

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Helena Cristina Balthazar Guedes Borges

**AVALIAÇÃO DOS CONJUNTOS DIAGNÓSTICOS (*KITS*) EMPREGADOS
NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DENGUE NO BRASIL**

Rio de Janeiro

2017

Helena Cristina Balthazar Guedes Borges

**AVALIAÇÃO DOS CONJUNTOS DIAGNÓSTICOS (*KITS*) EMPREGADOS
NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DENGUE NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Helena Pereira da Silva Zamith
Flavia Barreto dos Santos

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Borges, Helena Cristina Balthazar Guedes

Avaliação dos conjuntos diagnósticos (*kits*) empregados no diagnóstico da dengue no Brasil. / Helena Cristina Balthazar Guedes Borges. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

167 f. : il. ; tab. ; graf.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2017.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith.

Co-orientadora: Flávia Barreto dos Santos.

1. Dengue. 2. *Kits*. 3. Avaliação. 4. Vigilância Sanitária. I. Título

EVALUATION OF DIAGNOSTIC KITS USED IN THE DIAGNOSIS OF
DENGUE IN BRAZIL.

Helena Cristina Balthazar Guedes Borges

**AVALIAÇÃO DOS CONJUNTOS DIAGNÓSTICOS (KITS) EMPREGADOS
NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DENGUE NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz

Flavia Almada do Carmo (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Patrícia Alvarez Baptista (Doutor)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Fundação Oswaldo Cruz

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz

Flavia Barreto dos Santos (Doutor) - Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho...

Aos meus avós (*in memoriam*), se por aqui estivessem, estariam comemorando, mas essa conquista à moda portuguesa, com certeza.

Ao meu pai (*in memoriam*), minha mãe e meu irmão que sempre estiveram por perto em minhas conquistas, mesmo que observadas a distância. Todos exemplos de trabalhadores, cada qual em sua função. Sou grata por minha formação pessoal e por nunca medirem esforços para que eu conseguisse alcançar todos os desafios a que me propus.

Ao meu marido e filha, como incentivadores de minha carreira e de minhas conquistas, privados de minha presença em muitos momentos e, que desde sempre se orgulham de meu trabalho.

Ninguém e nada cresce sozinho. Sempre é preciso um olhar de apoio. Uma palavra de incentivo. Um gesto de compreensão. Uma atitude de segurança. Devemos, assim, sermos gratos aos que nos ajudaram a crescer. E termos o propósito de não parar. E não passar em vão pela vida.

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque nunca estive só.

A Dra. Helena P. S. Zamith, minha querida orientadora. Sou grata por sua amabilidade, simplicidade, incentivo e principalmente por seu conhecimento. Serei eternamente grata pela disponibilidade em aceitar a orientação desse trabalho.

A Dra. Flavia Barreto dos Santos que pelo amor a profissão e conhecimento, aceitou o convite para orientação desse trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade, seriedade e pela confiança.

A Dra. Marisa Coelho Adati, Chefe do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH/INCQS) por me apresentar à Vigilância Sanitária de fato. Por estar sempre me conduzindo, estimulando e envolvendo em novos desafios, sem os quais não chegaria até aqui. Muito obrigada pela amizade, ajuda, suporte, pelos ensinamentos, broncas e principalmente pela confiança depositada no meu trabalho e em mim.

Aos amigos do Laboratório de Sangue e Hemoderivados/DI/INCQS: Álvaro da Silva Ribeiro, Danielle Copello Vigo, Danielle Custodio Deslandes do Passo, Hudson Eduardo Souza da Costa, Marli Melo Silva, Roberto Machado do Passo, Sabrina Alberti Nóbrega de Oliveira, Vanderlei da Silva Souza, Valéria Furtado de Mendonça. Como conseguiria concluir meu trabalho sem a ajuda de vocês? Sem as brigas, sem as risadas ou mesmo divisão de broncas? Obrigada a todos, por tudo.

Aos Residentes em Vigilância Sanitária do INCQS: Cristiane Campos, Joice Cruzeiro, Karla Moraes, Marlon Issobe, Monique Oliveira, Nathália Machado, Paola Ameixoeira e Rafaelle Motta e Tainá Martins. Obrigada “jovens”! Cada um tem uma parcela na execução desse trabalho e na minha formação profissional.

Aos amigos FENEIS: Jorge Luiz Mesquita e Carlos Renato Lucena Brito pela ajuda no fracionamento e coleta das intermináveis amostras, sempre dispostos em colaborar.

A Margaret Ramos Guimarães, pelo suporte pessoal, material, estrutural, laboratorial etc. e tal. Por tudo isso e muito mais, obrigada.

A Leticia Seixas Prata da Fonseca, por ter aberto portas e me dado a oportunidade de conhecer de perto a importância e a seriedade do trabalho realizado na vigilância e controle de produtos para saúde.

Aos amigos da ANVISA: Augusto Geyer, Marcella Vergne, Marcos Jucá, Valter Pereira por sempre me atenderem e receberem de braços abertos, passando conhecimentos e experiências vividas no controle de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*.

Aos Serviços de Saúde e aos profissionais da Casa de Saúde e Maternidade Terezinha de Jesus, Centro Municipal de Saúde Masao Goto, Hospital Infantil Ismélia Silveira, Laboratório Central de Saúde Pública do Rio de Janeiro Noel Nutels, Policlínica Manuel Guilherme da Silveira Filho, Posto de Saúde Unidade Mista Dr. Moacir Almeida de Carvalho pela disponibilização das amostras clínicas.

Ao Dr. Marcelo Damião (LACEN-RJ) pela disponibilização do laboratório e das amostras clínicas.

Aos Serviços de Hemoterapia e Vigilâncias Sanitárias de todo o país pela disponibilização e auxílio na coleta das unidades de plasma fresco congelado.

Aos pacientes e doadores, que contribuíram anonimamente com o material imprescindível para realização desse trabalho, muito obrigada.

Ao Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) pelo suporte financeiro.

A ANVISA pelo apoio financeiro e disponibilização de material técnico de apoio, fundamentais para realização deste trabalho.

A FIOTEC pelo suporte administrativo do projeto.

Ao Sr. Leandro Machado (FIOTEC) pelo suporte administrativo ao projeto.

Ao INCQS pela viabilização deste trabalho.

RESUMO

A dengue passou de uma doença esporádica a um problema de saúde pública em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo e, atualmente é endêmica em mais de 125 países. O diagnóstico pode ser realizado pelo isolamento viral, por técnicas moleculares ou sorológicas para detecção de antígenos e anticorpos, dependendo da fase da doença. Na busca por testes sensíveis e específicos foram disponibilizados no mercado nacional e internacional *kits* de diagnóstico cujos valores de sensibilidade e especificidade, segundo dados da literatura, são discrepantes daqueles declarados pelos fabricantes para esses atributos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade e especificidade dos *kits* de diagnóstico da dengue comercializados no país, frente a amostras clínicas e de plasma fresco congelado (PFC) caracterizadas como verdadeiro positivas (VP) e negativas (VN) para presença do antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG da dengue. Os valores de sensibilidade e especificidade obtidos foram comparados aos declarados nas instruções de uso dos produtos. Um total de 13 *kits* de diagnóstico, 5 empregando o teste ELISA: (2 para NS1, 2 para IgG e 1 para IgM) e 8 Testes Rápidos (TRs) - (1 para NS1/IgM/IgG, 1 para IgM/IgG e 6 testes para NS1) foram avaliados frente as amostras VP e VN para presença do antígeno NS1, anticorpos IgM e IgG da dengue. A sensibilidade dos *kits* ELISA variou de 90,7% a 92,5% para NS1; de 87,7% a 95,0% para IgG e 98,9% para IgM. A especificidade foi de 90,7% a 94,2% para NS1; 61,8% a 62,3% para IgG e 86,8% para IgM. TRs. A sensibilidade dos TRs para NS1 variou de 59,1% a 86,6%, de 44,7% a 84,5% para IgM e de 55,6% a 74,6% para IgG. A especificidade variou de 94,5% a 100% para NS1; de 95,6% a 98,9% para IgM e de 79,3% a 86,3% para IgG. Nos testes ELISA a especificidade obtida foi de 6% até 36% inferior as declaradas. Os valores de sensibilidade nos TR obtidos foram de 6% a 51% inferiores aos declarados. Todos os *kits* avaliados (100%) apresentaram resultados INSATISFATÓRIOS, que foram encaminhados a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que tornou obrigatória a análise prévia, a partir de maio de 2016, objetivando a melhoria e manutenção da qualidade de tais produtos. A partir desta data, foram recebidos 34 *kits* para análise, apresentando os seguintes resultados preliminares: 14 foram considerados SATISFATÓRIOS, 1 INSATISFATÓRIO e 19 se encontram em processo de análise. O desfecho principal deste trabalho foi efetivar a implantação e o monitoramento contínuo de tais produtos, pré e pós-comercialização no país, no contexto das análises prévia, fiscal e controle preconizadas na legislação vigente, em atendimento à demanda da Gerência de Produtos para Diagnóstico de Uso *In Vitro* da Gerência Geral de Tecnologia de Produtos para Saúde da ANVISA. Como consequência destaca-se, a ampliação da capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados, localizado no Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde no controle da qualidade dos *kits* de diagnóstico disponibilizados no mercado nacional.

Palavras-chave: Dengue. *Kits*. Sensibilidade. Especificidade. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Dengue is a major vector-borne disease that affects humans, the largest public health problem in all the tropical and subtropical regions of the world in more than 125 countries. The diagnosis can be performed by viral isolation, by molecular or serological techniques for antigens and detection of antibodies, depending on the stage of the disease. Diagnostic and diagnostic tests, diagnostic and diagnostic tests, determinants and diagnostic tests, available in all markets and international, specifications and specifications are valid, according to literature data, showing values different from those declared by the manufacturers for these attributes. The objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of the dengue diagnostic test in the Brazilian market, unlike clinical samples and fresh frozen plasma (FFP) characterized as true positive (TP) and neutralistic (TN) by the presence of NS1 and Dengue IgG and IgG antibodies. The values obtained for the attributes were compared to those indicated in the instructions for use of the products. A total of 13 dengue diagnostic tests, 5 testes using ELISA (2 for NS1, 2 for IgG and 1 for IgM) and 8 Rapid Tests - RTs (1 for NS1 / IgM / IgG, 1 for IgM / IgG and 6 NS1) Clinical We analyzed and compared samples of drugs with symptoms of disease and donation of FFP surplus, characterized as TP and TN by the presence of NS1 antigens, IgG antibodies and dengue IgG. The sensitivity values of the ELISA tests ranged from 90.7% to 92.5% for NS1; from 87.7% to 95.0% for IgG and 98.9% for IgM. The specificity was 90.7% to 94.2% for NS1; 61.8% to 62.3% for IgG; 86.8% for IgM. As for the RTs, a sensitivity for NS1 ranged from 59.1% to 86.6%; from 55.6% to 74.6% for IgM and from 44.7% to 74.6% for IgG. The specificity of RT was 94.5% to 100% for NS1; from 95.6% to 98.9% for IgM and from 79.3% to 86.3% for IgG. In the ELISA tests, a specificity obtained was 6% to 36% lower than the one declared. Sensitivity values in RT are 6% to 51% lower than those reported. All testicles (100%) obtained unsatisfactory results, sent to the Brazilian Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA), which requires an earlier analysis, initiated in May 2016, with the objective of improving and maintaining its quality. After May 2016, 34 exams were submitted to the analysis, presenting the following results: 14 SATISFACTORS, 1 were not satisfactory and 19 are under review. Effective application and continuous monitoring of products, pre-and post-marketing in the country, in response to the demand of GEVIT / GGTPS / ANVISA, without context of analysis, fiscal and previous controls recommended in the current legislation for the main result of this work, O increasing the analytical capacity of the Department of Laboratory of Blood and Hemocomponents of Immunology of the National Institute of Quality Control in Health on the quality control of diagnostic tests of dengue available in the Brazilian market.

Key-words: Dengue. Diagnostic tests. Sensitivity. Specificity. Health Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dados mundiais da incidência da dengue no ano de 2014	29
Figura 2	Representação esquemática da estrutura, genoma, proteínas estruturais do capsídeo (C), precursora da membrana M (prM), glicoproteína do envelope (E) e proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 do vírus da dengue.....	35
Figura 3	Cinética dos antígenos (NS1) e anticorpos (IgM e IgG) em infecções primárias e secundárias pelo vírus da dengue.....	39
Figura 4	Confiança e acessibilidade aos métodos de diagnóstico diretos e indiretos para confirmação de casos de infecções pelo vírus da dengue.....	43
Figura 5	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção qualitativa de antígeno NS1.....	45
Figura 6	Ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de anticorpos IgM anti-dengue (MAC-ELISA)	46
Figura 7	Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-dengue.....	47
Figura 8	Representação esquemática de teste imunocromatográfico (TR) para detecção de anticorpo anti-dengue.....	48
Figura 9	Mapa da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro destacando municípios de proveniência das amostras no período de coleta de março de 2010 a maio de 2013.....	61
Figura 10	Unidades de Plasma Fresco Congelado.....	62
Figura 11	Teste rápido para pesquisa de anticorpos IgM/IgG da dengue.....	69
Figura 12	Teste rápido positivo para detecção de antígeno NS1, com aparecimento da banda controle (C) e banda teste (T) dentro da janela de resultados.....	69
Figura 13	Representação esquemática de um teste rápido com resultado positivo para detecção qualitativa de antígeno NS1 (T) com presença da banda controle do teste (C)	70

Figura 14	Representação esquemática dos painéis sorológicos confeccionados a partir de amostras verdadeiro positivas e verdadeiro negativas para os diferentes marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da dengue (DENV) pelos testes ELISA, TR e por RT-PCR em tempo real.....	72
Figura 15	Etapas de confecção de <i>spike</i> de amostras de sangue.....	76
Figura 16	Equações utilizadas para o cálculo dos valores percentuais de sensibilidade e especificidade.....	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição do quantitativo de amostras clínicas e de plasma fresco congelado (PFC) recebidas pelo INCQS no período de março de 2010 a março de 2015.....	84
Gráfico 2	Distribuição das amostras clínicas (A. CLÍNICAS) quanto à seleção para análise em relação ao volume obtido.....	85
Gráfico 3	Distribuição das amostras de plasma fresco congelado (A.PFC) com volume adequado superior a 150 mL e A.PFC selecionadas e não selecionadas para caracterização sorológica.....	85
Gráfico 4	Distribuição das amostras clínicas e do plasma fresco congelado (PFC) selecionadas para caracterização sorológica quanto à detecção de antígenos e anticorpos anti-dengue.....	86
Gráfico 5	Caracterização das amostras clínicas (A.) quanto à presença do antígeno NS1.....	88
Gráfico 6	Distribuição das amostras clínicas reagentes para NS1 em 01 e em 02 testes de metodologias (ELISA e TR) e/ou fabricantes diferentes (N= 459).....	89
Gráfico 7	Amostras clínicas confirmadas reagentes para NS1 e NS1 associado a anticorpos IgM e/ou IgG (N=332)	90
Gráfico 8	Distribuição dos <i>kits</i> de diagnóstico utilizados nas análises de amostras clínicas positivas somente para o antígeno NS1 da dengue (N=112).....	90
Gráfico 9	Distribuição das amostras clínicas reativas para NS1+IgM+IgG confirmadas e amostras com resultados discordantes nos 2 testes sorológicos para detecção da dengue (N=220)	91
Gráfico 10	Demonstrativo de amostras clínicas reagentes para antígeno NS1 e anticorpos IgM e/ou IgG anti-dengue (N=49)	92
Gráfico 11	Distribuição dos <i>kits</i> de diagnóstico A e D (Quadros 1 e 2); D e F (Quadro 2) utilizados nas análises de amostras clínicas (N=49) quanto à presença do antígeno NS1 combinado aos anticorpos IgM e/ou IgG da dengue.....	92
Gráfico 12	Distribuição das amostras clínicas verdadeiro-positivas para NS1 e NS1 combinado a anticorpos IgM e/ou IgG anti-dengue (N=332)	93
Gráfico 14	Amostras clínicas de indivíduos com suspeita de dengue (N= 1.098) analisadas quanto à presença de anticorpos IgM	96
Gráfico 15	Amostras clínicas de indivíduos com suspeita de dengue (N=473) confirmadas reagentes para anticorpos IgM analisadas quanto à presença de anticorpos IgG.....	96
Gráfico 16	Distribuição dos <i>kits</i> de diagnóstico A e B (Quadro 1); <i>kits</i> D e E (Quadro 2) utilizados nas análises das amostras clínicas de indivíduos com suspeita de dengue (N=133) quanto à presença combinada dos	

	anticorpos IgM e IgG.....	97
Gráfico 17	Amostras clínicas (A) de indivíduos com suspeita de dengue analisadas por 01 teste para a detecção de anticorpos IgG (N=1.873).....	98
Gráfico 18	Amostras clínicas (A) de indivíduos com suspeita de dengue reagentes em 01 e 02 testes para anticorpos IgG da dengue (N=1.035)	99
Gráfico 19	Amostras clínicas (A) de indivíduos com suspeita de dengue (N=520) analisadas quanto à confirmação de reatividade aos anticorpos IgG.....	99
Gráfico 20	Distribuição de amostras clínicas reagentes (N=769) e não reagentes (N=1.823), confirmadas em 02 testes sorológicos quanto a presença de antígeno NS1, combinados ou não a anticorpos IgM e IgG da dengue.....	100
Gráfico 21	Distribuição de amostras clínicas confirmadas em 02 diferentes testes sorológicos para a detecção do antígeno NS1, anticorpos IgM e IgG da dengue em diferentes associações (N=769)	101
Gráfico 22	Quantitativo de unidades de plasma fresco congelado obtidos por Região do país entre 2013 e 2015, para confecção de painel sorológico (N=672)	105
Gráfico 23	Distribuição das amostras de plasma fresco congelado coletado no período de 2013 a 2015 por macrorregião do país selecionados para o estudo (N=383)	105
Gráfico 24	Distribuição das amostras de plasma fresco congelado analisadas quanto à presença de anticorpos IgM da dengue por macrorregião do país (N=326)	107
Gráfico 25	Distribuição das amostras clínicas reagentes para NS1 quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=112)	111
Gráfico 26	Distribuição das amostras clínicas reagentes ao combinado NS1 e anticorpos IgM quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=36)	111
Gráfico 27	Distribuição das amostras clínicas reativas para NS1 e IgG quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=8).....	112
Gráfico 28	Distribuição das amostras clínicas reagentes NS1, IgM e IgG quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=5).....	113
Gráfico 29	Distribuição das amostras clínicas reagentes para anticorpos IgM quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=22)	113
Gráfico 30	Distribuição dos sorotipos de DENV identificados por RT-PCR, em amostras clínicas reagentes em pelo menos 1 teste sorológico para pesquisa de antígeno e/ou anticorpos anti-dengue (N=712)	116
Gráfico 31	Distribuição final das amostras clínicas coletadas no estado do Rio de	

	Janeiro, no período de 2010 a 2015, sorotipadas por RT-PCR para o vírus da dengue (DENV)	117
Gráfico 32	Distribuição dos kits de diagnóstico ELISA e TR recebidos e analisados (N=13)	123
Gráfico 33	Distribuição dos <i>kits</i> de diagnóstico de ELISA de acordo com o marcador sorológico (N=5)	123
Gráfico 34	Distribuição dos Testes Rápidos quanto aos marcadores para o diagnóstico da dengue (N=8)	124
Gráfico 35	Distribuição por matriz de análise dos testes de ELISA e TR disponíveis comercialmente selecionados para avaliação (N=13)	125
Gráfico 36	Distribuição quanto aos tipos de anticoagulantes empregados na obtenção de amostras segundo instruções de uso, utilizados para coleta de amostras nos <i>kits</i> de ELISA e TR para diagnóstico da dengue (N=13).....	126
Gráfico 37	<i>Kits</i> para pesquisa de antígeno NS1 e de anticorpos IgM e IgG analisados, utilizados no diagnóstico sorológico da dengue (N=13).....	127
Gráfico 38	Natureza dos antígenos e anticorpos (AC) utilizados para sensibilização da fase sólida dos <i>kits</i> de ELISA e TR para o diagnóstico da dengue, incluindo proteínas recombinantes do envelope viral (ptns rec. env) e lisado viral (lis viral)	128
Gráfico 39	Distribuição dos <i>kits</i> recebidos para Análise (Prévia ou Controle) por metodologia (N=34) ELISA, Teste rápido (TR) e RT-PCR em tempo real para a detecção do genoma do vírus da dengue, zika e chikungunya (NAT-PCR)	136
Gráfico 40	Resultados obtidos na análise prévia efetuada de <i>kits</i> de diagnóstico após avaliação pelo LSH/ INCQS/Fiocruz até março de 2017.....	137
Gráfico 41	Distribuição dos <i>kits</i> para o diagnóstico laboratorial de dengue analisados e com resultado satisfatório após avaliação pelo LSH/INCQS/Fiocruz até março de 2017.....	138

