primordial ao monitoramento da circulação dos vírus dengue no país. No Lacen-GO, o teste de IV foi implantado na década de 90 e desde então, este serviço de vigilância virológica detectou a introdução do DENV-1 em 1994, seguido da introdução do DENV-2 (1998), DENV-3 (2002) e DENV-4 (2013).

Os casos suspeitos de óbito por dengue são rotineiramente investigados pelo Instituto Evandro Chagas, em Belém do Pará e, para tanto, são utilizados testes de imunohistoquímica e histopatológico. No ano de 2015, com o intuito de apoiar as ações do Comitê de Investigação de Óbito de Goiás, a técnica de IV em cultura celular passou a ser aplicada também aos fragmentos de vísceras, coletados *post mortem*, dos pacientes com suspeita de infecção por dengue.

### Diagnóstico molecular por RT-PCR

Os métodos moleculares baseiam-se na detecção do RNA viral por meio da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a qual permite identificar os DENV ao utilizar iniciadores específicos das sequências genômicas de cada sorotipo viral<sup>(6)</sup>. O proto-

colo de RT-PCR convencional, seguido de uma hemi-nested PCR descrito por LANCIOTTI et al. (1992)<sup>(18)</sup>, é ainda hoje a metodologia mais referenciada para o diagnóstico molecular de DENV no Brasil. No Lacen-GO esta técnica foi implantada em 2006, com o intuito de ampliar e acelerar o diagnóstico laboratorial de dengue. Nos últimos anos, através de um aprimoramento tecnológico das metodologias de amplificação de ácidos nucleicos, a técnica denominada de PCR em tempo real foi desenvolvida e tem sido amplamente utilizada no diagnóstico de doenças infectocontagiosas nos Lacens de todo o Brasil. A técnica de PCR em tempo real promove uma detecção mais sensível dos produtos amplificados, utilizando além dos iniciadores convencionais, uma sonda de hidrólise marcada com fluoróforos, os quais são detectados a partir de cada ciclo de amplificação por PCR. Adicionalmente agrega outras vantagens ao método convencional, como a possibilidade de detectar mais de um alvo simultaneamente assim como a possibilidade de analisar os resultados de forma qualitativa e quantitativa<sup>(19,20)</sup>. O Lacen-GO implementou o diagnóstico de DENV por RT-PCR em tempo real em 2010, o que possibilitou a ampliação da sua capacidade de testagem de casos suspeitos de dengue com complicações e dos casos de óbitos. Dessa forma, foi possível aplicar uma técnica mais sensível com menor tempo para a liberação dos resultados e, portanto contribuindo com maior celeridade na conclusão dos casos.

### Detecção do antígeno viral NS1

A proteína não estrutural 1 (NS1) compõe os DENV e pode ser detectada, em sua forma solúvel, na corrente sanguínea dos indivíduos infectados durante o período de viremia<sup>(21)</sup>. A utilização de técnicas de enzima-imunoensaio (EIE) ou imunocromatografia para a detecção deste antígeno viral permite a confirmação etiológica da infecção por dengue. Apesar do avanço obtido no diagnóstico precoce da infecção por DENV através da detecção do NS1Ag, estudos descrevem uma importante variação da sensibilidade dos testes relacionada aos diferentes sorotipos virais assim como pelo tipo da infecção: primária ou secundária<sup>(15, 22, 23)</sup>.

No ano de 2009, um projeto coordenado pelo MS, promoveu a implantação do teste de detecção do NS1Ag pela metodologia EIE nos Lacens de todo o país. Essa ação proporcionou um aprimoramento do diagnóstico precoce das infecções por dengue. Neste ensejo, o Lacen-GO, além de incorporar esta metodologia ao seu escopo de testagem realizou, em 2014, um projeto piloto junto à Coordenação do Núcleo de Vigilância Epidemiológica do Município de Aparecida de Goiânia, para analisar a utilidade da detecção do NS1Ag como teste de triagem das amostras destinadas ao teste de isolamento viral. Frente ao aumento expressivo da positividade do IV, após a triagem das amostras, esta estratégia foi expandida e segue atualmente como rotina de diagnóstico do Lacen-GO.

Com o intuito de elucidar o potencial de testagem de amostras destinadas ao diagnóstico da dengue no Lacen-GO, apresentamos em uma tabela, os resultados dos testes de detecção de anticorpos antidengue IgM, RT-PCR, detecção do antígeno NS1 e do teste de isolamento viral, realizados no período de 2011 a 2016. Entre 109.090 testes realizados neste período, em conjunto, os testes sorológicos IgM e NS1Ag, corresponderam por ~90% do total de testagem. Este dado demonstra a grande utilização dos ensaios imunoenzimáticos na rotina de laboratórios

de análises clínicas. Adicionalmente, o expressivo número de testes de detecção de anticorpos IgM (70,8%), por si só, pode refletir o momento em que o paciente com suspeita clínica de dengue, procura atendimento nas unidades de saúde do estado de Goiás, visto que este teste é realizado em amostras coletadas após o 6º dia de sintomas (Tabela 1).

Destacamos ainda, que em 2015, um expressivo número de amostras biológicas foram testadas para todas as metodologias realizados no Lacen-GO e que, o percentual de positividade destes testes foi bastante elevado quando comparado, por exemplo, aos resultados apresentados para o ano de 2012 (Tabela 1). Neste contexto, o cenário epidemiológico da dengue no Estado, pode ter influenciado o desempenho dos testes, visto que em 2015, foi registrada a maior epidemia de dengue em Goiás em relação ao número de casos notificados (~170 mil casos). Segundo a literatura, a prevalência de uma doença é fator que interfere no valor preditivo de um teste diagnóstico e por consequência, em seu desempenho <sup>(24)</sup>.