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Codificação, aplicabilidade, sensibilização das microplacas, matriz de análise, sensibilidade e especificidade descritas nas instruções de uso dos <i>kits</i> de diagnóstico utilizados na caracterização sorológica das amostras por ELISA (ensaio imunoenzimático)	65
Quadro 2	Codificação, aplicabilidade, sensibilização das microplacas, matriz de análise, sensibilidade e especificidade descritas nas instruções de uso dos Testes Rápidos (Imunocromatográficos) utilizados na caracterização sorológica das amostras.....	68
Quadro 3	Codificação e aplicabilidade descritas nas instruções de uso do teste de diagnóstico empregando o método RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa) utilizado para detecção de ácidos nucleicos (NAT) e sorotipagem das amostras.....	71
Quadro 4	Codificação e descrição sumária de acordo com as instruções de uso dos conjuntos diagnósticos (<i>kits</i>) adquiridos no mercado nacional.....	74
Quadro 5	Identificação dos testes ELISA avaliados.....	121
Quadro 6	Identificação dos testes rápidos avaliados.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das amostras clínicas e de unidades de plasma fresco congelado (PFC) coletadas em serviços de hemoterapia para composição de painel de amostras, por ano de coleta.....	81
Tabela 2	Distribuição do quantitativo de amostras clínicas por localidade de coleta no estado do Rio de Janeiro.....	82
Tabela 3	Distribuição do quantitativo de unidades de plasma fresco congelado (PFC) obtido por região e número de Serviços de Hemoterapia do país.....	83
Tabela 4	Distribuição das amostras de plasma fresco congelado coletados no período de 2013 a 2015 avaliadas quanto a presença de antígeno NS1 (N=383)	106
Tabela 5	Distribuição das amostras de plasma fresco congelado coletadas no período de 2013 a 2015 avaliadas quanto a presença de anticorpos IgM anti-dengue (N=326).)	107
Tabela 6	Distribuição das amostras de plasma fresco congelado avaliadas coletadas no período de 2013 a 2015 quanto a presença de anticorpos IgG anti-dengue (N=326)	108
Tabela 7	Quantitativo de amostras clínicas distribuídas em diferentes grupos compostos por amostras verdadeiro positivas para os marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da dengue (NS1, IgM e IgG) analisadas por RT-PCR.....	110
Tabela 8	Distribuição dos sorotipos do DENV identificados por RT-PCR em amostras clínicas verdadeiro positivas agrupadas de acordo com a reatividade em pelo menos 2 testes sorológicos para pesquisa de antígeno e anticorpos anti-dengue.....	115
Tabela 9	Distribuição das amostras clínicas reagentes em 1 ou 2 testes sorológicos para detecção de antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG anti-dengue, de acordo com o sorotipo (N=939) do vírus da dengue (DENV) coletadas no estado do Rio de Janeiro no período de 2010 a 2015.....	117
Tabela 10	Distribuição de amostras verdadeiro positivas e verdadeiro negativas para confecção de painéis sorológicos para avaliação de <i>kits</i> comercialmente disponíveis empregados no diagnóstico laboratorial da dengue.....	120
Tabela 11	Valores de sensibilidade e especificidade obtidos nos testes ELISA para o diagnóstico laboratorial das infecções pelo DENV, avaliados frente a amostras sorológicas verdadeiro positivas (VP) e verdadeiro negativas (VN) para dengue.....	131

Tabela 12	Comparação entre a sensibilidade e especificidade declarada e obtida para os <i>kits</i> de ELISA avaliados.....	132
Tabela 13	Valores de sensibilidade e especificidade apresentados nos TESTES RÁPIDOS para o diagnóstico laboratorial de dengue, avaliados frente às amostras verdadeiro positivas (VP) e verdadeiro negativas (VN)	133
Tabela 14	Comparação entre a sensibilidade e especificidade obtida e a declarada nas instruções de uso do produto para os Testes Rápidos avaliados (N=8)	134
Tabela 15	Caracterização e quantidade dos <i>kits</i> para o diagnóstico laboratorial de dengue avaliados pelo LSH/INCQS/Fiocruz em 2017.....	137

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Sequência de testes realizados e resultados obtidos na caracterização de amostras clínicas como verdadeiramente positivas (VP) e negativas (VN), quanto ao antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG da dengue.....	103
Fluxograma 2	Caracterização sorológica e molecular dos PFC e confecção do painel de amostras verdadeiro negativas para dengue (amostras clínicas e PFC)	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AcMc	Anticorpo Monoclonal
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
BPF	Boas Práticas de Fabricação
°C	Grau Celsius
C	Proteína do capsídeo ou core
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CHIKV	Vírus da Chikungunya
C.O.	Ponto de Corte (do inglês <i>cut-off</i>)
CYD-TDV	Dengvaxia® – vacina tetravalente de Dengue
DATAVISA	Sistema de Gerenciamento de Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ferramenta de consulta online sobre processos, produtos e empresas submetidos à regulação sanitária.
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
d.C.	Depois de Cristo
DC	Dengue Clássico
DENV	Vírus da Dengue
DENV-1	Vírus da Dengue Sorotipo 1
DENV-2	Vírus da Dengue Sorotipo 2
DENV-3	Vírus da Dengue Sorotipo 3
DENV-4	Vírus da Dengue Sorotipo 4
DI	Departamento de Imunologia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade Ótica
D.O.U.	Diário Oficial da União
E	Proteínas do envelope

ECP	Efeito Citopático
EDTA	EDTA (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>) ou ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA(s)	Ensaio (s) Imunoenzimático (s) (do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
NHLBI	<i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>
FIOTEC	Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde
FA	Febre Amarela
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHD	Febre do dengue hemorrágica (do inglês: <i>Fever haemorrhagic dengue</i>)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FN	Falso Negativas
FP	Falso Positivas
GDTVZ	Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses
GEVIT	Gerência de Produtos para Diagnóstico de Uso <i>in vitro</i>
GGTPS	Gerência Geral de Tecnologia de Produtos para Saúde
GRU	Guia de Recolhimento da União
HBsAg	Antígeno de Superfície da Hepatite B
HARPYA	Sistema de Gerenciamento de Amostras vinculado ao Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS)
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
IH	Inibição da hemaglutinação (do inglês: <i>Hemagglutination inhibition</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humana
HRP	Conjugado HRP (do inglês: <i>Horseradish peroxidase</i>)
IC	Controle interno (do inglês: <i>Internal Control</i>)
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG-ELISA	Ensaio imunoenzimáticos de captura do anticorpo G (do inglês: <i>IgG antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
IgM	Imunoglobulina M

INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kDa	KiloDalton
LSH	Laboratório de Sangue e Hemoderivados
μL	Microlitro
MAC-ELISA	Ensaio imunoenzimáticos de captura do anticorpo M (do inglês: <i>IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
M	Proteína de membrana
MS	Ministério da Saúde
mL	Mililitro
mNS1	NS1 associada a membrana da célula
nm	Nanômetros
NHLBI	<i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>
NS	Proteínas não estruturais
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2	Proteína não estrutural 2
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4	Proteína não estrutural 4
NS5	Proteína não estrutural 5
NAT	Técnica de detecção de ácido nucleico
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFC	Plasma Fresco Congelado
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
POP	Procedimento Operacional Padronizado
prM	Proteína pré-membrana
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas (do inglês: <i>Plaque reduction neutralization test</i>)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico

rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa (do inglês: <i>Reverse transcriptase</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (do inglês: <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SCD	Síndrome do Choque por Dengue
SE	Semana Epidemiológica
SES-RJ	Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro
SGAWEB	Sistema de Gerenciamento de Amostras via WEB
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação.
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TMB	Tetrametilbenzidina
TR(s)	Teste (s) Rápido (s)
VN (s)	Verdadeiro Negativa (s)
VP(s)	Verdadeiro Positiva (s)
VERO	Célula de rim de macaco verde Africano (do inglês: <i>kidney epithelial cells extracted from an African green monkey</i>)
VLP	<i>Virus Like Particles</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês: <i>World Health Organization</i>)
ZIKV	Vírus da Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	Breve histórico da dengue.....	27
1.2	Epidemiologia da dengue.....	28
1.2.1	Dengue no Mundo.....	28
1.2.2	Dengue nas Américas.....	30
1.2.3	Dengue no Brasil.....	31
1.3	Transmissão da dengue.....	33
1.4	O Vírus da dengue.....	35
1.5	Controle do vetor e prevenção da doença.....	36
1.6	Manifestações clínicas e resposta imune.....	37
1.7	Diagnóstico laboratorial da dengue.....	41
1.7.1	Isolamento viral.....	43
1.7.2	RT-PCR.....	44
1.7.3	Detecção do antígeno NS1.....	44
1.7.3.1	ELISA.....	44
1.7.4	Detecção de anticorpos.....	45
1.7.4.1	MAC-ELISA – IgM	46
1.7.4.2	ELISA IgG.....	47
1.7.4.3	Teste rápido	48
1.7.5	Sensibilidade e especificidade clínica ou diagnóstica.....	49
1.8	Vigilância sanitária e o registro de produtos para saúde no Brasil.....	50
1.8.1	Regulamentação de produtos para saúde	52
1.8.2	Registro de produtos para diagnóstico de uso <i>in vitro</i>	53
1.9	Justificativa.....	55
2	OBJETIVOS.....	58
2.1	Objetivo Geral.....	58
2.2	Objetivos Específicos.....	58
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3.1.1	Obtenção de amostras clínicas com suspeita de dengue.....	61
3.1.2	Obtenção de unidades de plasma fresco congelado (PFC)	62
3.1.3	Registro, codificação e armazenamento das amostras recebidas.....	63
3.1.4	Caracterização sorológica e molecular das amostras.....	64

3.1.4.1	ELISA.....	65
3.1.4.1.1	(Kit A) - Detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-dengue por captura	65
3.1.4.1.2	(Kit B) - Detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-dengue pelo método ELISA Indireto.....	66
3.1.4.1.3	(Kit C) - Detecção qualitativa do antígeno NS1 por ELISA	67
3.1.4.2	Testes Rápidos (Imunocromatográficos)	67
3.1.4.2.1	(Kit D e E) - Detecção de anticorpos IgM/IgG anti-dengue	68
3.1.4.2.2	(Kit F e G) - Detecção de antígeno NS1.....	69
3.1.4.3	(Kit H) - Caracterização Molecular.....	70
3.2	Etapa 2 - Confeção de painéis sorológicos.....	72
3.3	Etapa 3 - Avaliação dos kits comercialmente disponíveis utilizados no diagnóstico sorológico da dengue.....	73
3.3.1	Critérios de seleção e aquisição dos kits.....	73
3.3.2	Avaliação do atributo de sensibilidade dos kits adquiridos no mercado nacional.....	75
3.3.3	Avaliação dos atributos de especificidade dos kits adquiridos no mercado nacional.....	76
3.3.4	Análise comparativa dos valores de sensibilidade e especificidade obtidos frente aos valores declarados pelos fabricantes nas instruções de uso dos produtos.....	77
3.3.5	Avaliação das instruções de uso que acompanham os produtos.....	78
3.4	Etapa 4 - Implantação e implementação da análise de kits empregados no diagnóstico da dengue no contexto da legislação nacional (prévia, fiscal e controle).....	78
3.4.1	Recebimento de produtos para análises previstas na legislação vigente.....	78
3.4.2	Análise prévia dos kits para detecção da dengue.....	79
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1	Coleta de amostras para confecção de painéis.....	81
4.2	Seleção das amostras clínicas e PFCs quanto ao volume obtido.....	84
4.3	Caracterização sorológica das amostras.....	86
4.3.1	Caracterização sorológica das amostras clínicas.....	87
4.3.1.1	Análise das amostras clínicas quanto a presença do antígeno NS1 do DENV....	88
4.3.1.2	Análise das amostras clínicas quanto a presença de antígeno NS1 associada a	

	anticorpos IgM e IgG da dengue.....	89
4.3.1.3	Análise de amostras clínicas quanto a presença de anticorpos IgM e combinados IgM e IgG anti-dengue.....	94
4.3.1.4	Análise de amostras clínicas quanto a presença de anticorpos IgG da dengue...	98
4.3.1.5	Análise de amostras clínicas quanto a ausência de antígeno NS1, anticorpos IgM e IgG anti-DENV – Painel de amostras verdadeiramente negativas.....	101
4.3.2	Caracterização das unidades de plasma fresco congelado (PFC)	104
4.3.2.1	Análise de PFC quanto a detecção de antígeno NS1 do DENV.....	105
4.3.2.2	Análise de PFC quanto a detecção de anticorpos IgM anti-dengue	106
4.3.2.3	Análise de PFC quanto a detecção de anticorpos IgG anti-dengue	108
4.4	Caracterização molecular das amostras.....	109
4.4.1	Caracterização molecular das amostras clínicas.....	109
4.4.1.1	Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para antígeno NS1	110
4.4.1.2	Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para antígeno NS1 e anticorpos IgM.....	111
4.4.1.3	Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para antígeno NS1 e anticorpos IgG.....	112
4.4.1.4	Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para antígeno NS1 combinado a anticorpos IgM e IgG	112
4.4.1.5	Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para anticorpos IgM.....	113
4.4.1.6	Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para anticorpos IgG	114
4.5	Caracterização molecular das amostras de plasma fresco congelado (PFC).....	118
4.6	Confecção de painéis sorológicos.....	120
4.7	Avaliação dos kits empregados no diagnóstico da dengue.....	120
4.7.1	Distribuição dos kits ELISA e TR adquiridos de acordo de acordo com as metodologias avaliadas.....	122
4.7.2	Avaliação das instruções de uso que acompanham os produtos.....	124
4.7.2.1	Avaliação quanto a matriz de análise.....	124
4.7.2.2	Análise quanto ao uso ou não, e tipo de anticoagulante utilizado na obtenção	

	das amostras.....	125
4.7.2.3	Análise quanto ao tipo e natureza dos marcadores (antígeno e anticorpos) utilizados na sensibilização da fase sólida.....	126
4.7.2.4	Análise quanto aos tipos de proteínas utilizadas na sensibilização da fase sólida.....	127
4.8	Avaliação dos atributos de sensibilidade e especificidade clínica.....	128
4.8.1	Análise quanto aos dados de desempenho de sensibilidade e especificidade declarados pelos fabricantes para a metodologia de ELISA	129
4.8.2	Análise quanto aos dados de desempenho de sensibilidade e especificidade declarados nas instruções de uso fornecidas pelos fabricantes para os testes rápidos (imunocromatográficos)	130
4.9	Avaliação da sensibilidade e especificidade clínica.....	130
4.9.1	Avaliação da sensibilidade e especificidade dos testes ELISA.....	131
4.9.2	Avaliação da sensibilidade e especificidade dos Ensaio Imunocromatográficos – Testes Rápidos (TRs)	133
5.	CONCLUSÕES.....	140
6.	PERSPECTIVAS.....	142
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
	 ANEXO A – OFÍCIO DE SOLICITAÇÃO DE ANÁLISE PRÉVIA ENCAMINHADO PELA ANVISA.....	 157
	ANEXO B - FORMULAÇÃO E EXIGÊNCIA EMITIDA PELA ANVISA.....	159
	ANEXO C - RESPOSTA À SOLICITAÇÃO DE ANÁLISE, ENCAMINHADA PARA AS EMPRESAS INCLUINDO PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM, DOCUMENTAÇÃO, ACESSÓRIOS, EQUIPAMENTOS (CASO SE APLIQUE) E PAGAMENTO DA ANÁLISE.....	161
	ANEXO D - ANÁLISE CONTROLE - OFÍCIO ENCAMINHADO VIA MINISTÉRIO DA SAÚDE PARA SOLICITAÇÃO DE AVALIAÇÃO DE PRODUTO PARA AQUISIÇÃO DE KITS, DISTRIBUIÇÃO E USO NOS SERVIÇOS DE SAÚDE DO PAÍS.....	162
	APÊNDICE A - PROTOCOLO DE ANÁLISE ESTABELECIDO PARA AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS POR ANÁLISE PRÉVIA PELA METODOLOGIA ELISA.....	165

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE ANÁLISE ESTABELECIDO PARA AVALIAÇÃO
DOS PRODUTOS POR ANÁLISE PRÉVIA PELA METODOLOGIA TESTE
RÁPIDO..... 167

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico da dengue

A dengue é uma doença historicamente importante e conhecida há séculos. Os primeiros registros de sintomas compatíveis com as manifestações da doença, foram relatados em enciclopédia médica Chinesa e datam de 992 d.C. A origem do vírus consta em manuscritos que reportam sua ocorrência na África. Durante a dinastia Chin (265-420 d.C.), e a enfermidade foi conhecida pelo nome de “veneno da água” pela associação dos insetos voadores com a água (GUBLER, 1998, 2006).

Epidemias com curso e propagação similares às da dengue ocorreram em 1635 e 1699 nas Índias Ocidentais e América Central, respectivamente. Os primeiros relatos de grandes epidemias ocorridas por doença compatível com a dengue datam de 1779 e 1780, na Ásia, África e América do Norte. Nos anos de 1800 a doença foi difundida em todas as cidades costeiras urbanas do mundo devido à utilização de navios durante a expansão comercial. O advento do transporte marítimo incrementou a dispersão dos mosquitos *Aedes* e de humanos infectados nos trópicos e conseqüentemente, a notificação dos surtos de dengue foram aumentando durante o século XVII (SHARP et al., 2017).

A etiologia viral da dengue e a transmissão por mosquitos foram determinadas somente no século XX. A transmissão do vírus da dengue (DENV) foi demonstrada pela primeira vez por Graham e atribuída ao *Culex quinquefasciatus* sendo essa descoberta sustentada por Ashburn e Craig. Entretanto, os pesquisadores australianos Bancroft e colaboradores sugeriram que o *Aedes aegypti* fosse o principal vetor, que foi confirmado em 1926 por Siler e colaboradores, implicando em diferentes medidas para o controle de mosquitos na transmissão da dengue (SILER; HALL; HITCHENS, 1926).

Atualmente é conhecido que a doença é causada por 4 sorotipos ou tipos distintos do vírus, antigenicamente relacionados, os chamados vírus da dengue 1, 2, 3 e 4 (DENV-1, 2, 3, e 4) pertencentes a família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti* em sua maioria e pelo *Aedes albopictus*. Os surtos da infecção por qualquer um dos sorotipos variam de assintomáticos, subclínicos a infecções sintomáticas (FARES et al., 2015).

A expansão da doença ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial. Até o final da guerra, muitos países da Ásia tornaram-se hiperendêmicos com a co-circulação dos quatro sorotipos do vírus. O movimento de tropas e o material de guerra transportou o vírus e seu principal mosquito vetor, o *A. aegypti*. O fim da guerra trouxe um aumento do crescimento econômico em muitos países do Sudeste Asiático e este foi o principal catalisador para o crescimento urbano, que começou na década de 1950 e continua até hoje (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

1.2 Epidemiologia da Dengue

1.2.1 Dengue no Mundo

A dengue é uma grande preocupação de saúde pública em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Aproximadamente 3,6 bilhões de pessoas vivem nestas regiões onde a dengue é potencialmente transmitida. A doença é endêmica em mais de 125 países e se expandiu globalmente impulsionada pelas mudanças climáticas, evolução do vírus e por fatores sociais, tais como, o crescimento populacional, aumento da urbanização e de circulação de pessoas e pelos programas insuficientes de controle de vetores (MURRAY; QUAM; SMITH, 2013; KATZELNICK; COLOMA; HARRIS, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a dengue, a doença viral mais importante transmitida por mosquitos que passou de doença esporádica com epidemias ocorridas em intervalos longos, a um grave problema de saúde pública com expressiva repercussão social e econômica causada por sua expansão geográfica mundial, aumento do número de casos e pela severidade da doença (GUZMAN; HARRIS, 2015; WHO, 2012). Nos últimos 50 anos, a incidência global da doença aumentou 30 vezes (GUZMAN; HARRIS, 2015; KATZELNIK; COLOMA; HARRIS, 2017).

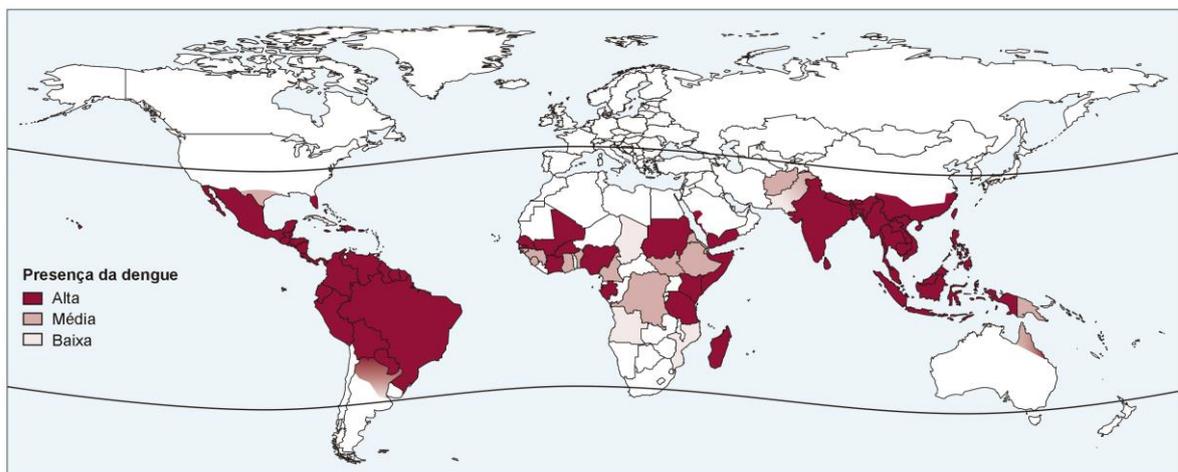
Os custos diretos e indiretos a nível mundial relacionados à dengue são elevados, sendo estimados em aproximadamente 39 bilhões de dólares por ano (ano base de 2010). Os gastos envolvem cuidados médicos, vigilância, controle de vetores e a perda de produtividade (RAMOS-CASTANHEDA et al., 2017)

Segundo Bhatt e colaboradores (2013) a ocorrência média anual de infecções estimada da doença é de 390 milhões de casos (284 a 528 milhões), dos quais 96 milhões (67 a 136 milhões) apresentaram manifestações clínicas com alguma severidade. As estimativas para a população em risco variam de 30% a 54,7% da população mundial (2,05 a 3,74 bilhões). De acordo com a OMS, a incidência da dengue cresceu mundialmente nas últimas décadas, embora os números de casos reais ainda sejam subnotificados ou classificados incorretamente. Estima-se que 50 a 100 milhões de infecções de dengue ocorram todos os anos e que quase metade da população mundial vive em mais de 100 países onde a doença é endêmica incluindo o sudeste da Ásia, as Américas, Pacífico Ocidental, África e regiões orientais do Mediterrâneo (WHO, 2016). Segundo Brady e colaboradores (2012), 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países estão sob o risco de infecção da doença.

O número de casos reportados da doença aumentou de 400 mil a 1,3 milhões no período de 1996 a 2005 atingindo 2.2 milhões em 2010 e 3,2 milhões em 2015, ano que se caracterizou por surtos mundiais como evidenciado nas Filipinas, Malásia, Índia e Brasil que registrou 1,5 milhões de casos. Estima-se que 500.000 pessoas com dengue severa sejam hospitalizadas a cada ano e 2,5% destes vão a óbito (WHO, 2016).

A Figura 1 mostra a estimativa mundial dos níveis de incidência da dengue no ano de 2014 obtida a partir da integração dos dados da OMS (2010) e de Bhatt e colaboradores de 2013 (GUZMAN; HARRIS, 2015).

Figura 1- Dados mundiais da incidência da dengue no ano de 2014.



Fonte: (Adaptado de GUZMAN; HARRIS, 2015)

1.2.2 Dengue nas Américas

A primeira suspeita de epidemia de dengue nas Américas foi descrita em 1635 na Martinica e Guadalupe e em 1699 no Panamá. De acordo com o relatado por Brathwaite e colaboradores em 2012, a história da dengue nas Américas possui quatro fases distintas que incluíram: a introdução da doença em 1635 e 1639; o plano continental para erradicação do vetor (*A. aegypti*) pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) no período de 1947 a 1970 objetivando a eliminação da febre amarela; a re-infestação no período de 1971-1999 associada à interrupção do programa de erradicação do vetor pela OPAS e a migração do *Aedes* do Caribe para a América do Sul, especificamente para a Venezuela e subsequente infestação do Brasil. A última fase incluiu o aumento da dispersão do *A. aegypti* no Brasil e consequente aumento da circulação do vírus a partir do ano 2000 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

No século XIX surtos de dengue ocorreram em cidades portuárias como no Caribe, nas Américas do Norte, Central e do Sul, principalmente envolvidas em atividades comerciais. A epidemia ocorrida em Cuba em 1981 representou um marco histórico da doença nas Américas (VALLE, 2015). Nas últimas 3 décadas, o número de casos reportados aumentou 4,6 vezes nas Américas de aproximadamente 1 milhão de casos durante os anos 80 a 4,7 milhões no período de 2000 a 2007 (SAN MARTÍN et al., 2010; BRATHWAITE et al., 2012).

Os custos econômicos e sociais anuais relacionados à doença calculados com base no ano de 2010 foram estimados entre 1 e 4 bilhões de dólares. Entre 2001 e 2007, mais de 4 milhões de casos foram notificados e a sub-região mais afetada foi a América do Sul, particularmente o Brasil, Equador, Colômbia, Paraguai e Venezuela (RAMOS - CASTANHEDA, 2017). Há relatos de dengue em vários países da América do Sul e América Central. Argentina, Brasil, Colômbia, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Guiana Francesa, México, Peru, Porto Rico e Venezuela são países nos quais a infecção para os 4 sorotipos já foi estabelecida. Chile e Uruguai eram os únicos países sem transmissão autóctone de qualquer sorotipo e, desde a confirmação do primeiro caso em fevereiro de 2016, o Uruguai registrou 570 casos suspeitos da doença e 17 confirmados, com maioria ocorrida nas cidades de Montevideú, Vanelones e Salto, todos confirmados com o sorotipo DENV-1 (GYAWALI.; BRADBURY; TAYLOR-ROBINSON, 2016; WHO, 2016).

Brasil, Colômbia e México atualmente contribuem com 70% dos casos de dengue nas Américas onde os quatro sorotipos do DENV estão circulando (OPAS, 2017). De acordo com

a OMS, a situação epidemiológica da dengue nas Américas continua extremamente complexa e instável. Entre os anos 2000 e 2014, foram registrados 14,2 milhões de casos de dengue, com 7.000 mortes. Segundo o 21º Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), um total de 1.206.172 casos foram registrados em todo o continente, com uma incidência média de 198 casos/100 mil habitantes (OPAS, 2015). Segundo a OMS, o ano de 2016 foi caracterizado por surtos mundiais. A região das Américas reportou mais de 2,38 milhões de casos, onde somente o Brasil contribuiu com aproximadamente 1,5 milhões de casos, número três vezes maior do que em 2014, ano que foram reduzidos a 50% do número de casos severos da doença (OPAS, 2017). De acordo com o boletim epidemiológico da OMS até a 11ª semana epidemiológica de 2017, 50.172 já haviam sido reportados, apresentando redução comparada aos anos anteriores (WHO, 2017).

1.2.3 Dengue no Brasil

A dengue chegou ao Brasil em meados do século XIX e os primeiros surtos da doença datam de 1846 a 1853 em São Paulo e no Rio de Janeiro, mas, provavelmente, também ocorreram nas regiões Sul, Nordeste e em outras cidades do Sudeste. Os primeiros dados da literatura que fazem referência à doença datam de 1916 (MEIRA, 1916 apud BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Em 1917, ocorreu um surto de dengue na cidade de Curitiba e no estado do Rio Grande do Sul, assim como em 1922 e 1923 na cidade de Niterói no estado Rio de Janeiro (FIGUEIREDO, 2000). No século XXI, o Brasil tornou-se o país com o maior número de casos reportados no mundo, com mais de 3 milhões de casos registrados de 2000 a 2005, representando 78% dos casos registrados nas Américas e 61% dos reportados pela OMS (TEIXEIRA et al., 2009).

A erradicação do *A.aegypti*, alcançada em 1955, após uma intensa campanha iniciada em 1940, determinou a ausência de registros de casos de dengue no Brasil até a década de 80. Porém, a re-infestação do *A. aegypti* no país em 1977 e a expansão da atividade dos DENV nas Américas resultaram na reintrodução dos vírus no país após um longo período sem registro de casos da doença (OSANAI et al., 1983; SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986).

Em 1981, na cidade de Boa Vista em Roraima, ocorreu um surto de dengue onde foram isoladas as primeiras amostras caracterizadas como sorotipos DENV-1 e DENV-4 e um

total de 7.000 casos da doença foram notificados (OSANAI et al., 1983). Após um período de cinco anos sem haver notificação da infecção no país, em abril de 1986 foi registrada epidemia de DENV-1 no município de Nova Iguaçu, que se espalhou para vários municípios do estado do Rio de Janeiro (RJ). Neste mesmo ano, o intenso movimento de pessoas permitiu a rápida disseminação do vírus para outros estados do país (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986; FIGUEIREDO, 1996).

A detecção do DENV-2 em 1990, na cidade de Niterói, na região metropolitana do RJ resultou em uma grande epidemia no período de 1990-1991 com a co-circulação de DENV-1 e DENV-2 e a notificação dos primeiros casos de dengue hemorrágico (FHD) (NOGUEIRA et al., 1990). Em dezembro de 2000, o DENV-3 foi detectado pela primeira vez no município de Nova Iguaçu/RJ (NOGUEIRA; MIAGOSTOVICH; SCHATZMAYR, 2000), sendo este responsável pela maior e mais grave epidemia de dengue no país em 2002 e predominante na maior parte dos estados do Brasil entre 2002 e 2006 (SVS, 2010).

Em 2007, foram notificados 67% do total de casos de 2002, mas a taxa de letalidade foi duas vezes maior, revelando uma maior gravidade na ocorrência da doença pela re-emergência do DENV-2 (SVS, 2007). A epidemia de 2008 com 806.036 casos notificados foi considerada a mais grave epidemia até então, onde foram confirmados 4.195 casos de FHD e 478 óbitos (SVS, 2009). No ano de 2009, a re-emergência do DENV-1 alertou para a possibilidade de uma nova epidemia tendo em vista a baixa circulação deste sorotipo desde o início da década e, naquele ano, foram notificados 529.237 casos suspeitos, com 2.271 casos de FDH e 298 óbitos (SVS, 2009). As atividades de monitoramento da circulação dos DENV em 2010 no país demonstram uma maior proporção de isolamento do DENV-1, sendo este sorotipo associado ao aumento da transmissão da doença em algumas regiões (SVS, 2010).

O risco da introdução do DENV-4 no país era eminente, uma vez que este sorotipo circulava em países vizinhos como a Venezuela e Colômbia (GUZMAN; KOURI, 2002) e em julho de 2010, um caso de dengue pelo DENV-4 foi detectado em uma unidade sentinela de monitoramento viral de Roraima (SVS, 2010). Em 2011, este sorotipo se disseminou para os demais estados da federação e em 2012, o DENV-4 se tornou o sorotipo predominante (59,3%), seguido pelo DENV-1 (36,4%) quando foram notificados um total de 286.011 casos até abril de 2012 (SVS, 2012). Nos anos de 2013 e 2014, o número de casos notificados foi de 1.452.489 e 589.197, respectivamente, com concentração na região Sudeste totalizando 674 óbitos em 2013 e 475 em 2014 (PORTAL SAUDE, 2017a; 2017b).

O DENV-4 foi o sorotipo predominante em 2013 no Rio de Janeiro, embora todos os sorotipos circularam no país. Em 2014, o DENV-1 foi o sorotipo predominante (82%), seguido do DENV-4 (16%), DENV-2 (1,5%) e DENV-3 (0,5%) no Brasil.

De acordo com o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em 2015 foram registrados no país, 1.688.688 casos prováveis da doença. As proporções dos sorotipos virais até a 48ª Semana Epidemiológica (48° SE), de 2015 foram assim distribuídas: DENV-1 (93,7%), seguido de DENV-4 (5,2%), DENV-2 (0,7%) e DENV-3 (0,4%). Em 2016, no período da 1° SE a 52° SE, o país registrou 1.500.535 casos prováveis da doença. Um total de 86,3% pertencia ao sorotipo viral DENV-1, mantendo-se o predomínio do ano anterior. Em 2017, até a divulgação do 15ª SE (período de 1/1/2017 a 15/04/2017), foram registrados 113.181 casos prováveis de dengue no país com uma incidência de 55,0 casos/100 mil habitantes. Neste período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (37.281 casos) 32,9% em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (31.142 casos; 27,5%), Centro-Oeste (25.065 casos; 22,1%), Norte (15.823 casos; 14,0%) e Sul (4.070 casos; 3,6%). As regiões Centro-Oeste e Norte apresentaram as maiores taxas de incidência: 160,0 casos/100 mil habitantes e 89,4 casos/100 mil habitantes, respectivamente (SVS, 2017).

1.3 Transmissão da dengue

A principal forma de transmissão da dengue se dá através da picada do mosquito infectado cuja capacidade de transmitir a doença persiste por toda a sua existência, geralmente por um período de 3 a 4 semanas. Os principais vetores da dengue são os mosquitos do gênero *Aedes*. O *A. aegypti*, é o vetor mais comum da doença, com distribuição ampla em regiões intertropicais do mundo (POZZETTO; MEMMI; GARRAUD, 2015). É altamente urbano e tem preferência por alimentar-se de sangue humano, realizando a postura de ovos em ambientes artificiais criados por humanos (GUBLER, 2011). No Brasil, o *A. aegypti* tem sido responsável pela transmissão da dengue desde os anos 80 (FARES et al., 2015).

O *A. albopictus*, possui morfologia e capacidade proliferativa semelhante ao *A. aegypti*, sendo também responsável por alguns surtos da doença em países do continente asiático (GUZMAN; KOURI, 2002; LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010). Estudos demonstraram que o *A. albopictus* pode ser infectado com sucesso no laboratório com todos

os sorotipos da dengue (GUO et al., 2013). Atualmente, a colonização de *A. albopictus* foi confirmada em 34 países, sendo o principal vetor do DENV na Ásia tropical rural e semi-urbana e causador de pequenas epidemias na Europa (KRAEMER et al., 2015; BEZERRA, et al., 2016).

O *A. albopictus* foi introduzido no Brasil em 1986, estando presente em todos os estados, entretanto não é considerado o vetor da dengue no país e não tem sido associado com as epidemias da doença (FARES et al., 2015). Os últimos dados de distribuição do *A. aegypti* no Brasil, são de 2006, e do *A. albopictus* datam de 2002 (VALLE, 2015).

Além da transmissão pelo mosquito, outras formas de transmissão da doença já foram descritas, entre elas, a infecção por transfusão sanguínea, transplante de tecidos e órgãos e através do leite materno (LINNEN et al., 2008; MOHAMMED et al., 2008; TEO; NG; LAM, 2009; BARTHEL et al., 2013; SABINO et al., 2016; LEVI, 2016).

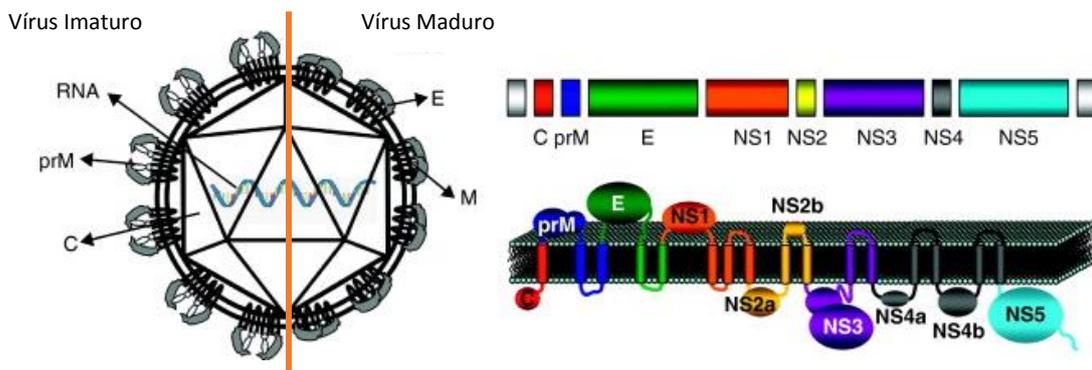
A transmissão da dengue associada à transfusão sanguínea pode ser mais comum do que se conhece, uma vez que, a elevada proporção de infecções assintomáticas (53% a 87%) e a elevada incidência de ocorrência da doença, especialmente durante os surtos, sugere que um número substancial de doadores pode possuir o vírus no momento da doação sanguínea (DIAS et al., 2012). O reconhecimento do DENV como um patógeno transmissível por transfusão sanguínea ocorreu somente em 2008 (POZZETTO; MEMMI; GARRAUD, 2015). Neste contexto, órgãos reguladores como o *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI), *Food and Drug Administration* (FDA) e *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), avaliam, com base em estudos prospectivos e evidências, a necessidade ou não da implementação da triagem de doadores nos Estados Unidos e em todo o mundo quanto aos DENV (LANTERI; BUSCH, 2012).

A transmissão do vírus via transplante de órgãos, também foi descrita e merece atenção, uma vez que, até o presente momento, não há recomendação para triagem desse vírus antes do transplante (GUPTA et al., 2016). Infecções acidentais por picadas de agulha já foram descritas, porém, trata-se da forma mais rara de infecção com poucos relatos na literatura. Em geral, a quantidade necessária de vírus para infecção natural é de 10 a 20 cópias e se, comparada ao vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV) seriam necessárias quantidades superiores a 500 cópias para contrair a doença por esta via (WIWANITKIT, 2010; WAGNER et al., 2004).

1.4 O Vírus da dengue

Os DENV pertencem ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae* possuindo quatro sorotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). São vírus esféricos com 40 a 60 nm de diâmetro, envelopados e de simetria icosaédrica. O genoma é de RNA de fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 11.000 pares de bases que codificam 10 proteínas virais: 3 (três) proteínas estruturais: capsídeo (C), precursor da membrana M (prM) e glicoproteína do envelope (E) e 7 (sete) proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura, genoma, proteínas estruturais do capsídeo (C), precursora da membrana M (prM), glicoproteína do envelope (E) e proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 do vírus da dengue.



Fonte: (Adaptado de HOTTZ et al., 2011)

A proteína do envelope (E) é responsável pelo reconhecimento específico das células do hospedeiro e pelo desenvolvimento de anticorpos neutralizantes protetores. As proteínas não estruturais (NS) têm associação com a patogênese das formas severas da doença. A proteína NS1 é secretada a partir de células do hospedeiro infectadas e circula no soro de pacientes. Ela pode ativar a resposta imune protetora contra a dengue e por isso também é candidata em potencial para a construção de uma vacina. As regiões não codificantes 5' e 3' são importantes na regulação e na replicação viral (LINDENBACH; RICE, 2001;

POZZETTO; MEMMI; GARRAUD, 2015; LIU; LIU; GONG, 2016; KHETARPAL; KHANNA, 2016).

Um quinto sorotipo da doença (DENV-5) foi identificado por Vasilakis e colaboradores em 2013 em amostras coletadas durante um surto na Malásia em 2007. Acredita-se que o DENV-5 circularia fundamentalmente em macacos, e por esse motivo poderia comportar-se como uma zoonose (RAMÍREZ-JARAMILLO, 2014). Segundo Mustafa e colaboradores, (2015), a interação entre cepas silvestres e populações humanas não é bem conhecida e a existência de pouca ou nenhuma barreira adaptativa à dengue silvestre em humanos, torna a re-emergência uma perspectiva realista.

1.5 Controle do vetor e prevenção da doença

O combate ao *A. aegypti* foi realizado no Brasil, de forma sistematizada, a partir do século XX. O Brasil participou da campanha de erradicação continental do *A. aegypti* e obteve êxito na primeira eliminação desse vetor em 1955. Considera-se que o combate à Febre Amarela também teve um impacto na transmissão da Dengue na primeira metade do século XX, que não existia no Brasil como problema relevante de saúde pública (BRAGA; VALLE, 2007).

Um quantitativo superior à metade da população mundial vive em áreas infestadas de mosquitos, assim, é uma realidade, o risco potencial de ocorrência de epidemias de doenças transmitidas por estes vetores, tais como Dengue, Chikungunya, Zika, Febre Amarela e outras doenças.

Muito se discute sobre a mais efetiva forma de prevenção e controle, entretanto, a doença existe em grandes cidades tropicais onde o mosquito vetor vive em contato íntimo com o hospedeiro humano, muitas dessas com elevado número populacional (15 a 20 milhões de pessoas). Segundo Gubler (2011), a melhor medida de combate seria a integração de medidas que contemplem e combinem o controle de mosquitos, o desenvolvimento de vacinas e o melhor tratamento clínico dos pacientes, incluindo o uso de antivirais e anticorpos terapêuticos. Novas ferramentas de controle do vetor estão surgindo. Progressos estão sendo feitos em todas as frentes e incluem novos inseticidas residuais, materiais tratados com inseticidas, novos controles biológicos (*Copepods e Wolbachia*) e novos métodos de controle

genético (liberação de machos estéreis e mosquitos geneticamente resistentes), além de vacinas e drogas antivirais necessárias ao controle da dengue (TAHIR et al., 2015).

Existe grande expectativa sobre o uso das vacinas como principal forma de controle da doença. De acordo com a OMS a primeira vacina contra dengue, Dengvaxia (CYD-TVD) produzida pela SANOFI® foi registrada no México em dezembro de 2015 e aprovada no Brasil, no mesmo ano pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Trata-se de uma vacina recombinante e atenuada, tetravalente, composta de vírus quimérico da febre amarela e sorotipos da dengue 1, 2, 3 e 4 produzidos em células VERO. Cada um dos quatro sorotipos contidos na vacina foi obtido separadamente por tecnologia de DNA recombinante, combinando o vírus atenuado da vacina de febre amarela (17D204) e os quatro sorotipos dos vírus selvagens da dengue. A vacina desenvolvida para os sorotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus da dengue possui esquema de aplicação de 3 doses com intervalos de 6 meses cada (0, 6 e 12 meses), pode ser aplicada em adultos, adolescentes e crianças dos 9 aos 45 anos de idade que vivem em áreas endêmicas. Em abril de 2016, a OMS recomendou o uso da vacina, em áreas com alta endemicidade da doença. Estudos clínicos da vacina demonstraram aumento do risco de hospitalização entre as crianças vacinadas abaixo de 9 anos de idade (WHO, 2016).

A eficácia global da vacina foi de 67 a 80%, com redução de 35 a 50% para o sorotipo DENV-2 e sendo inferior em indivíduos sem exposição anterior ao vírus, quando comparada aos indivíduos soropositivos. A duração da proteção e a necessidade de reforços ainda é incerta, além disso, o novo quinto sorotipo, DENV-5, não foi incluído (WHO, 2016). Existem até o presente momento, 5 candidatos adicionais a vacinas sob avaliação incluindo outras vacinas com vírus atenuado, bem como, com subunidades de DNA e vírus inativados purificados além de outras abordagens como vacinas baseadas em vetores virais e VLP (*virus like particles*) que estão sob avaliação em estudos pré-clínicos (WHO, 2016).

1.6 Manifestações clínicas e resposta imune

A dengue é uma doença infecciosa, febril e aguda cujo período de incubação pode variar de 3 a 15 dias com uma média de 4 a 7 dias (DIAS et al., 2010). A doença possui espectro que varia desde formas clinicamente assintomáticas, até quadros graves de hemorragia e choque, podendo evoluir para o óbito. As formas assintomáticas correspondem aproximadamente a três quartos das infecções de dengue (BHATT, 2013). O tratamento é

meramente sintomático, não existindo tratamento antiviral específico para a dengue, limitando-se ao uso de analgésicos ou reposição de líquidos (WHO, 2016).