**Tabela 1.** Resultados dos testes de diagnóstico laboratorial de dengue, realizados no Lacen-GO, no período de 2011-2016.

Ano	IgM		RT-PCR		NS1Ag		Isolamento Viral	
	Testado	Positivo (%)	Testado	Positivo (%)	Testado	Positivo (%)	Testado	Positivo (%)
2011	7.102	3.525 (49,6)	6	4 (66,7)	776	134 (17,3)	1625	378 (23,7)
2012	3.919	1.541 (39,3)	66	2 (3,0)	993	142 (14,3)	2263	386 (17,1)
2013	20.553	14.110 (68,6)	160	16 (10,0)	3526	795 (22,5)	1514	575 (37,9)
2014	12.471	7.524 (60,3)	188	23 (12,2)	3754	1246 (33,2)	1068	537 (50,3)
2015	18.823	11.723 (62,3)	735	258 (35,1)	6423	2797 (43,5)	1542	819 (53,1)
2016	14.374	6.411 (44,6)	699	79 (11,3)	5665	1187 (20,9)	845	228 (26,9)
Total	77.242	44.834 (58,0)	1.854	382 (20,6)	21.137	6.301(29,8)	8.857	2.923 (33,0)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico laboratorial da dengue é parte fundamental do processo de vigilância epidemiológica da doença e desempenha várias funções dentre elas: confirmação da infecção; monitoramento da circulação viral; apoio aos estudos epidemiológicos e alerta ao sistema de vigilância para o aumento da atividade viral, como fator preditivo de epidemia iminente<sup>(25)</sup>. Ainda, para o clínico, é ferramenta de suma importância para orientar o manejo e evolução dos pacientes, o que envolve o diagnóstico precoce da infecção, o diagnóstico diferencial para outros agravos, assim como o prognóstico de formas graves da doença<sup>(15,22,26)</sup>.

O Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (Lacen-GO) emprega rotineiramente metodologias para diagnóstico virológico e/ou imunológico da infecção por DENV. Estas técnicas apresentam um bom desempenho quanto à sensibilidade e especificidade ao diagnóstico da doença, o que requer infraestrutura e profissionais qualificados para sua execução.

Ao longo dos últimos anos, uma importante mudança no cenário epidemiológico das arboviroses vem ocorrendo no Brasil, especialmente após a introdução do vírus chikungunya (CHIV) e mais recentemente do vírus zika (ZIKV), este responsável por uma epidemia sem precedentes no país. Este cenário denota um grande desafio para o diagnóstico clínico, frente às síndromes símeles que estes agentes causam, assim como para o diagnóstico laboratorial

devido à co-circulação de vários flavivirus. Assim, o Lacen-GO mantém um perfil dinâmico com aprimoramento constante do seu serviço e capacitação técnica de seus profissionais, com o objetivo de atender às demandas do serviço de vigilância epidemiológica do estado de Goiás.

## REFERÊNCIAS

1. GUZMÁN, M. G.; GARCÍA, G.; KOURÍ, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 19, p. 204–215, 2006.
2. SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1423–32, 2012.
3. GUBLER, D J. et al. (Ed.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. CABI, 2014.
4. ICTVdB. **The Universal Virus Database**, version 4. The international Committee on the Taxonomy of Viruses, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
5. WHO. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control** 2nd ed. TDR: World Health Organization, Geneva, 1997.
6. GUBLER, DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.
7. DARWISH, N. T.; ALIAS, Y. B.; KHOR, S. M.. An introduction to dengue-disease diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 45-55, 2015.
8. CORDEIRO, Marli Tenório et al. Vinte anos de evolução da dengue no Estado de Pernambuco. In: **Vinte anos de evolução da dengue no estado de Pernambuco**. Editora da UFPE, 2008.
9. SIQUEIRA J. B., Jr., MARTELLI C. M., COELHO G. E., SIMPLICIO A. C., HATCH D. L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, 11: 48-53, 2005.
10. TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, p. e2520, 2013.
11. ARGOLO, A. F.L.T. et al. High frequency of pre-existing neutralizing antibody responses in patients with dengue during an outbreak in Central Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 546, 2016.
12. INNIS, B. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 418-427, 1989.
13. WAHALA, W. M. P. B.; DE SILVA, A. M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, v.3, p.2374-2395, 2011.
14. CHANAMA, S. et al. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, n. 3, p. 185-189, 2004.
15. GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

16. IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **The Journal of general virology**, v. 40, p. 531–544, 1978.
17. GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984.
18. LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 545–551, 1992.
19. JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4977–4983, 2005.
20. WAGGONER, J. J. et al. Comparison of the FDA-Approved CDC DENV-1-4 Real-Time Reverse Transcription-PCR with a Laboratory-Developed Assay for Dengue Virus Detection and Serotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 3418–20, 2013.
21. Young P. R., Hilditch P. A., Bletchly C., Halloran W. 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology** 38: 1053-1057.
22. CORDEIRO, M. T. Laboratory diagnosis for dengue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 18, p. S10–S12, 2012.
23. LIMA, M.R.Q., et al. A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. **Journal of Virological Methods**, v. 204, p. 105-108, 2014.
24. ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F.; ANDRADE, A. L. S. Avaliação de testes diagnósticos. **Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis**, v. 1, p. 9-30, 1997.
25. VORNDAN V, KUNO G, ROSADO N. A PCR- restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups Within serotypes. **Journal of Virological Methods**, jul; 48 (2-3): p. 237-44, 1994.
26. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 812 p. 2014.