Quanto a forma de classificação, durante muitas décadas, a dengue foi apresentada como dengue clássica (DC), como febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) (WHO, 1997). Contudo, após estudo internacional foi consenso entre clínicos e epidemiologistas e sugerida pela OMS em 2009, uma nova classificação que definiu a dengue como: dengue com e sem sinais de alerta e dengue grave, nos casos de extravasamento de plasma, hemorragia severa e comprometimento de órgãos. A inclusão dos sinais de alerta auxiliou no tratamento precoce da doença, possibilitando melhor avaliação do paciente (WHO, 2009a).

A partir de 2014, o Brasil passou a utilizar a nova classificação de dengue cuja abordagem enfatiza tratar-se de uma doença única, dinâmica e sistêmica. A doença pode evoluir para a remissão dos sintomas, ou agravar-se exigindo constante reavaliação e observação, para que ocorram intervenções em momento oportuno para que se evite a ocorrência de óbitos (BRASIL, 2016).

Após período de incubação, a dengue pode apresentar-se oligossintomática, com poucas manifestações clínicas, como: febre, mialgia, dor de cabeça (2 a 3 dias) e exantema maculopapular pruriginoso ou não, associados à febre e dores, por 48 a 72 horas. A viremia atinge seu pico logo após o aparecimento dos primeiros sintomas, muitas vezes antes mesmo do paciente apresentar-se doente o suficiente para recorrer a tratamento médico. Vírus circulantes permanecem, no entanto, detectáveis geralmente até o quinto dia de doença, coincidindo com o período em que os níveis de anticorpos começam a elevar-se (VORNDAM; KUNO, 1997; MORELI; COSTA, 2013).

Na forma clássica da dengue, os pacientes apresentam febre, de início súbito, que pode alcançar temperaturas elevadas (40°C) na maioria dos casos por 3 dias, podendo permanecer até o 6º ao 8º dia, acompanhados ou não de dores no corpo, artralgia e mialgia na região lombar e membros inferiores. Cefaleia de localização retro orbital é a principal queixa. Náuseas, distúrbios do sistema nervoso, prostração e anorexia podem durar 1 semana. Inicialmente ocorre erupção cutânea, com eritema generalizado e fugaz. Em sua maioria, crianças apresentam uma síndrome febril com sinais e sintomas inespecíficos. Febre inespecífica de curta duração, acompanhada de faringite, rinite e tosse branda, é mais frequente em lactentes e pré-escolares. Manifestações hemorrágicas podem ocorrer em 5% a 30% dos casos (XAVIER et al., 2014).

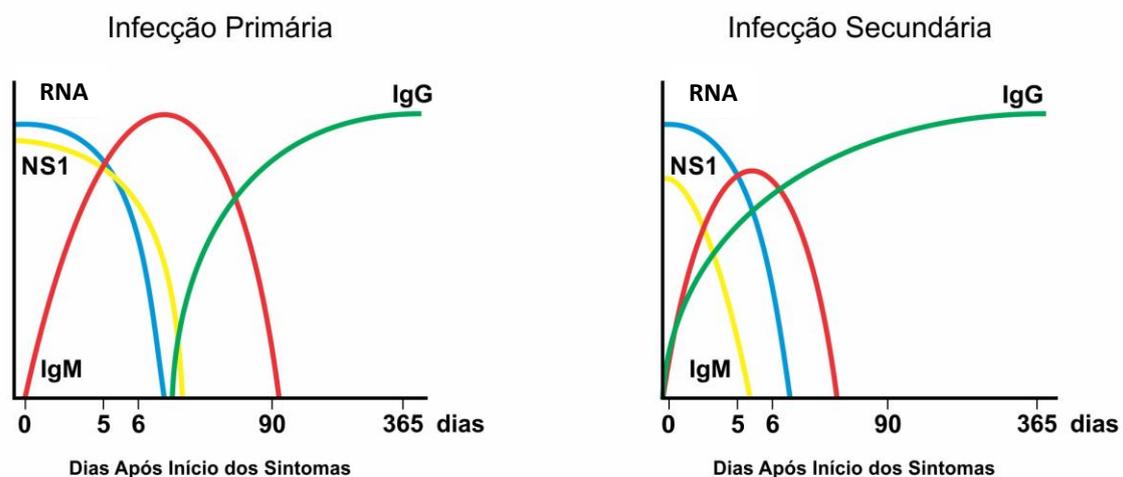
Na maioria dos casos (90%) a doença evolui de forma não complicada, entretanto uma pequena proporção (5 a 10%) evolui para a forma severa, caracterizada por hemorragia e choque podendo levar a morte se não tratada de maneira apropriada (WHO, 2009a; GUZMAN; HARRIS, 2015).

A resposta imune à infecção consiste na produção das imunoglobulinas dos tipos M (IgM), G (IgG) e A (IgA) que em sua maioria são específicas para proteínas do envelope do vírus (PEELING; SMITH; BOSSUYT, 2010).

O isotipo dominante de imunoglobulina em uma infecção primária é a IgM. Uma pequena porcentagem dos pacientes apresenta níveis detectáveis de IgM já no primeiro dia da doença (8%). Segundo a OPAS, 80% de todos os casos de dengue têm anticorpos IgM detectáveis no quinto dia e 93 - 99% dos casos têm IgM detectável entre o sexto e o décimo dias. Os níveis de IgM aumentam rapidamente e atingem seu pico por volta de duas semanas, permanecendo detectáveis por 2 a 3 meses, o que faz desses anticorpos indicadores de infecções recentes (GUBLER; SATHER, 1988; NOGUEIRA et al., 1992; GUZMAN et al., 2010).

Anticorpos IgG começam a aparecer como resposta primária, alguns dias depois dos anticorpos IgM, sendo detectáveis a partir do quinto dia de doença (Figura 3).

Figura 3 - Cinética dos antígenos (NS1) e anticorpos (IgM e IgG) em infecções primárias e secundárias pelo vírus da dengue.



Fonte: (Adaptado de CDC, 2017)

Os títulos de IgG aumentam lentamente a partir da primeira semana de infecção e permanecem detectáveis por toda a vida. Indivíduos com imunidade prévia ao DENV ou mesmo a outro *Flavivirus* desenvolvem uma resposta secundária caracterizada pelo rápido aumento no título de IgG quase que imediatamente após o início dos sintomas e pelo alto grau de reação cruzada, em relação a outros *Flavivirus* (INNIS et al., 1989, ZHANG et al., 2015).

Os níveis de IgM na resposta secundária são consideravelmente mais baixos do que na resposta primária como mostrado na Figura 3 (WHO, 1997). A relação entre os títulos de IgM e IgG e a especificidade dos anticorpos podem ser utilizadas como critério na caracterização de respostas primárias e secundárias. Além disso, anticorpos IgM e IgG podem ser específicos para um determinado sorotipo em algumas infecções primárias, o que geralmente não ocorre em infecções secundárias (MIAGOSTOVICH et al., 1999; HALSTED, 2007). O grau de reação cruzada apresentada por esses anticorpos é variável e é dependente do antígeno e do teste diagnóstico utilizado (VORNDAM; KUNO, 1997).

A infecção secundária com outros sorotipos da dengue aumenta o risco de desenvolvimento das formas mais severas da doença (GUZMAN; HARRIS, 2015). A resposta imunológica varia nas infecções primárias e secundárias, de pessoa para pessoa; assim sendo, várias técnicas são frequentemente usadas em combinação para confirmação de um caso de dengue (BALMASEDA et al., 2003).

A detecção de anticorpos IgA presentes na saliva de indivíduos com infecção pela dengue já foi avaliada, entretanto não são marcadores frequentemente utilizados no diagnóstico da doença (ANDREIS, 2016).

A infecção em humanos por um sorotipo confere imunidade permanente contra reinfecções subsequentes pelo mesmo sorotipo, mas apenas proteção parcial e temporária contra os outros sorotipos (MARTINEZ, 2008). Os quatro sorotipos são geneticamente diversos e compartilham identidade limitada, cerca de 60% a 70% e dentro de cada sorotipo a variação genotípica pode determinar o potencial de virulência da cepa (KING; ANDERSON; MARSHALL, 2002; GUZMAN; HARRIS, 2015). O tratamento da dengue é baseado principalmente na sintomatologia. Nenhuma droga antiviral mostrou efeito contra o vírus (POZZETTO; MEMMI; GARRAUD, 2015; KAPTEIN; NEYTS, 2016).

Em 2015, pelo menos 9 arboviroses que causam doença em humanos circularam no Brasil. O clima tropical torna o país susceptível a co-circulação de diferentes arboviroses como a Dengue, Chikungunya e mais recentemente o vírus Zika registrado em vários estados do país. A introdução dessas arboviroses está diretamente relacionada a movimentação de pessoas, em particular associada ao turismo e imigração (FRACP et al., 2013). Dengue,

Chikungunya e Zika foram introduzidas nas áreas urbanas e seu vetor (*A. aegypti*) altamente antropofílico permitiu a rápida adaptação ao nosso ambiente, resultando a infecção humanos (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). Tais infecções são clinicamente similares e oligossintomáticas e o diagnóstico diferencial pode ser dificultado principalmente quando o acesso a laboratórios de referência para realização do diagnóstico é restrito, somando-se as reações filogenéticas cruzadas que podem ocorrer nos testes sorológicos, especialmente em áreas endêmicas como em algumas cidades do Brasil onde a dengue pode ser confundida com outras doenças como a Febre Amarela, Mayaro, Malária ou Febre de Oropouche (MORELI; COSTA, 2013; MOTA, 2016). Testes diagnósticos sensíveis e específicos permitiriam cuidados apropriados aos pacientes, geração de dados epidemiológicos fidedignos e a implementação de políticas públicas de saúde eficientes (FARES et al., 2015).

1.7 Diagnóstico laboratorial da dengue

O diagnóstico da doença quando baseado exclusivamente em sintomas clínicos pode ser comprometido pela presença de infecções subclínicas ou assintomáticas, que variam de 0,7% a 87% dependendo da população estudada (OOI; GOH; GUBLER, 2006; BHATT et al., 2013, CHATCHEN; SABCHAREON; SIRIVICHAYAKUL, 2017). Estima-se que para cada 1 caso sintomático, possam existir 6 a 7 assintomáticos (CHEN; WILSON, 2005). Além disso, os sintomas das infecções por DENV podem ser confundidos com os de outras doenças, tanto na fase febril, quanto na fase crítica, dentre elas, as doenças febris acompanhadas ou não de exantema como as causadas pelos vírus *Epstein-Barr*, vírus do herpes tipo 6, parvovírus B19, na rubéola, no sarampo, nas infecções bacterianas (OLIVEIRA et al., 2008), além de outras que apresentam sazonalidade semelhante a dengue, como a leptospirose (DIRCIO et al., 2012).

A infecção pelo vírus da Chikungunya embora transmitida pelo mesmo vetor da dengue e da febre amarela urbana, costuma ser sintomática em mais de 90% dos indivíduos, diferindo da dengue neste aspecto, mas com sintomas semelhantes, fazendo-se necessário o diagnóstico laboratorial diferencial (BRASIL, 2015b; VALE, 2015).

Os sintomas da doença causada pelo vírus da Zika são semelhantes aos de dengue, e de outras infecções por arbovírus, causam febre, erupções cutâneas, conjuntivite, dores nos músculos e nas articulações, mal-estar ou dor de cabeça (WHO, 2016). Além disso a

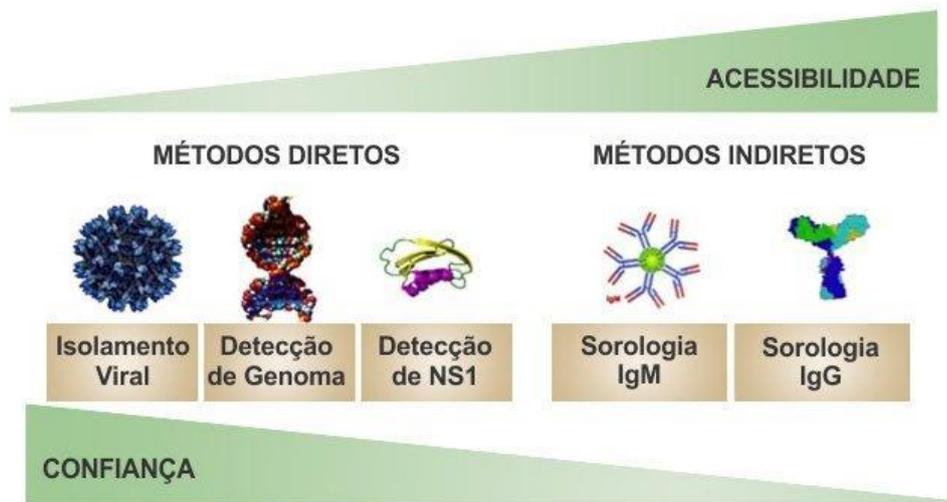
reatividade cruzada entre esses *Flavivirus* é elevada e representa um desafio para a identificação precisa do agente infeccioso.

A reatividade cruzada no ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido demonstrada em testes comercialmente disponíveis, utilizados no diagnóstico da infecção pelo vírus da zika. Esses achados podem afetar a interpretação de critérios atualmente adotados como padrão para o diagnóstico de dengue em regiões endêmicas (FELIX et al., 2017). Até o momento, os testes empregados no diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue podem ser divididos em virológicos, moleculares, testes para detecção de antígenos e testes sorológicos para detecção de anticorpos, cada um com aplicabilidade associada às diferentes fases da doença (CHATCHEN et al., 2017).

Durante a fase inicial da dengue, o isolamento do DENV, a detecção de ácidos nucleicos ou a detecção de antígenos podem ser usados para diagnosticar a infecção. Após o início da doença, o vírus pode ser detectado no soro, plasma, células circulantes no sangue e em outros tecidos de 0 a 7 dias após o início dos sintomas. Os métodos de isolamento viral permanecem como padrão ouro para o diagnóstico definitivo. No final da fase aguda, a sorologia é o método de escolha para o diagnóstico da infecção e os testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e IgG, são os mais utilizados (WHO, 2009b).

Segundo Peeling e colaboradores (2010), as características dos testes ideais para o diagnóstico da doença dependem da finalidade de uso. Os testes possuem vantagens e desvantagens, bem como diferentes níveis de sensibilidade e especificidade (SHAMALA, 2015; ZHANG et al., 2014). Métodos diretos de diagnóstico são utilizados para confirmação das infecções agudas pelo DENV. Neste caso, incluem-se as metodologias de isolamento viral ou ainda a identificação do genoma específico do vírus pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) em tempo real, a partir do soro ou plasma, durante a fase febril aguda (MUNGRUE, 2014). Estas metodologias são consideradas as mais específicas por detectarem o vírus ou sua proteína (NS1), porém são geralmente as menos acessíveis quando comparados aos métodos indiretos que detectam anticorpos anti-DENV IgM e anti-DENV IgG como mostrado na Figura 4 (PEELING, 2010; LIMA, 2014).

Figura 4 - Confiança e acessibilidade aos métodos de diagnóstico diretos e indiretos para confirmação de casos de infecções pelo vírus da dengue.



Fonte: (Adaptado de PEELING et al., 2010)

1.7.1 Isolamento viral

Trata-se da evidência direta da infecção viral e por esse motivo é considerado “padrão ouro”, embora venha sendo gradualmente substituído pela RT-PCR. O isolamento viral aplica-se ao diagnóstico na fase aguda da doença, quando os anticorpos ainda não atingiram níveis detectáveis. Pode ser realizado em cultura de células de mosquito (*A. albopictus*) o que representou um grande avanço no diagnóstico da dengue, sendo o clone C6/36 o mais utilizado, pois demonstrou ser altamente sensível à infecção pelos DENV, além de ser de fácil manutenção, mesmo à temperatura ambiente (IGARASHI, 1978). A presença viral pode ser detectada pelo efeito citopático (ECP) na monocamada celular ou pela técnica de imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos (GUBLER et al., 1984).

1.7.2 RT-PCR

O DENV pode ser detectado no sangue, soro ou plasma de pacientes durante os primeiros 5 dias de aparecimento dos sintomas, em geral. Atualmente, vários testes de PCR são empregados para detectar o genoma viral, onde o vírus está inativo ou associado a anticorpos (LIMA, 2014). Além disso, o vírus pode ser isolado e sequenciado para caracterização adicional.

Os ensaios de RT-PCR foram desenvolvidos e automatizados tornando-se uma ferramenta para detectar o vírus no início da doença e um resultado de PCR positivo é uma prova definitiva da infecção atual. Atualmente os ensaios possuem sensibilidade de 80 a 90% e especificidade em torno de 95% (CDC, 2017) e além disso podem determinar o sorotipo infectante. Uma amostra adequada para realização do RT-PCR necessita ser coletada preferencialmente durante os cinco primeiros dias de sintomas, sendo possível a realização do teste até o sétimo dia de doença. Períodos superiores apresentam chance reduzida de detecção do genoma viral por esta metodologia.

O diagnóstico molecular é fundamental para a identificação dos sorotipos virais circulantes e detecção precoce do surgimento de um novo sorotipo, contribuindo de maneira importante para o sistema de vigilância epidemiológica da doença. Vários protocolos para a detecção do DENV têm sido propostos desde o desenvolvimento desta metodologia (DROSTEN et al., 2002; JOHNSON; RUSSELL; LANCIOTTI, 2005). Além disso, o teste também é direcionado para identificação diagnóstica do sorotipo viral em casos graves de dengue com complicação neurológica ou nos quadros de infecção crônica com suspeita de viremia, e de casos de diagnóstico diferencial *post mortem* (RIVERA et al., 2014).

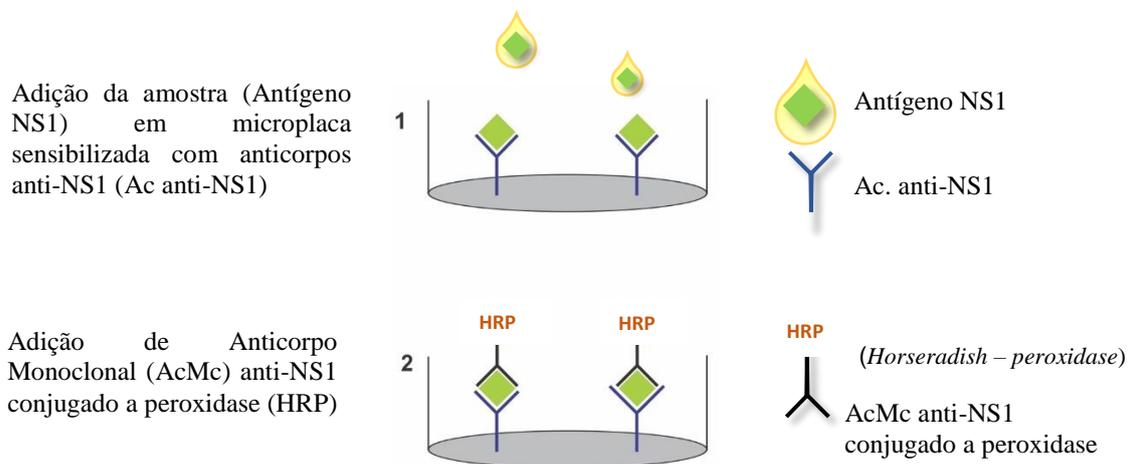
1.7.3 Detecção do antígeno NS1

1.7.3.1 ELISA

O antígeno NS1 está presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia do aparecimento dos sintomas e permanece detectável até o quinto ou sexto dia. Como essa

proteína aparece no início da infecção, antes do surgimento dos primeiros anticorpos, seu uso como uma ferramenta de detecção precoce da dengue foi investigado (ALCON et al., 2002; XU et al., 2006; KASSIM et al., 2011; ZHANG et al., 2014). Antígenos NS1 da dengue quando presentes no soro se ligam a anticorpos anti-NS1 aderidos a microplaca de poliestireno, o soro residual é removido pela lavagem, seguida da adição de anticorpo monoclonal anti-NS1 conjugado a enzima peroxidase (HRP - *Horseradish Peroxidase*). Na Figura 5 está representado o ensaio para detecção qualitativa do antígeno pelo ELISA.

Figura 5 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção qualitativa de antígeno NS1.



Fonte: (LSH, 2015)

1.7.4 Detecção de anticorpos

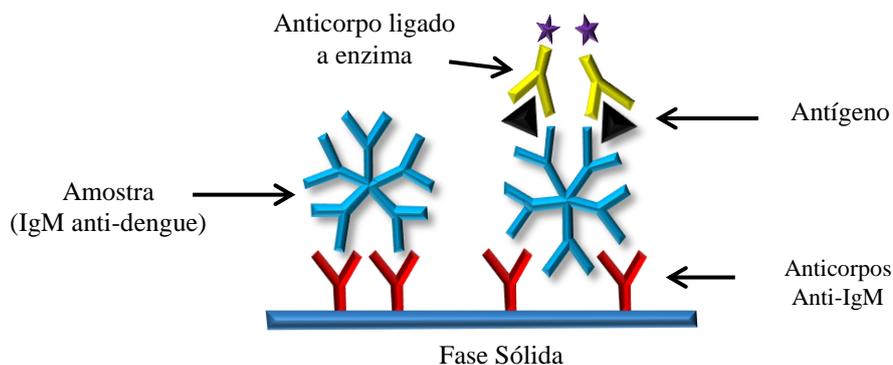
Os testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e IgG são mais comumente utilizados no diagnóstico da doença devido à facilidade de uso quando comparados às técnicas de cultura de células ou de detecção de RNA viral (ZHANG et al., 2015). Tais métodos têm permitido confirmar o maior número de casos, pois detectam anticorpos tanto na fase aguda quanto na fase de convalescência da doença. Dentre eles destacam-se: o MAC-ELISA para detecção de anticorpos IgM, ELISA para detecção de anticorpos IgG e os Testes Rápidos para

detecção de anticorpos IgM e IgG (VALE, 2015; CHATCHEN; SABCHAREON; SIRIVIHAYAKUL, 2017).

1.7.4.1 MAC-ELISA - IgM

Dentre os testes sorológicos, o ELISA de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA), tem sido o método de eleição para o diagnóstico das infecções pelo DENV (NOGUEIRA et al., 1993). É um método rápido, fácil de ser executado e tem se mostrado extremamente útil, tanto para o diagnóstico individual da dengue como para estudos epidemiológicos (Figura 6). O teste baseia-se na detecção de anticorpos IgM específicos da dengue no soro, capturados por anticorpos anti-IgM aderidos a fase sólida (VORNDAM; KUNO, 1997; GUZMÁN; KOURI, 2004).

Figura 6 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de anticorpos IgM anti-dengue (MAC-ELISA).

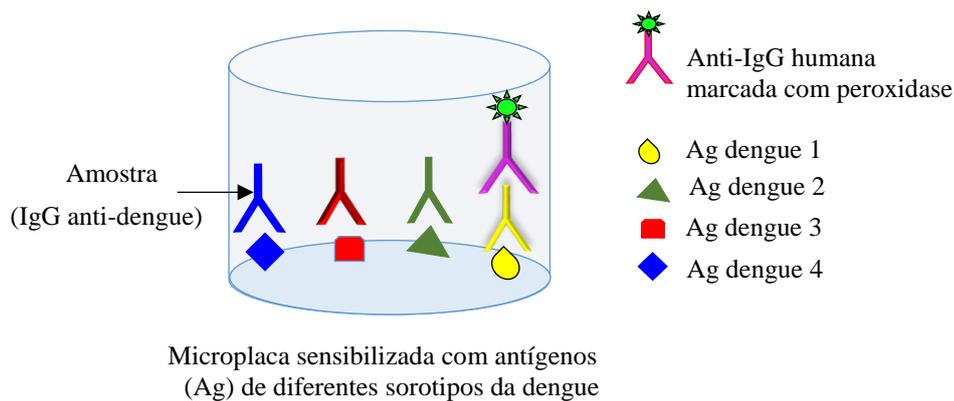


Fonte: (Adaptado de Nogueira et al., 1993)

1.7.4.2 ELISA IgG

O ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG é utilizado na caracterização da resposta imune de dengue, por ser uma metodologia rápida e de fácil execução (MIAGOSTOVICH et al., 1999), e uma alternativa ao teste de inibição da hemaglutinação (IH) descrito por Clarke & Casals (1958) como mostra a Figura 7. Valores da razão IgG/IgM no ELISA são utilizados como ponto de corte para determinação da infecção secundária nos primeiros dias de início dos sintomas dengue nas infecções recentes (GUZMÁN; KOURI, 2004; CUCUNAWANGSIH; LUGITO; KURNIAWAN, 2015).

Figura 7 - Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-dengue.



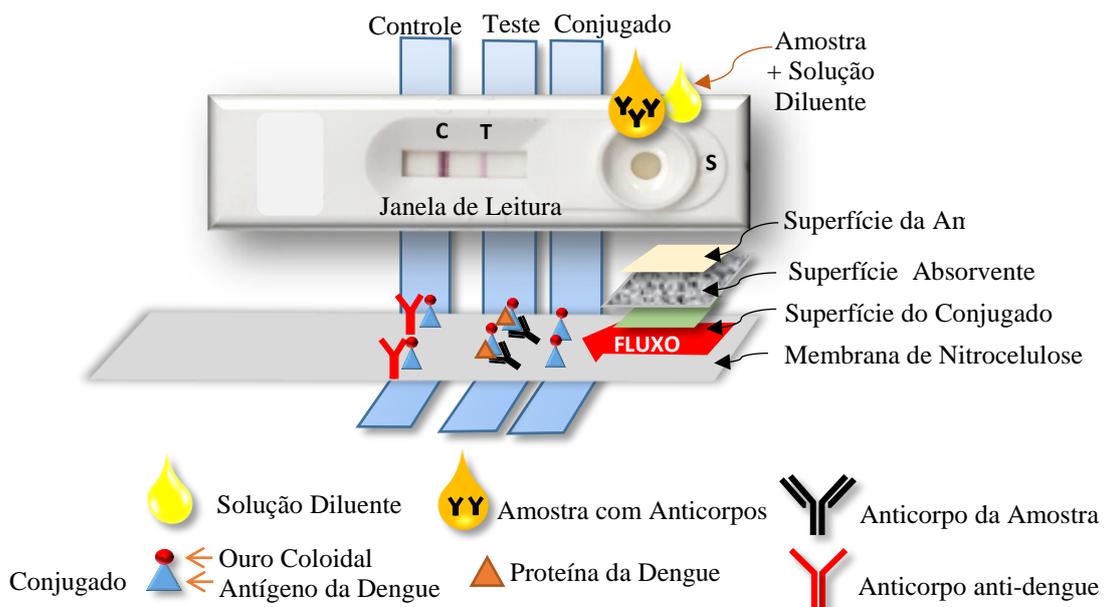
Fonte: (LSH, 2015)

Apesar da utilidade dos testes sorológicos para detecção dos anticorpos IgM e IgG anti-dengue e os avanços que eles proporcionaram na área de diagnóstico, uma importante limitação é a não detecção da doença em sua fase inicial. Com o objetivo de atender a esta necessidade, testes ELISA para captura da proteína NS1 foram desenvolvidos com sucesso (BLACKSELL et al., 2007; LAPPHRA et al., 2008; ZAINAH et al., 2009). Neste contexto, foram desenvolvidos testes para facilitar e agilizar o diagnóstico nos locais de atendimento, e diferentes formatos foram elaborados, incluindo o teste de aglutinação de partículas e o teste imunocromatográfico (teste rápido).

1.7.4.3 Teste rápido

O teste rápido (imunocromatográfico) baseia-se na sensibilização de antígenos/anticorpos conjugados ao ouro coloidal que capturam imunoglobulinas e proteínas específicas do DENV presentes no soro, plasma ou sangue do paciente, formando um complexo antígeno-anticorpo que migra por capilaridade ao longo da membrana de nitrocelulose (Figura 8).

Figura 8 - Representação esquemática de teste imunocromatográfico (TR) para detecção de anticorpo anti-dengue.



Fonte: (Adaptado de <http://www.polyteck.com.br>)

A amostra é aplicada no local indicado (S), seguida pela adição de tampão de corrida, quando aplicável. O tampão propicia o fluxo lateral, e os anticorpos/antígeno presentes na amostra fluem lateralmente pela membrana de nitrocelulose, passando pela área onde se ligam às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal, prosseguindo em direção à área de teste (T). Na área T, o complexo anticorpo/antígeno - conjugado liga-se aos antígenos/anticorpos do agente infeccioso investigado, formando uma linha roxa/rosa (ou banda) colorida. O

conjugado não ligado ao anticorpo/antígeno e o excesso do complexo imune continuam a migração, ao longo da membrana de nitrocelulose, em direção à área do controle (C), onde são capturados por anticorpos anti-dengue, formando outra linha (ou banda) colorida, o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes e da reação. Na ausência de anticorpos/antígenos para dengue, a linha roxa/rosa não aparece na área do teste. A leitura do teste é visual e os resultados são obtidos geralmente em período que pode variar de 15 a 30 minutos, dependendo das recomendações de uso determinadas pelos diferentes fabricantes (SANG et al., 1998; SENGVILAI PASEUTH et al., 2017).

Testes rápidos são utilizados na pesquisa do antígeno NS1 e de anticorpos IgM e IgG da dengue (PEELING et al., 2010; HUNSPERGER et al., 2014).

Diferentes metodologias foram aplicadas ao diagnóstico sorológico da doença, dentre elas a Inibição da Hemaglutinação (IH), cujo princípio consiste na capacidade de os anticorpos específicos para dengue presentes na amostra de soro, inibirem a aglutinação de eritrócitos. Embora o teste de IH seja considerado o método de referência para quantificação de IgM e IgG anti-dengue, utilizado para detectar e diferenciar infecções primárias de secundárias, trata-se de um método trabalhoso e necessita de coletas pareadas com intervalos curtos, para correta interpretação, tendo sido gradualmente substituído pelo ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG (CHATCHEN; SABCHAREON; SIRIVICHAYAKUL, 2017; VALE, 2015).

O teste de neutralização por redução de placas (PRNT) é aplicado para determinação da imunidade sorotipo-específica aos DENV, sendo o teste recomendado pela OMS para estudos da eficácia de vacinas. É o método mais sensível e específico, mas ainda tem limitações como custo, e dificuldade de execução (CHATCHEN; SABCHAREON; SIRIVICHAYAKUL, 2017).

1.7.5 Sensibilidade e especificidade clínica ou diagnóstica

Com o crescimento da demanda por testes mais sensíveis e específicos para detecção precoce e diagnóstico das infecções pelo DENV, ou ainda para o acompanhamento do estado clínico dos pacientes, foram disponibilizados no mercado nacional e internacional uma grande variedade de conjuntos de diagnóstico de uso *in vitro* (*kits* de diagnóstico). Em vários estudos realizados, os *kits* de diagnóstico avaliados apresentaram valores de sensibilidade e

especificidade inferiores aos valores declarados nas instruções de uso do produto (GUZMÁN; KOURI, 2004; BLACKSELL et al., 2007; PEELING et al., 2010; FELIX et al., 2012; LIMA et al., 2010; SEA et al., 2013; PAL et al., 2014). Entende-se por sensibilidade (clínica ou diagnóstica), a avaliação da incidência de resultados verdadeiramente positivos obtidos quando um teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores de doença. A especificidade (clínica ou diagnóstica) é a incidência de resultados verdadeiramente negativos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos que sabidamente não possuem a doença em questão (BRASIL, 2015a).

Ainda se requer o desenvolvimento e a busca contínua por testes sorotipo específicos com alta sensibilidade, simplicidade e rapidez de execução, custo reduzido e baixa reatividade cruzada (maior especificidade). Esforços têm sido direcionados para desenvolvimento de testes para a detecção múltiplos agentes infecciosos e múltiplos parâmetros por patógenos para discriminar a dengue de outras flavoviroses e/ou outras doenças tropicais. Segundo Zhang e colaboradores (2015), alguns desafios necessitam ser vencidos tais como, a predição da evolução da forma severa, e a avaliação de dispositivos e tecnologias para o diagnóstico da doença (ZHANG et al., 2015). Nos últimos anos, diversas ferramentas diagnósticas tornaram-se disponíveis para vários estágios da doença. Recentes avanços em bioeletrônicos tem gerado novas técnicas para detecção de anticorpos e RNA baseado na tecnologia de biosensores. (ZHANG et al., 2015).

Visando a qualidade de produtos disponibilizados no mercado nacional, o Brasil desde a década de 70 promulgou e introduziu legislações específicas direcionadas à eficácia, segurança e qualidade de tais produtos e conseqüente redução de riscos à saúde da população (BRASIL, 1976).

1.8 Vigilância sanitária e o registro de produtos para saúde no Brasil

A preocupação com a qualidade e segurança dos produtos e serviços ofertados à população, no Brasil, ocorre desde o período colonial. A chegada da família real portuguesa, em 1808, desencadeou mudanças relacionadas com a nova inserção do país nas transformações da ordem capitalista mundial, com as necessidades de aumentar a produção, defender a terra e cuidar da saúde da população (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Ações de Vigilância Sanitária (VISA) constituem a mais antiga face da Saúde Pública e a tentativa de estabelecer controle sobre os elementos essenciais da vida, na perspectiva da melhoria da qualidade de vida (CAMPOS; WERNECK; TONON, 2001; COSTA, 2001).

A VISA, de acordo com a Lei 8.080/90 é definida como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”, compreendendo: I) controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; II) controle da prestação de serviços que se relacionem direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

Em coerência com o princípio da segurança sanitária, foi criado no Brasil, o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) que compreende o conjunto de ações de VISA executado por instituições da administração pública direta e indireta da União, dos estados, do Distrito Federal e dos municípios, que exerçam atividades de regulação, normatização, controle e fiscalização na área de VISA (BRASIL, 1999). O SNVS integra as VISAs Estaduais, Municipais e o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (BRASIL, 2010).

Medidas mais amplas de proteção, promoção e defesa da saúde alcançaram relevância a partir da descentralização das ações de vigilância, com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), em 1990, cujos efeitos surgiram a partir da instituição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, ocorrida em 1999 pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Dentre as principais atribuições da ANVISA destacam-se a coordenação do SNVS e as competências para estabelecer normas, propor, acompanhar e executar as políticas, as diretrizes e as ações de VISA e aplicar as penalidades aos infratores da legislação sanitária (BRASIL, 1999). Adicionalmente, no seu art. 8º, a Lei nº 9.782 incumbiu à ANVISA da competência de regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública, bem como, da atividade de concessão de registro de produtos no Brasil (BRASIL, 1999).

A regulamentação dos produtos sujeitos à VISA foi realizada na década de 70 através da promulgação da Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976, que no seu 12º art. dispõe sobre a VISA a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos, correlatos (produtos para saúde), cosméticos, saneantes e outros produtos. Esta Lei foi sancionada pelo Decreto nº 8.077 de 14 de agosto de 2013 estabelecendo que: “Nenhum dos produtos de que trata esta Lei, inclusive os importados, poderá ser industrializado, exposto à venda ou

entregue ao consumo antes de registrado no Ministério da Saúde”. Portanto, o registro de um produto é um ato privativo do Ministério da Saúde, destinado a comprovar o direito de fabricação ou importação de produtos submetidos à VISA (BRASIL, 1976, 2013).

1.8.1 Regulamentação de produtos para saúde

São denominados produtos para a saúde, equipamentos, aparelhos, materiais, artigos ou sistemas de uso ou aplicação médica, odontológica ou laboratorial, destinados à prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação ou anticoncepção e que não utiliza meio farmacológico, imunológico ou metabólico para realizar sua principal função em seres humanos, podendo, entretanto, ser auxiliado em suas funções por tais meios, de acordo com o Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA (RDC) nº 185, de 22 de outubro de 2001 (BRASIL, 2001).

Os produtos para saúde que utilizam amostras humanas para obter informações para o diagnóstico de uma doença ou para acompanhamento de um estado clínico, são denominados “produtos para diagnóstico de uso in vitro” (BRASIL, 1973, 1976). Estes são definidos pela legislação como:

Reagentes, calibradores, padrões, controles, coletores de amostra, materiais e instrumentos, usados individualmente ou em combinação, com intenção de uso determinada pelo fabricante, para análise in vitro de amostras derivadas do corpo humano, exclusivamente ou principalmente para prover informações com propósitos de diagnóstico, monitoramento, triagem ou para determinar a compatibilidade com potenciais receptores de sangue, tecidos e órgãos. (BRASIL, 2015a).

O comércio de produtos para saúde está condicionado ao cadastro/registro junto a ANVISA sendo regulamentado pela Lei nº 5.991/73 e seu Decreto de nº 74.170/74 (BRASIL, 1973; BRASIL, 1974).

1.8.2 Registro de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*

O grande marco no registro dos produtos para diagnóstico de uso *in vitro* ocorreu em 23 de janeiro de 1996, com a publicação da Portaria SVS nº 08 e os requisitos regulamentares para o controle sanitário deste tipo de produto. Nesta época, a responsabilidade de todo controle sanitário de produtos e serviços de saúde estava centrada na Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) do Ministério da Saúde que atuava no modelo de gestão centralizada (BRASIL, 1996).

Após 10 anos, em 2006, a Portaria SVS nº 8 foi revogada pela Resolução RDC nº 206 de 17 de novembro de 2006 (BRASIL, 2006). Dentre as mudanças nos requisitos regulamentares para registro, alteração e revalidação de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*, as principais estão relacionadas à classificação dos produtos, que passou a ter o foco voltado ao risco sanitário (ABREU, 2009).

Atualmente, está em vigência a resolução RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015, decorridos cerca de 10 anos após a promulgação da RDC nº 206/2006. A RDC nº 36/2015 tem por objetivo estabelecer a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos. A legislação se aplica aos produtos para o diagnóstico *in vitro* produzidos no país ou aos importados pelo Brasil. Desta forma, para fins de regularização junto a ANVISA, os produtos para o diagnóstico *in vitro*, são enquadrados em classes de risco, baseadas nos critérios de indicação de uso especificados pelo fabricante, no conhecimento técnico, científico ou médico do usuário; na importância da informação fornecida ao diagnóstico; na relevância e impacto do resultado para o indivíduo e para a saúde pública. Os produtos são classificados de acordo com a relevância epidemiológica em 4 classes assim definidas: Classe I: produtos de baixo risco ao indivíduo e baixo risco à saúde pública; Classe II: produtos de médio risco ao indivíduo e ou baixo risco à saúde pública; Classe III: produtos de alto risco ao indivíduo e ou médio risco à saúde pública; e Classe IV: produtos de alto risco ao indivíduo e alto risco à saúde pública (BRASIL, 2015a). Segundo o art. 17 da Resolução, os produtos para diagnóstico *in vitro* pertencentes às Classes I e II estão sujeitos a cadastro e os de Classes III e IV estão sujeitos a registro.

Na concessão do registro são avaliadas as informações relativas à fabricação, composição, desempenho, funcionalidade, sensibilidade e especificidade clínica ou diagnóstica, além da adequação aos requisitos regulamentares da Resolução RDC nº 36/2015

(BRASIL, 2015a). O solicitante deve protocolizar junto a ANVISA, documentos legais que compreendem: a petição de registro de produtos para diagnóstico *in vitro*, a Guia de Recolhimento da União (GRU), a declaração da Classe de Risco, o dossiê técnico contendo dados referentes a estudos de desempenho, amostras biológicas utilizadas e dados referentes a repetibilidade, reprodutibilidade; sensibilidade analítica ou limite de detecção; especificidade analítica; intervalo de medição (limites) ou linearidade; definição de valor de *cut-off* e estabilidade do produto. Quando aplicável devem ser fornecidas informações sobre o desempenho clínico, incluindo, resumo geral de evidências clínicas, sensibilidade e especificidade clínicas, valores esperados ou valores de referência, rotulagem e instruções de uso, conforme requisitos indicados no Capítulo V da Resolução (BRASIL, 2015a). Devem constar também, informações referentes à (s) empresa (s) envolvida (s) e etapa (s) correspondente (s) no processo de fabricação. Produtos importados devem apresentar declaração emitida pelo fabricante legal e autorizações para importar, representar e comercializar seu (s) produto (s) no Brasil, além de informações referentes ao fabricante legal e ao importador; Certificação em Boas Práticas de Fabricação e Controle emitida pela ANVISA ou protocolo de solicitação de Certificado de Boas Práticas de Fabricação (BPF); quando exigido, relatório de análise prévia considerada satisfatória, realizada por unidade da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública conforme previsto no inciso IV, art. 16 da Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976).

O deferimento do registro fica condicionado à publicação do Certificado de BPF emitido pela ANVISA e ao atendimento aos requisitos indicados na RDC 36/2015, incluindo o laudo de análise prévia SATISFATÓRIO, quando aplicável. Uma vez deferido, o registro é válido por 5 anos contados a partir da data de vencimento do mesmo. Segundo a Lei 6360/76 e RDC 36/2015, a revalidação deve ser requerida no primeiro semestre do último ano do quinquênio de validade (BRASIL, 1976, 2015). Segundo a legislação vigente, as análises previstas para os produtos submetidos ao sistema de vigilância sanitária estão assim definidas: **análise prévia** - efetuada em determinados produtos sob regime de VISA, a fim de ser verificado se os mesmos podem ser objeto de registro; **análise controle** - efetuada em produtos sob o regime de VISA, após sua liberação ao consumo e destinada a comprovar a conformidade do produto segundo as especificações estabelecidas por ocasião da solicitação do registro e, por fim, a **análise fiscal** - efetuada sobre os produtos submetidos ao sistema instituído pela legislação, em caráter de rotina, para apuração de infração ou verificação de ocorrência fortuita ou eventual (BRASIL, 1977).

Neste contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), pertencente à Fundação Oswaldo Cruz/RJ e tecnicamente subordinado a ANVISA atua como referência para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à VISA. No INCQS, o Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), desde o ano de 2000, avalia rotineiramente por análise prévia, como previsto em legislação, os produtos para diagnóstico de uso *in vitro* pertencentes à Classe de Risco IV (produtos de alto risco ao indivíduo e ou alto risco à saúde pública) destinados a triagem de doadores em Serviços de Hemoterapia para o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV1/2), o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1), os vírus das hepatites B e C, para a doença de Chagas e sífilis, nas diferentes metodologias, com vistas ao registro de tais produtos junto a ANVISA como previsto na RDC 36/2015.

No que diz respeito ao registro dos produtos destinados ao diagnóstico da dengue, pertencentes a Classe III de risco, assim como para os demais produtos desta classe, faz-se necessária o cumprimento aos requisitos regulamentares da Resolução RDC nº 36/2015, que inclui informações relativas à fabricação, composição, desempenho, funcionalidade, sensibilidade e especificidade clínica ou diagnóstica, excetuando-se a realização de análise prévia, não obrigatória para essa classe de produtos. Entretanto, conforme previsto no inciso IV, art. 16 da Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976 e de acordo com a legislação pertinente, como resultado deste trabalho, a partir de abril de 2016 foi incluída mais uma etapa obrigatória no registro de produtos para diagnóstico da dengue, a análise prévia laboratorial realizada no INCQS (BRASIL, 2015a).

A implementação da análise prévia como requisito para o registro de produtos destinados ao diagnóstico da dengue nas suas diferentes metodologias, permitirá disponibilizar no mercado nacional produtos mais sensíveis e específicos, ampliando assim a segurança e a confiabilidade na qualidade dos produtos destinados ao diagnóstico da dengue comercializados no Brasil, como um dos atributos da VISA.

1.9 Justificativa

Um dos fatores essenciais para o diagnóstico clínico e vigilância epidemiológica da dengue é a disponibilização de testes para diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos. Neste contexto, *kits* para o diagnóstico da infecção pelo DENV têm sido desenvolvidos e

disponibilizados no mercado nacional e internacional e empregados na pesquisa de antígeno e anticorpos específicos da doença. Dados relatados na literatura, referentes aos valores de sensibilidade e especificidade de tais produtos nas diferentes metodologias empregadas, apontam para uma discrepância em relação aos valores declarados pelos fabricantes para esses atributos. Em alguns casos, o desempenho dos mesmos é avaliado inadequadamente, muitas vezes frente a padrões de referência inapropriados, ou ainda quantitativo inadequado de amostras (PEELING et al., 2010). Tal fato, implica na possibilidade da ocorrência de resultados falso-negativos em amostras de indivíduos assintomáticos ou acometidos com a forma mais severa da doença. Este quadro pode acarretar um sério problema, como ausência de tratamento adequado e risco à saúde. Por outro lado, amostras falso-positivas implicam no tratamento incorreto, possivelmente de outro *Flavivírus*, uma vez que, a reatividade cruzada já foi descrita na literatura (PEELING et al., 2010).

Os *kits* de diagnóstico comercializados no país são registrados na ANVISA pela Gerência de Produtos para Diagnóstico de Uso *in vitro*/Gerência Geral de Tecnologia de Produtos para Saúde (GEVIT/GGTPS), desde 2001, de acordo com as legislações vigentes específicas. Para que os produtos sejam registrados, e conseqüentemente comercializados no país, é necessário atender aos critérios estabelecidos em leis e à regulamentação específica estabelecida pela ANVISA. O registro é o ato legal que reconhece a adequação de um produto à legislação sanitária. Tais critérios visam minimizar eventuais riscos associados ao produto (PORTAL ANVISA, 2017).

Atualmente para uma empresa pleitear o registro de *kits* para diagnóstico *in vitro* é necessário apresentar a documentação técnica de acordo com os ditames da Resolução RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015 (BRASIL, 2015). As petições de cadastro ou de registro de produtos devem ser protocolizadas junto à ANVISA. Após análise documental, a petição de registro tem como conclusão decisória: o deferimento, o indeferimento ou a formulação de exigência. Neste último caso, pode haver a necessidade de complementação de documentação e/ou realização de avaliação laboratorial do produto como parte do processo de registro através da execução de análise prévia.

Quando aplicável, a análise laboratorial dos *kits* é solicitada e os mesmos encaminhados ao INCQS como parte da concessão do registro.

Atualmente, a análise prévia aplica-se aos produtos para diagnóstico de maior classe de risco, ou seja, a aqueles pertencentes a Classe IV - produtos de alto risco ao indivíduo e alto risco à saúde pública. Tal procedimento, não se aplica aos produtos pertencentes a Classe III - produtos de alto risco ao indivíduo e médio risco à saúde pública, e neste caso incluem-se os

kits empregados no diagnóstico sorológico e molecular da dengue, entre outras doenças infectocontagiosas de caráter compulsório (BRASIL,2015).

Desta forma, principalmente, devido à discordância entre valores referentes aos parâmetros de desempenho (sensibilidade e especificidade) declarados pelos fabricantes nas instruções de uso dos produtos e os resultados das avaliações descritas na literatura, justifica-se a avaliação laboratorial dos *kits* de diagnóstico da dengue disponibilizados no mercado nacional na fase de solicitação do registro (análise prévia) para garantir, qualidade, efetividade e conseqüentemente a segurança do diagnóstico laboratorial. Serão avaliados os parâmetros de sensibilidade e especificidade declarados frente aos valores obtidos empregando-se a painéis sorológicos constituídos de amostras caracterizadas como verdadeiro positivas (VP) e verdadeiro negativas (VN).

A avaliação laboratorial dos *kits* empregados no diagnóstico sorológico da dengue, com vistas ao registro, torna este trabalho pioneiro no país e conseqüentemente um instrumento de VISA, podendo o modelo utilizado ser difundido aos países da América Latina, onde o controle da qualidade de tais produtos ainda não é realizado rotineiramente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a sensibilidade e especificidade dos conjuntos de diagnósticos *in vitro* empregados no diagnóstico das infecções por dengue, disponibilizados no mercado nacional.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter amostras de soro/plasma de indivíduos com suspeita de infecção pelo vírus da dengue em área endêmica e unidades de plasma fresco congelado provenientes de doação em Serviços de Hemoterapia das 5 regiões do país.
- Caracterizar as amostras obtidas quanto a presença ou ausência de antígenos NS1 e anticorpos IgM e/ou IgG da dengue, como verdadeiro positivas e verdadeiro negativas para os marcadores sorológicos em questão, empregando os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e imunocromatográfico (Teste Rápido), e quando aplicável, identificar os diferentes sorotipos da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) por RT-PCR das amostras selecionadas.
- Confeccionar painéis sorológicos compostos por amostras caracterizadas como verdadeiro positivas e verdadeiro negativas, de acordo com o marcador sorológico (NS1, IgM e IgG) da infecção pelo vírus da dengue.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade dos *kits* de diagnóstico comercialmente disponíveis no mercado nacional nas metodologias: ELISA e Testes Rápidos frente aos painéis sorológicos confeccionados.

- Comparar os valores de sensibilidade e especificidade obtidos por análise laboratorial dos *kits* de diagnóstico da dengue, frente aos painéis confeccionados, com os valores de sensibilidade e especificidade declarados pelo fabricante nos manuais de instrução que acompanham os produtos.
- Implantar o monitoramento efetivo de tais produtos, pré e pós-comercialização no país, em atendimento a demanda da Gerência de Produtos para Diagnóstico de Uso *in vitro*/Gerência Geral de Tecnologia de Produtos para Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (GEVIT/GGTPS/ANVISA), no contexto das análises prévia, fiscal e de controle preconizadas na legislação vigente.
- Ampliar a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados do Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle da Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no controle da qualidade dos *kits* de diagnóstico disponibilizados no mercado nacional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH) do Departamento de Imunologia do INCQS/Fiocruz, fomentado através do projeto denominado “Avaliação dos conjuntos diagnósticos empregados no diagnóstico sorológico da dengue no Brasil”, em parceria com a ANVISA e o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD). O projeto foi aprovado por meio da Carta Acordo nº 27429/2013 publicada em 07 de março de 2014 no Diário Oficial da União (D.O.U) nº 45, seção 3, às páginas 179 e 180, Processo nº 25351.602897/2013-13 e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP Fiocruz/IOC (CAAE: 55365316.7.0000.5248) sob o parecer nº 1590251. Foi desenvolvido em 4 etapas que seguem abaixo descritas:

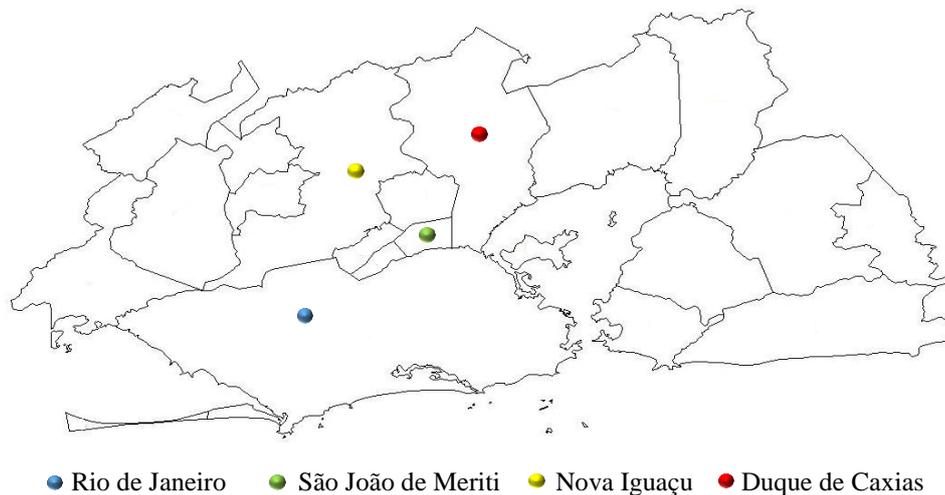
- Etapa 1 - Obtenção e caracterização de amostras clínicas de soro/plasma de indivíduos e unidades de plasma fresco congelados (PFC);
- Etapa 2 - Confeção de painéis sorológicos compostos de amostras verdadeiro-positivas e verdadeiro-negativas para dengue;
- Etapa 3 - Avaliação dos conjuntos diagnósticos para o diagnóstico *in vitro* da dengue, adquiridos no mercado nacional quanto à sensibilidade e especificidade clínica ou diagnóstica, frente aos painéis sorológicos confeccionados;
- Etapa 4 - Implantação e implementação de análise prévia prevista na Lei nº 6360/1977 e RDC nº 36/2015 no que diz respeito aos conjuntos de diagnóstico da dengue e consequentemente a ampliação da capacidade analítica do LSH do INCQS.

3.1 Etapa 1 - Obtenção e caracterização de amostras clínicas e unidades de plasma fresco congeladas (PFC)

3.1.1 Obtenção de amostras clínicas com suspeita de dengue

Foram obtidas 5.883 amostras de soro/plasma excedentes da realização de testes sorológicos efetuados em indivíduos com suspeita de infecção pelo DENV, que buscaram a confirmação diagnóstica em serviços de saúde localizados na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro, nos municípios de Duque de Caxias, Nova Iguaçu, São João de Meriti e Rio de Janeiro durante surtos epidêmicos da doença, no período de março de 2010 a maio de 2013 (Figura 9). As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso, objetivando a execução desse trabalho.

Figura 9 - Mapa da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro destacando municípios de proveniência das amostras no período de coleta de março de 2010 a maio de 2013.



Fonte:(<http://www.baixarmapas.com.br>)

As amostras clínicas foram encaminhadas ao LSH em tubos primários de coleta (com ou sem anticoagulante), ou fracionadas em criotubos tipo NUNC[®], com volumes médios de 1,0 mL cada e identificadas numericamente de acordo com o serviço de proveniência.

A seleção do período de coleta e das localidades para obtenção das amostras, foi baseada nos locais de ocorrência de surtos epidêmicos da doença e na disponibilização do envio das amostras pelos serviços. Não foram fornecidos pelos serviços de saúde, os dados referentes aos testes sorológicos previamente realizados nas amostras ou ainda dados relativos a data de início da infecção, sintomas da doença relatados ou identificação dos pacientes.

3.1.2 Obtenção de unidades de Plasma Fresco Congelado (PFC)

Adicionalmente as amostras clínicas, um total de 672 unidades de PFC excedentes de doações, obtidas através do fracionamento de sangue total humano, de acordo com o preconizado pela Portaria nº 158/2016, não reagentes para HIV1/2, HTLV I/II, HBV, HCV, doença de Chagas e sífilis foram coletadas em Serviços de Hemoterapia nos estados da federação, com exceção do estado de São Paulo, no período de janeiro de 2013 a março de 2015 (Figura 10).

Figura 10 - Unidades de Plasma Fresco Congelado.



Fonte: (<http://test.hemolifeamerica.org/wp-content/uploads/2016/06/plasma-fresco-congelado.jpg>)

Foi efetuada pelas VISAs Estaduais a coleta de 5 unidades de PFC por Serviço de Hemoterapia e encaminhadas ao LSH/INCQS, onde permaneceram estocadas a -20 °C até o

momento de uso. A escolha pela inclusão de unidades de PFC foi baseada no volume de amostra disponível em cada unidade, aproximadamente 200 mL, e na possibilidade de avaliação do perfil sorológico dos doadores quanto a presença de antígenos e/ou anticorpos anti-dengue em diferentes regiões do país.

3.1.3 Registro, codificação e armazenamento das amostras recebidas

Todas as amostras clínicas e PFC recebidas foram registradas no LSH de acordo com o estabelecido no Procedimento Operacional Padronizado (POP) INCQS nº 65.3420.013 (INCQS, 2014). Constam no registro das amostras, as informações referentes: ao local de origem, data da coleta, número do paciente/doador, volume aproximado e número sequencial adotado no LSH. Tal procedimento teve por finalidade preservar a rastreabilidade das amostras. Para análise dos resultados, todos os dados foram incluídos em planilha *Microsoft Excel*® 2010.

As amostras clínicas encaminhadas em tubos primários de coleta, foram transferidas individualmente para criotubos tipo NUNC® de 1,8 mL identificados por número sequencial do LSH. As unidades de PFC foram descongeladas à temperatura ambiente e o volume total de cada unidade filtrado individualmente para eliminação parcial de fibrina em gaze hidrófila (09 fios/cm; 2,5 dobras e 8 camadas). Após filtração, os PFCs foram estocados em garrafas Nalgene® de 150 mL e 10 alíquotas de 1,8 mL de cada unidade foram preparadas e identificadas. Nenhuma das amostras clínicas ou unidades de PFC recebeu solução conservante, tendo sido após o fracionamento armazenadas a -20°C até o momento do uso. Vale salientar que somente as amostras clínicas e unidades de plasma, doravante denominadas “AMOSTRAS”, que após fracionamento e estocagem, possuíam volume superior ou igual a 1,2 mL e 150 mL, respectivamente, seguiram para a etapa de caracterização.

3.1.4 Caracterização sorológica e molecular das amostras

As amostras, foram caracterizadas quanto a presença ou ausência de antígenos (NS1) e/ou anticorpos (IgM/IgG) anti-dengue empregando-se as seguintes metodologias: ELISA, Ensaio Imunocromatográfico (Teste Rápido) e Ensaio Molecular (RT-PCR) em tempo real. Embora a avaliação molecular das amostras realizadas por RT-PCR, não tenha sido objeto deste trabalho, a metodologia foi empregada com a finalidade de determinar os sorotipos e consequentemente caracterizar com maior rigor as amostras, evitando a variável, viés das amostras.

Todos os *kits* de diagnóstico utilizados na caracterização possuíam registro na ANVISA/Ministério da Saúde e foram adquiridos no mercado nacional no período de execução deste trabalho.

A aquisição dos *kits* foi baseada nos seguintes requisitos: registro válido no Ministério da Saúde, comercialização no país, disponibilidade de entrega imediata do quantitativo e metodologia solicitados, além de preço não abusivo. As empresas que responderam à solicitação e atenderam aos critérios estabelecidos, foram selecionadas para o fornecimento de tais produtos. Ao final do processo de compra efetivado pela Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde (FIOTEC), prestadora de serviços de apoio logístico aos projetos desenvolvidos pela Fiocruz, foram adquiridos para caracterização das amostras: 03 (três) testes ELISA, sendo 01 (um) para detecção de antígeno NS1, 01 (um) para detecção de anticorpos IgM e 01 (um) para detecção de anticorpos IgG, além de 04 (quatro) Testes Rápidos: 02 (dois) para NS1, 02 (dois) para detecção de anticorpos IgM e IgG, além de 01(um) teste molecular para determinação dos sorotipos do DENV. Os *kits* utilizados foram codificados e são apresentados de acordo com as metodologias, aplicabilidade e sensibilização (antígenos/anticorpos), assim como os valores máximos e mínimos de sensibilidade e especificidade descritos nas instruções de uso que acompanham os produtos.

3.1.4.1 ELISA

A caracterização das amostras foi realizada empregando-se o ELISA para a detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-dengue por captura (*Kit A*), detecção de anticorpos IgG anti-dengue (*Kit B*) e de antígenos NS1 (*Kit C*). Os ensaios foram realizados seguindo-se estritamente as instruções de uso que acompanhavam os conjuntos diagnósticos. O Quadro 1 mostra a codificação dos *kits* utilizados na caracterização sorológica das amostras por ELISA, os anticorpos/antígenos do DENV empregados na sensibilização das microplacas, a matriz e a faixa de valores de sensibilidade e especificidade apresentados nas instruções de uso que acompanham os produtos.

Quadro 1 - Codificação, aplicabilidade, sensibilização das microplacas, matriz de análise, sensibilidade e especificidade descritas nas instruções de uso dos *kits* de diagnóstico utilizados na caracterização sorológica das amostras por ELISA (ensaio imunoenzimático).

Kit	Método	Aplicabilidade	Sensibilização das microplacas	Matriz	Sensibilidade	Especificidade
A	ELISA	Detecção Qualitativa de Anticorpos IgM anti-dengue	Anticorpos IgM anti-dengue humano e Antígeno Recombinante da dengue 1 a 4	Soro	85,1%	93%
B	ELISA	Detecção Qualitativa de Anticorpos IgG anti-dengue	Vírus Inativado da dengue dos tipos 1 a 4	Soro	a 96%	a 100%
C	ELISA	Detecção Qualitativa de Antígeno NS1	Anticorpo Monoclonal anti-NS1	Soro		

Fonte: (LSH, 2015)

3.1.4.1.1 (*Kit A*) - Detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-dengue por captura

Para execução do ensaio, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e os testes realizados, seguindo-se estritamente as instruções de uso fornecidas pelo fabricante do produto. As amostras diluídas foram adicionadas aos micropoços sensibilizados com anticorpos anti-IgM, e a microplaca incubada. Seguiram-se as etapas de diluição do antígeno recombinante dos tipos 1, 2, 3, e 4 do DENV em diluente próprio e incubação. Após,

realização das etapas de lavagem preconizadas, realizou-se a incubação com solução de antígeno–anticorpo monoclonal conjugado a peroxidase. Novas lavagens da microplaca foram realizadas seguidas da adição de substrato tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio (cromógeno TMB). A revelação da reação se deu à temperatura ambiente, seguindo-se a interrupção pela adição de solução de parada e a realização da leitura da densidade ótica (DO) realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm com filtro de referência de 620 nm.

A razão entre os valores de DO das amostras e o valor de ponto de corte (*cut-off* - CO), (DO/CO), foi utilizada para harmonização dos resultados nos diferentes ensaios realizados e como indexador sugeridos pelo fabricante para análise das amostras. Amostras com valores de razão inferiores a 0,9 foram consideradas NEGATIVAS, entre 0,9 e 1,1 foram consideradas INCONCLUSIVAS e superiores a 1,1 consideradas POSITIVAS.

3.1.4.1.2 (*Kit B*) - *Detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-dengue pelo método ELISA indireto*

O ELISA indireto foi empregado na detecção de anticorpos IgG anti-dengue (*Kit B*) utilizando-se microplacas revestidas com DENV inativados e purificados dos subtipos 1, 2 3 e 4. Para realização do ensaio, foram seguidas estritamente as instruções de uso do produto. A amostra e controles diluídos foram incubados em microplacas revestidas por DENV inativados e purificados dos subtipos 1, 2 3 e 4 por 1 hora à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens, seguiram-se as etapas de adição do conjugado, incubação à temperatura ambiente e lavagem da microplaca seguida da adição de substrato e revelação. A reação foi interrompida e a leitura realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm, de acordo com o preconizado nas instruções de uso do *kit*.

A razão entre os valores de DO das amostras e o valor de ponto de corte (DO/CO), foi utilizada para harmonização dos resultados nos diferentes ensaios realizados e como indexador sugerido pelo fabricante para análise das amostras. Amostras com valores de razão inferiores a 1,0 foram consideradas NEGATIVAS e superiores a 1,1 foram consideradas POSITIVAS e entre 0,9 a 1,1 e iguais a 1,0 INCONCLUSIVAS.

3.1.4.1.3 (*Kit C*) - Detecção qualitativa do antígeno NS1 por ELISA

O ELISA para detecção do antígeno NS1 (*Kit C*) foi realizado seguindo-se estritamente as instruções de uso descritas pelo fabricante do produto. As amostras e controles previamente diluídos em tampão próprio foram distribuídos nos micropoços recobertos com anticorpos anti-NS1. Foi realizada a incubação da microplaca seguida da lavagem com tampão próprio e nova incubação com anticorpo monoclonal anti-NS1 conjugado a enzima peroxidase. Após lavagem, o cromógeno foi adicionado e a revelação realizada à temperatura ambiente. A solução para interrupção da reação foi adicionada e a leitura da microplaca realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 450nm com filtro de referência de 600 nm a 650 nm.

Foi utilizada a razão entre os valores de DO das amostras e o valor de ponto de corte (CO) para harmonização dos resultados. Amostras com valores de razão (DO/CO) inferiores a 0,9 foram consideradas NEGATIVAS, valores entre 0,9 e 1,1, DUVIDOSAS e superiores a 1,1 consideradas POSITIVAS conforme descrito nas instruções de uso do fabricante do produto.

3.1.4.2 *Testes Rápidos (Imunocromatográficos)*

Os testes rápidos foram utilizados na detecção qualitativa diferencial da presença de anticorpos IgM e IgG anti-dengue em um único dispositivo e de antígenos NS1. Foram utilizados 2 (dois) testes para pesquisa de anticorpos IgM/IgG (*Kit D* e *Kit E*) de mesmo princípio metodológico e sensibilizações diferentes e 2 (dois) testes para pesquisa de antígeno NS1 (*Kit F* e *Kit G*). No Quadro 2 são descritos os códigos adotados, método, aplicabilidade e antígenos/anticorpos utilizados na sensibilização das tiras de nitrocelulose, de acordo com as instruções de uso dos produtos, assim como, os valores mínimos e máximos de sensibilidade e especificidade declarados pelos fabricantes para seus produtos.

Quadro 2 - Codificação, aplicabilidade, sensibilização das microplacas, matriz de análise, sensibilidade e especificidade descritas nas instruções de uso dos Testes Rápidos (Imunocromatográficos) utilizados na caracterização sorológica das amostras.

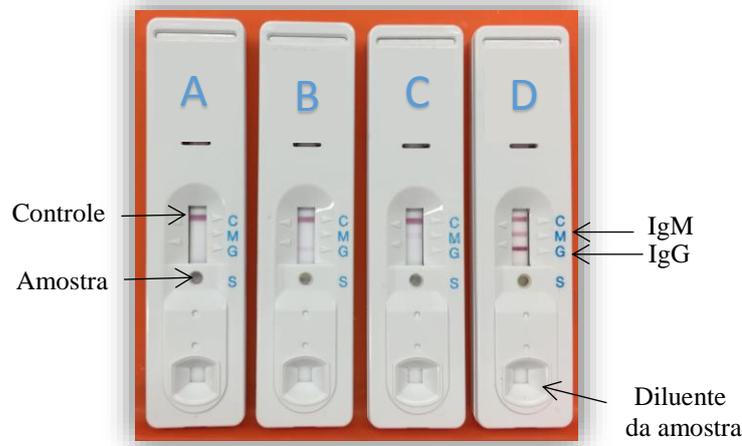
<i>Kit</i>	<i>Método</i>	<i>Aplicabilidade</i>	<i>Sensibilização</i>	<i>Matriz</i>	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>
<i>D</i>	TR	Detecção Qualitativa de Anticorpos IgM/IgG anti-dengue	Antígeno Recombinante sorotipos 1 a 4	soro, plasma e sangue total	92,3%	98,4%
<i>E</i>	TR	Detecção Qualitativa de Anticorpos IgM/IgG anti-dengue	Não informada nas instruções de uso	soro, plasma e sangue total		
<i>F</i>	TR	Detecção Qualitativa de Antígeno NS1	Anticorpos Monoclonais de Camundongo anti-NS1	soro e plasma	99,5%	100%
<i>G</i>	TR	Detecção Qualitativa do Antígeno NS1	Anticorpos Monoclonais de Camundongo anti-NS1	soro, plasma e sangue total		

Fonte: (LSH, 2015)

3.1.4.2.1 (Kits *D* e *E*) - Detecção de anticorpos IgM/IgG anti-dengue

Os testes rápidos foram realizados de acordo com as instruções de uso dos fabricantes, seguindo-se as etapas de adição da amostra (sangue total, soro ou plasma), adição de solução tampão, incubação à temperatura ambiente e interpretação por leitura visual em no máximo 30 min. Os dispositivos possuíam 3 linhas: linha teste IgM (**M**), linha teste IgG (**G**) e linha controle (**C**). Nas amostras negativas (**A**) somente a linha controle deveria estar presente. Amostras consideradas positivas para anticorpos IgG (**B**), IgM (**C**) e IgM/IgG (**D**) apresentaram linhas “G” e/ou “M” visíveis na janela de resultados, além da banda controle que deveria estar presente em todos os testes, caso contrário o teste era considerado inválido (Figura 11).

Figura 11 - Teste rápido para pesquisa de anticorpos IgM/IgG da dengue.

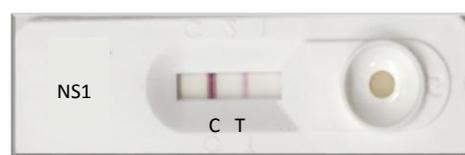


Fonte: (LSH, 2015)

3.1.4.2.2 (Kits F e G) - Detecção de antígeno NS1

O *kit F* é descrito como teste rápido de uma única etapa e foi utilizado para detecção do antígeno NS1. De acordo com as instruções de uso do fabricante, a amostra (soro ou plasma) foi adicionada no poço reservado. Os resultados foram interpretados por leitura visual em até 20 min. A presença das bandas coloridas na linha teste (T) e controle (C) dentro da janela de resultados, indicava um resultado positivo. A presença de banda na linha controle indicava um resultado negativo. O teste foi considerado inválido se nenhuma linha colorida visível estivesse presente na janela de resultados na linha controle (Figura 12).

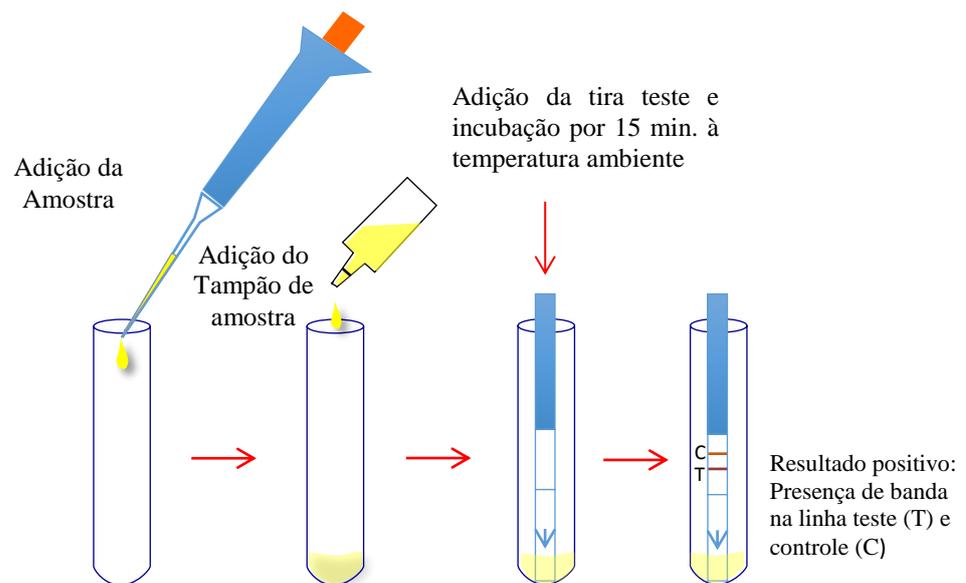
Figura 12 - Teste rápido **positivo** para detecção de antígeno NS1, com aparecimento da banda controle (C) e banda teste (T) dentro da janela de resultados.



Fonte: (LSH, 2015)

O *kit G*, correspondeu ao teste rápido para detecção de NS1 realizado em tubo. De acordo com as instruções de uso do fabricante, soro ou plasma foram adicionados ao tubo reservado para amostra seguindo-se a adição de tampão de migração. Após homogeneização, inseriu-se, uma tira de teste em cada tubo de amostra a ser avaliada. Após 15 min. de incubação à temperatura ambiente, as tiras tiveram os resultados avaliados dentro do tubo. O dispositivo é constituído de uma banda controle (C) que deve estar presente em todas as reações. Se nenhuma linha colorida fosse visível na banda controle após a realização do teste, o resultado era considerado inválido. A presença de apenas uma banda na linha controle (C) indicava um resultado negativo. A presença de duas bandas coloridas, linha teste (T) e controle indicavam um resultado positivo para NS1 (Figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática de um teste rápido com resultado **positivo** para detecção qualitativa de antígeno NS1 (T) com presença da banda controle do teste (C).



Fonte: (LSH, 2015)

3.1.4.3 (*Kit H*) - Caracterização Molecular

A identificação do sorotipo da dengue deu-se após a caracterização sorológica das amostras. Foram prioritariamente selecionadas para sorotipagem, amostras com volume

superior ou igual a 1,2 mL que apresentaram reatividade para o antígeno NS1 nos testes sorológicos aplicados (ELISA e teste rápido) combinados ou não com anticorpos IgM e/ou IgG (NS1+IgM; NS1+IgG; NS1+IgM+IgG).

Objetivando a caracterização das amostras quanto ao sorotipo da dengue, optou-se pela realização da metodologia de RT-PCR em tempo real para detecção *in vitro* e tipificação dos sorotipos 1, 2, 3 e 4 do DENV em RNA viral extraído. Para tal foi utilizado *kit* comercialmente disponível e registrado no país, para extração e amplificação/detecção do RNA do DENV (*kit* H) cuja execução foi realizada de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes (Quadro 3). O processo de extração foi monitorado por controle interno (IC) de RNA que acompanha o *kit* de RT-PCR e o ensaio amplifica 4 regiões específicas para o sorotipo: DENV-1 (Gene NS5), DENV-2 (Gene NS3), DENV-3 (Gene NS5) e DENV-4 (Gene do Capsídeo).

Quadro 3 - Codificação e aplicabilidade descritas nas instruções de uso do teste de diagnóstico empregando o método RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa) utilizado para detecção de ácidos nucleicos (NAT) e sorotipagem das amostras.

<i>Kit</i>	Método	Aplicabilidade	<i>Primers</i>
<i>H</i>	RT-PCR	Detecção de RNA- Sorotipagem	<i>Primers</i> (DENV-1, 2, 3 e 4)

Fonte: (LSH, 2015)

O RNA viral foi extraído pela técnica que utiliza membrana de sílica para o isolamento e a purificação. O RNA foi purificado a partir de 140 µL do soro ou plasma, seguindo protocolo recomendado pelo fabricante e eluído em 60 µL por tampão apropriado, sendo estocado a -20°C até o momento do uso.

A execução da RT-PCR iniciou-se a partir do preparo da mistura de reação (*mix*) de acordo com as instruções do fabricante, seguido da adição de 5µL do *mix*, 5 µL do RNA extraído, além dos *controles do kit* no disco de reação. Após selagem, o disco foi inserido em equipamento específico para realização do teste, disponibilizado pelo fabricante do produto. A leitura e interpretação dos resultados, referentes as análises realizadas, foram gerados pelo *software* vinculado ao produto em questão.

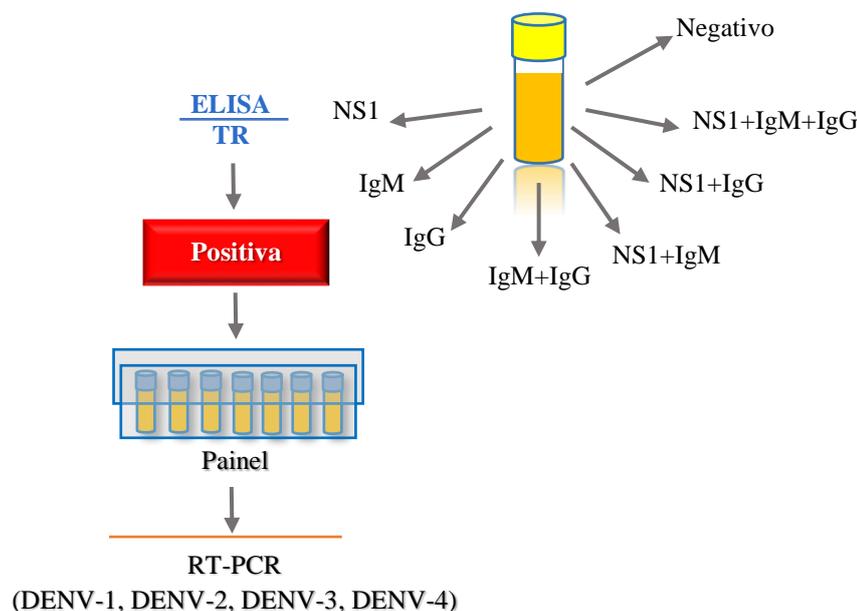
3.2 Etapa 2 - Confeção de painéis sorológicos

Concluída a etapa de caracterização das amostras quanto a presença ou ausência de antígenos e/ou anticorpos da dengue, seguiu-se a confecção dos painéis sorológicos. Tratam-se de amostras organizadas em painéis, de acordo com a reatividade para os marcadores sorológicos da dengue (NS1, IgM e IgG). Foram denominadas amostras **verdadeiro positivas (VP)** aquelas que apresentaram positividade em pelo menos 02 testes: 01 teste ELISA e 01 teste rápido, ou ainda 02 testes rápidos, para os marcadores sorológicos supracitados, com sorotipo identificado ou não. A identificação do sorotipo por RT-PCR somente foi possível nas amostras que apresentaram carga viral detectável.

Amostras denominadas **verdadeiro negativas (VN)** não apresentaram reatividade nos testes para detecção de antígenos, e/ou anticorpos e no teste molecular (RT-PCR).

Foram confeccionados 07 painéis contendo amostras verdadeiro positivas assim denominados: painel NS1, painel IgM, painel IgG, painel NS1+IgM, painel NS1+IgG, painel IgM+IgG, painel NS1+IgM+IgG e 01 painel Negativo composto por amostras verdadeiro negativas (Figura 14).

Figura 14 - Representação esquemática dos painéis sorológicos confeccionados a partir de amostras verdadeiro positivas e verdadeiro negativas para os diferentes marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da dengue (DENV) pelos testes ELISA, TR e RT-PCR em tempo real.



3.3 Etapa 3 - Avaliação dos *kits* comercialmente disponíveis utilizados no diagnóstico sorológico da dengue

3.3.1 Critérios de seleção e aquisição dos *kits*

Objetivando a avaliação dos *kits* empregados no diagnóstico sorológico da dengue disponíveis no mercado nacional, quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade, foi realizada busca junto a ANVISA no sistema DATAVISA em junho de 2015 com o objetivo de quantificar e identificar os *kits* utilizados no diagnóstico sorológico da dengue no país, que possuíam registro válido no período de realização deste trabalho. O sistema DATAVISA é uma ferramenta de consulta *online* sobre processos, produtos e empresas submetidos à regulação sanitária. Os produtos identificados possuíam registro válido para o período compreendido de 2015 a 2020.

Foram identificados 53 importadores/distribuidores, dos produtos constantes na busca realizada, que, em seguida foram contactados e questionados via *e-mail* sobre a disponibilidade de venda de testes nas metodologias ELISA e teste rápido dentro dos critérios previamente estabelecidos que foram: registro válido no Ministério da Saúde, comercialização no país, disponibilidade de entrega imediata, além de preços não abusivos. Aqueles que responderam a solicitação atendendo aos critérios estabelecidos, foram selecionados para o fornecimento de tais produtos. Ao final do processo de compra, realizado no período médio de 3 meses entre o contato via *e-mail* e a efetivação da compra pela FIOTEC, foram adquiridos para análise, um total de 13 *kits*, assim distribuídos: 05 (cinco) testes ELISA: 02 testes para detecção de antígeno NS1, 02 testes para detecção de anticorpos IgM, 01 teste para detecção de IgG e 08 (oito) Testes Rápidos: 06 para detecção de antígeno NS1, 01 para detecção de anticorpos IgM/IgG, 01 para detecção de anticorpos NS1/IgM/IgG. Por tratar-se de informação sigilosa, os *kits* foram codificados e os dados referentes à metodologia de análise, marcador sorológico, antígeno/anticorpo de sensibilização, matriz de análise (sangue, soro ou plasma) obtidos das instruções de uso estão sumarizados no Quadro 4. Cabe ressaltar que, os valores individuais de sensibilidade e especificidade foram propositalmente omitidos, por confidencialidade da informação. A competência legal do INCQS impede a vinculação do Instituto a marcas ou produtos. Desta forma, os dados de sensibilidade e especificidade

apresentados no Quadro 4 correspondem aos valores mínimos e máximos para cada um dos parâmetros (sensibilidade e especificidade) de acordo com a metodologia.

Quadro 4 - Codificação e descrição sumária de acordo com as instruções de uso dos conjuntos diagnósticos (*kits*) adquiridos no mercado nacional.

Kit N°	Método	Uso Pretendido	Sensibilização	Matriz	Sensibilidade	Especificidade
1	ELISA	Detecção qualitativa ou semi-quantitativa do antígeno NS1	Anticorpo monoclonal murino	soro ou plasma	88,2% a 96%	93% a 100%
2	ELISA	Detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-dengue	Peptídeos recombinantes da proteína do envelope	soro ou plasma		
3	ELISA	Detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-dengue	Lisado viral inativado	soro ou plasma		
4	ELISA	Detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-dengue	Vírus inativados e purificados da dengue tipos 1 a 4	soro		
5	ELISA	Detecção qualitativa de antígenos NS1 da dengue	Anticorpo anti-NS1	soro		
6	TR	Detecção qualitativa de antígenos NS1 da dengue	Anticorpo monoclonal anti-NS1	soro ou plasma	NS1 92,4% a 94,6%	NS1 98,4% a 99,0%
7	TR	Detecção de antígeno NS1 e de anticorpos IgG/IgM do vírus da dengue	Anticorpo monoclonal de camundongo anti-dengue NS1; IgM e IgG	soro, plasma, sangue		
8	TR	Detecção qualitativa de antígenos NS1 da dengue	Anticorpo monoclonal de camundongo anti-dengue NS1	soro, plasma, sangue		
9	TR	Detecção qualitativa de antígenos NS1 da dengue	Anticorpo monoclonal anti-NS1	soro, plasma, sangue	IgG/IgM 94,2% a 95,8%	IgG/IgM 96,4% a 99,0%
10	TR	Detecção de anticorpos IgG/IgM do vírus da dengue	Anticorpo monoclonal IgM e IgG humanos	soro, plasma, sangue		
11	TR	Detecção qualitativa de antígeno NS1 da dengue	Anticorpo monoclonal de dengue NS1	soro, plasma, sangue		
12	TR	Detecção qualitativa de antígeno NS1 da dengue	Anticorpo anti-dengue NS1	soro, plasma, sangue		
13	TR	Detecção qualitativa de antígeno NS1 da dengue	Anticorpo monoclonal anti-NS1	soro, plasma, sangue		

Fonte: (LSH, 2015)

Finalizado o processo de aquisição, os *kits* foram submetidos a análise laboratorial frente aos painéis constituídos de amostras verdadeiro-positivas e verdadeiro-negativas para os diferentes marcadores (NS1, IgM e IgG) para avaliação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade clínica ou diagnóstica.

A análise dos produtos seguiu os procedimentos estabelecidos pelo INCQS quanto ao recebimento, cadastro e emissão de laudos inicialmente no Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGAWEB 2000) e, atualmente realizado no Sistema HARPYA 2.1.2442 vinculado ao Departamento de Informática do SUS (DATASUS).

3.3.2 Avaliação do atributo de sensibilidade dos *kits* adquiridos no mercado nacional

A sensibilidade dos *kits* adquiridos no mercado nacional foi avaliada frente aos painéis sorológicos confeccionados compostos de amostras de soro e plasma VP, distribuídos de acordo com o marcador sorológico (NS1, IgM e IgG) para dengue. Esta análise também incluiu a avaliação dos produtos frente a painel sorológico comercial adquirido (PVD 201: *Anti-Dengue Mixed Titer Performance Panel* fornecido pela *Sera Care Life Science* ®). Trata-se de painel contendo 21 amostras de plasma (20 positivas e 1 negativa) com volume de 1,2 mL cada, provenientes de diferentes indivíduos, apresentando reatividade para anticorpos IgM e IgG anti-dengue, testados por ensaios comercialmente disponíveis, incluindo as metodologias de ELISA, imunofluorescência indireta (IFI) e teste rápido. Foi incluída ainda na avaliação, o Padrão Internacional OMS: *Anti-Dengue Virus Types 1+2+3+4*, (*Reference Reagent 02/186 NIBSC*), quando aplicável. Trata-se de reagente de referência proveniente de indivíduos infectados pelo DENV, disponível para estudos de validação, além de amostras interferentes reagentes para HIV, vírus da hepatite C (HCV), HTLV, antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), doença de Chagas e sífilis.

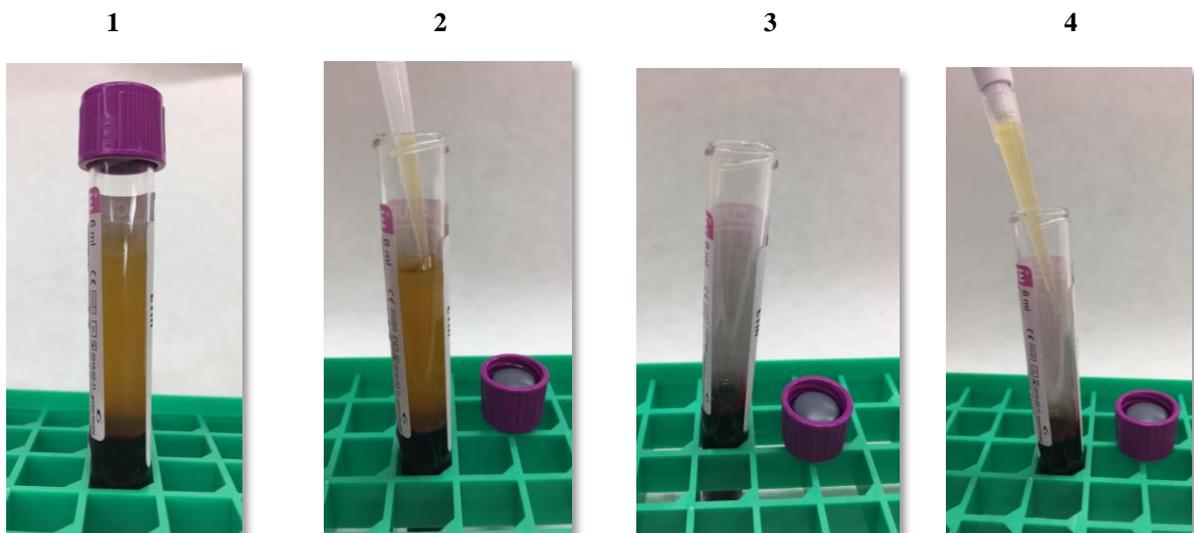
As análises foram realizadas seguindo-se estritamente as recomendações descritas nas instruções de uso que acompanhavam os produtos.

3.3.3 Avaliação dos atributos de especificidade dos *kits* adquiridos no mercado nacional

A especificidade foi avaliada frente ao painel sorológico confeccionado composto por amostras VN. Foram incluídos na avaliação, o painel sorológico comercial (PVD 201: *Anti-Dengue Mixed Titer Performance Panel* fornecido pela *Sera Care Life Science*®) e Padrão Internacional OMS: *Anti-Dengue Virus Types 1+2+3+4*, (*Reference Reagent 02/186*) acima descritos. Além das amostras VN foram incluídas na avaliação, amostras interferentes: soro e/ou plasma reativos para os vírus HIV, HCV, HBV, HTLV, doença de Chagas e sífilis.

Vale ressaltar que na avaliação da sensibilidade e especificidade, nos testes rápidos que incluíam a utilização de amostras de sangue total, foram utilizados *spikes* de amostras de soro/plasma reagentes e não reagentes para NS1, IgM, IgG realizados em concentrado de hemácias, obtido a partir de sangue total não reagente para dengue. Para confecção dos *spikes*, as amostras de sangue total foram centrifugadas a 10 min./5.000 rpm em centrífuga clínica para retirada do plasma (Etapa 1). Em seguida o plasma sobrenadante foi retirado (Etapa 2) e o concentrado de hemácias obtido após centrifugação (Etapa 3) foi diluído volume a volume (v/v) com o plasma/soro reagente ou não reagente (Etapa 4) para os marcadores avaliados como mostrado na Figura 15 abaixo.

Figura 15 - Etapas de confecção de *spike* de amostras de sangue.



Fonte: (LSH, 2015)

3.3.4 Análise comparativa dos valores de sensibilidade e especificidade obtidos frente aos valores declarados pelos fabricantes nas instruções de uso dos produtos

Instruções de uso são orientações fornecidas pelo fabricante ou detentor do registro ao usuário para a correta utilização do produto com segurança e eficácia. As instruções de uso foram avaliadas frente aos critérios estabelecidos pela RDC nº36/2015 observando-se o cumprimento dos parâmetros de sensibilidade e especificidade, bem como, quanto aos valores declarados pelos fabricantes de cada um dos produtos avaliados.

Para execução dos ensaios e interpretação dos resultados, foram seguidas as instruções de uso de cada produto. Os valores percentuais de sensibilidade e especificidade obtidos na análise dos *kits* frente aos painéis sorológicos descritos, foram comparados com os valores declarados nas instruções de uso que acompanham os *kits*. Os produtos cujos valores de sensibilidade e/ou especificidade foram superiores ou iguais aos declarados pelo fabricante foram considerados **SATISFATÓRIOS**. Aqueles que apresentaram valores inferiores foram considerados **INSATISFATÓRIOS**.

O cálculo dos valores percentuais de sensibilidade e especificidade foi realizado de acordo com as equações apresentadas na Figura 16, onde VP corresponde às amostras verdadeiro positivas, FN às amostras falso negativas, VN às amostras verdadeiro negativas e FP às falso positivas (GUIMARÃES, 1985).

Figura 16 - Equações utilizadas para o cálculo dos valores percentuais de sensibilidade e especificidade.

$$\text{Sensibilidade (\%)}: \frac{VP}{VP+FN} \times 100 \quad \text{e} \quad \text{Especificidade (\%)}: \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

Fonte: (GUIMARÃES, 1985)

3.3.5 Avaliação das instruções de uso que acompanham os produtos

As instruções de uso que acompanham os produtos foram avaliadas frente a legislação vigente, Resolução RDC nº 36/2016 quanto a matriz de análise; ao uso ou não e ao tipo de anticoagulante empregado na obtenção das amostras; ao tipo de antígeno, tipos de anticorpos e proteínas utilizados na sensibilização da fase sólida.

3.4 Etapa 4 - Implantação e implementação da análise de *kits* empregados no diagnóstico da dengue no contexto da legislação nacional (prévia, fiscal e controle)

A conclusão da etapa de confecção de painéis (sorológicos e molecular) e de avaliação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos *kits* comercializados no país, proporcionou de forma efetiva o início da etapa 4 desse trabalho. Esta etapa, inicialmente foi considerada apenas uma oportunidade de implantação das análises previstas na legislação vigente. No entanto, tendo em vista os resultados preliminares obtidos, e por este trabalho tratar-se de vigilância sanitária de produtos na sua essência e, conseqüentemente de saúde pública, facultou na implantação e implementação de forma definitiva da análise prévia, fiscal e controle, dos *kits* de diagnóstico da dengue, de acordo com a legislação vigente (ANEXOS A e B). Tais procedimentos são realizados de forma sistemática e rotineira pelo LSH para produtos de Classe IV (ANEXO C). Para isso, os resultados obtidos neste trabalho foram encaminhados à ANVISA e, de acordo com o inciso VII do artigo 19 da Resolução RDC nº 36/2015, culminou na obrigatoriedade de realização de análise prévia dos *kits* de diagnóstico da dengue.

3.4.1 Recebimento de produtos para análises previstas na legislação vigente

Os *kits* encaminhados para análise foram recebidos na Central de Recebimento de Amostras do INCQS e registrados conforme procedimento adotado pelo Instituto, sendo encaminhados ao LSH para análise acompanhados de documentação pertinente ao processo

de análise do produto. No laboratório, a documentação pertinente a análise foi conferida, e na ausência de documentos, a empresa foi notificada. Cada *kit* foi registrado no Caderno de *kits* para diagnóstico, recebendo numeração sequencial de análise no LSH, e armazenado nas condições preconizadas pelos fabricantes, até o momento da análise.

3.4.2 Análise prévia dos *kits* para detecção da dengue

Em atendimento à demanda da GEVIT/GGTPS da ANVISA quanto ao monitoramento efetivo de tais produtos, no contexto das análises prévia, fiscal e de controle preconizadas pela legislação vigente, foi iniciado em maio de 2016 a avaliação dos *kits* de diagnóstico da dengue. A análise prévia inicialmente foi realizada para verificar a conformidade das metodologias ELISA e Teste Rápido quanto aos atributos de sensibilidade e especificidade. Cabe salientar que a análise prévia de produtos sujeitos a Vigilância Sanitária, está prevista na legislação vigente, Lei nº 6360/76 e Resolução RDC nº 36/2015 é efetuada quando há: a) petição de registro do produto; b) petição de revalidação de registro de produto; c) petição de alteração de registro (quando aplicável). A empresa solicitante submete a ANVISA a petição (de registro ou de revalidação), acompanhada de documentação legal e do dossiê técnico inerente ao produto, formando com isso, o processo de registro ou de revalidação.

Uma segunda abordagem, resultante deste trabalho foi a análise de *kits* destinados a detecção molecular do vírus da dengue, que desde então foi agregada a rotina de análise no LSH, em alguns casos de forma combinada ao diagnóstico da Chikungunya e da Zika, doenças que receberam especial atenção pela OMS, que emitiu Alerta Mundial em 2016 e conseqüentemente, tratadas como prioridade para ANVISA.

Além da análise prévia, foi iniciada análise controle, também prevista na legislação vigente, que neste caso foi realizada em atendimento ao Ministério da Saúde na aquisição de *kits* de dengue para distribuição e uso nos serviços de saúde do país (ANEXO D).

Para avaliação dos produtos foram estabelecidos protocolos de análise (APÊNDICES A e B), referentes as metodologias ELISA e TR, respectivamente. Nestes, estão incluídos a matriz amostral, os tipos de amostras a serem avaliadas (sangue, soro ou plasma) e distribuição do quantitativo de amostras a ser empregado para utilização total dos testes encaminhados para análise, sendo: 150 a 200 amostras verdadeiro positivas, de diferentes sorotipos, e 50 a 100 amostras verdadeiro negativas para NS1, IgM e IgG, além de um

quantitativo variável de amostras pertencentes a painel sorológico comercial (PVD 201- *Anti-Dengue Mixed Titer Performance Panel* – Sera Care Life Science®) e Padrão Internacional OMS *Anti-Dengue Virus Types 1+2+3+4*”, (*Reference Reagent 02/186*), e amostras reagentes para HIV, HCV, HBV e HTLV, quando aplicáveis.

Uma parcela do quantitativo de testes encaminhado foi resguardada para reanálise na eventual ocorrência de resultados inconclusivos ou discordantes e as análises seguiram estritamente as instruções de uso dos produtos. Após análise dos resultados, de acordo com o estabelecido nas instruções de uso, os produtos que apresentaram valores de sensibilidade e especificidade maiores ou iguais aos valores declarados foram considerados **SATISFATÓRIOS**. Aqueles que apresentaram valores inferiores aos declarados nas instruções de uso foram considerados **INSATISFATÓRIOS**. Foram incluídos neste trabalho somente os *kits* recebidos para análise prévia ou controle no período de maio de 2016 a março de 2017.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Coleta de amostras para confecção de painéis

No período de março de 2010 a março de 2015 foram obtidas um total de 6.555 amostras. Destas, 5.883 (89,7%) corresponderam a amostras de soro/plasma de indivíduos com suspeita de infecção pela dengue (amostras clínicas) e 672 (10,3%) a unidades de Plasma Fresco Congelado (PFC) como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição das amostras clínicas e de unidades de plasma fresco congelado (PFC) coletadas em serviços de hemoterapia para composição de painel de amostras, por ano de coleta.

Ano	Amostras Clínicas (%)	PFC (%)	Total de Amostras
2010	2.361(40,1)	-	2.361
2011	287 (4,9)	-	287
2012	158 (2,7)	-	158
2013	3.077 (52,3)	136 (20,2)	3.213
2014	-	444 (66,1)	444
2015	-	92 (13,7)	92
Total (%)	5.883 (89,7)	672 (10,3)	6.555

Fonte: (LSH, 2015)

As amostras clínicas foram provenientes de 6 serviços de saúde de 4 municípios do Estado do Rio de Janeiro, e coletadas de março de 2010 a julho de 2013, durante os surtos da dengue ocorridos neste período. A Tabela 2 apresenta o número e o percentual (%) de amostras clínicas, distribuídas por localidade de coleta. A quase totalidade das amostras clínicas (92,8%) foi obtida no município do Rio de Janeiro.

Tabela 2 - Distribuição do quantitativo de amostras clínicas por localidade de coleta no estado do Rio de Janeiro.

Municípios do RJ	Nº de Serviços de Saúde	Amostras Clínicas (%)
Rio de Janeiro	3	5.458 (92,8)
Duque de Caxias	1	405 (6,9)
São João de Meriti	1	8 (0,1)
Nova Iguaçu	1	12 (0,2)
Total	6	5.883

Fonte: (LSH, 2015)

A opção pela obtenção das 5.883 amostras clínicas no estado do Rio de Janeiro (RJ) foi baseada na disponibilidade e viabilidade de captação destas amostras nos Serviços de Saúde. Além disso, o Estado foi e é considerado endêmico, apresentando número elevado de casos da doença desde a entrada do DENV-1 ocorrida em 1986 (NOGUEIRA et al., 1999).

No período de coleta das amostras clínicas (2010-2013), segundo dados do Boletim Epidemiológico/SVS, ocorreram surtos no estado com registros de 29.824 casos em 2010, com predominância do DENV-1. O número de casos registrados no estado nos anos de 2011 e 2012 foi o maior ocorrido em todo o país, 165.787 e 181.169, respectivamente.

O ano de 2013 foi marcado pelo maior surto ocorrido no Brasil com 1.452.489 casos com predominância do DENV-1 (81,7%) seguido de DENV-4 (16,3%) DENV-2 (1,5%) e do DENV-3 (0,5%) e o estado do RJ ocupou a 3ª posição com 213.058 casos registrados (FARES et al., 2015).

Segundo dados da série histórica (2000-2015) apresentada no Boletim Epidemiológico do Sistema de Informação de Agravos de Notificação/ Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses/Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro (SINAN/GDTVZ/SES-RJ) (2015), nos anos de 2011, 2014 e 2015 houve predominância dos sorotipos DENV-1 e nos anos de 2012 e 2013 a do DENV-4, com detecção do DENV-1 no estado do Rio de Janeiro.

Com o propósito de ampliar o quantitativo e obter volume significativo de amostras, foram coletadas unidades de PFC excedentes de doação em 136 Serviços de Hemoterapia das 5 regiões do país no período de janeiro de 2013 a março de 2015. Desta forma, foi acrescida a

este trabalho a possibilidade de avaliar o perfil sorológico de doadores quanto a presença de antígenos e/ou anticorpos da dengue (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição do quantitativo de unidades de plasma fresco congelado (PFC) obtido por região e número de Serviços de Hemoterapia do país.

Fonte: (LSH, 2015)

Região do Brasil	Nº de Serviços de Hemoterapia	Unidades de PFC (%)
Nordeste	17	158 (24)
Norte	32	96 (14)
Centro-Oeste	20	94 (14)
Sudeste	27	134 (20)
Sul	40	190 (28)
Total	136	672

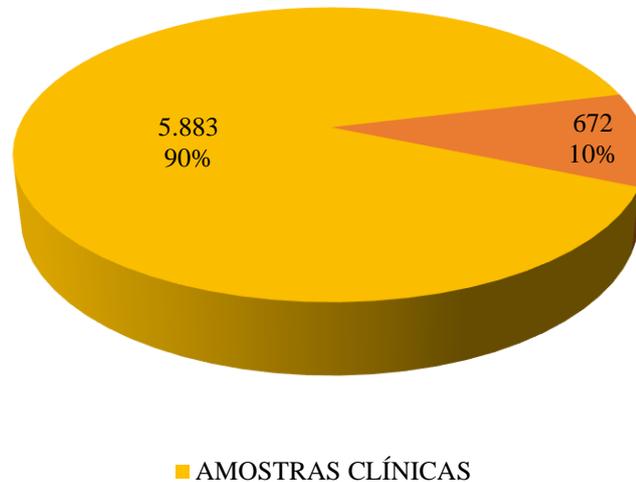
Fonte: (LSH, 2015)

De acordo com os dados obtidos, a Região Sul contribuiu com o maior percentual de amostras coletadas (28%), embora não apresentasse o maior número de casos da doença no período avaliado. Vale ressaltar que a seleção das regiões foi pautada somente na disponibilização do fornecimento de 5 unidades de PFC/serviço.

No período de coleta, todas regiões possuíam registros da doença segundo dados do Boletim Epidemiológico do M.S. (BRASIL, 2015) com maior número de casos registrados na Região Sudeste do país.

Do total de 6.555 amostras recebidas no período de março de 2010 a março de 2015, 90% (5.883/6.555) correspondeu a amostras clínicas com volumes que variaram de 0,2 mL a 2,0 mL e 10% (672/6.555) a unidades de PFC, com volumes de 150 mL a 200 mL (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição do quantitativo de amostras clínicas e de plasma fresco congelado (PFC) recebidas pelo INCQS no período de março de 2010 a março de 2015.

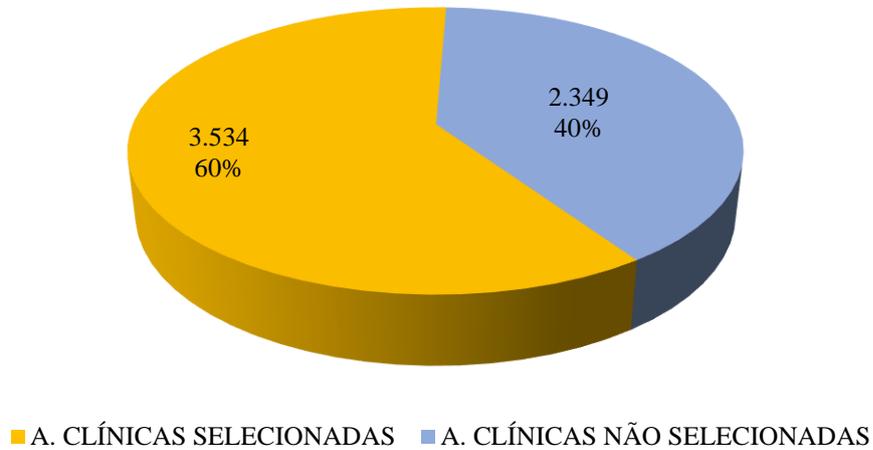


Fonte: (LSH, 2015)

4.2 Seleção das amostras clínicas e PFCs quanto ao volume obtido

Do total de 5.883 amostras clínicas recebidas, após cadastro, foram selecionadas para análise apenas as amostras com volume superior a 1,2 mL, tendo em vista a necessidade de volume significativo para realização dos testes de caracterização e de quantitativo adequado para análise dos diferentes *kits*. As amostras com volume inferior ao estabelecido corresponderam a 40 % (2.349/5.883) e não foram incluídas nesse trabalho. Portanto, foram utilizadas 60% (3.534/5.883) das amostras clínicas obtidas que possuíam volume mínimo estabelecido para as análises (Gráfico 2).

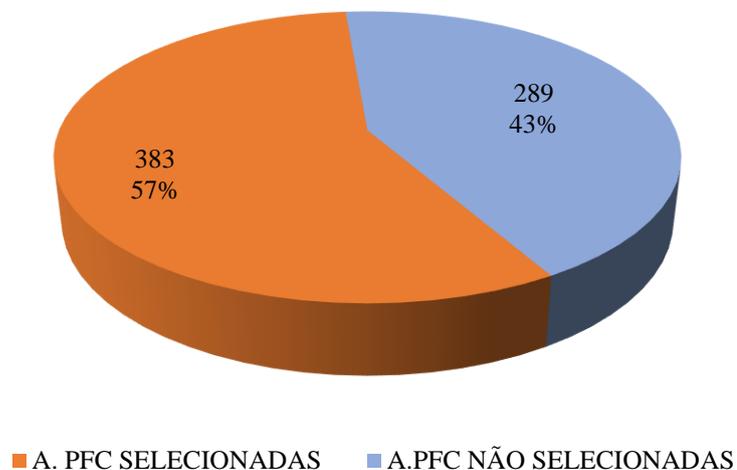
Gráfico 2 - Distribuição das amostras clínicas (A. CLÍNICAS) quanto à seleção para análise em relação ao volume obtido.



Fonte: (LSH, 2015)

Além das amostras clínicas de soro/plasma obtidas, foram acrescentadas 672 amostras de PFC obtidas, com volume superior a 150 mL. Destas, foram submetidas à caracterização 383 (57%). Um total de 289 amostras de PFC (43%) não foram selecionadas para caracterização e, portanto, não utilizadas (Gráfico 3).

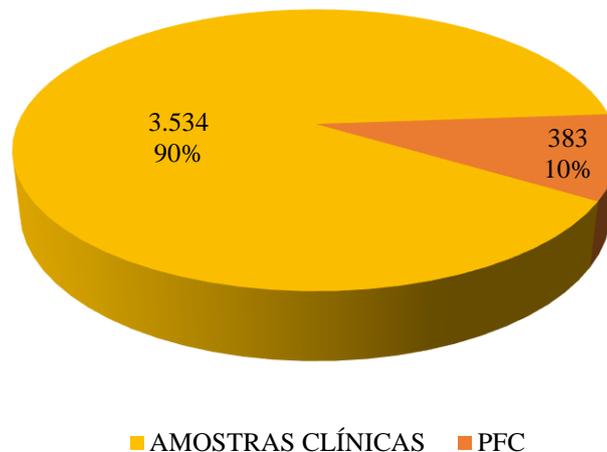
Gráfico 3 - Distribuição das amostras de plasma fresco congelado (A.PFC) com volume adequado superior a 150 mL e A.PFC selecionadas e não selecionadas para caracterização sorológica.



Fonte: (LSH, 2015)

Portanto, foram selecionadas e submetidas à caracterização sorológica para confecção dos painéis sorológicos, compostos de amostras verdadeiro positivas e verdadeiro negativas para dengue um total de 3.917 amostras assim distribuídas: 3.534 (90%) amostras clínicas e 383 (10%) amostras de PFC (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Distribuição das amostras clínicas e do plasma fresco congelado (PFC) selecionadas para caracterização sorológica quanto à detecção de antígenos e anticorpos anti-dengue.



Fonte: (LSH, 2015)

4.3 Caracterização sorológica das amostras

Para realização da segunda etapa deste trabalho que envolveu a caracterização sorológica das amostras, foram estabelecidos critérios para aquisição dos *kits* de diagnóstico. Os critérios foram embasados na obrigatoriedade de utilização de produtos registrados no país, na capacidade de fornecimento pelos distribuidores e/ou fabricantes dos quantitativos e metodologias requeridas, além de preços não abusivos, obedecendo ao prazo determinado para realização e conclusão do trabalho proposto.

Cabe ressaltar que os valores de sensibilidade e especificidade dos *kits* utilizados nesta etapa não nortearam o processo de aquisição dos mesmos que ocorreu de forma aleatória, baseado nos critérios pré-estabelecidos. Desta forma, foram adquiridos no mercado nacional, 08 (oito) *kits* de diagnóstico de metodologias e/ou fabricantes diferentes, empregados na

caracterização das amostras para os marcadores sorológicos da dengue assim distribuídos: 03 (três) *kits* ELISA: *kit* A- ELISA IgM; *kit* B- ELISA IgG; *kit* C- ELISA NS1, assim como 04 (quatro) TRs: *kits* D e E - TRs IgM/IgG, TRs: *kits* F e G – TRs NS1 e 1 (um) teste *kit* H empregando metodologia RT-PCR.

4.3.1 Caracterização sorológica das amostras clínicas

A lógica utilizada para a caracterização das amostras clínicas foi baseada no curso da infecção pelo vírus da dengue, tendo sido iniciada pela pesquisa do antígeno NS1, seguida da pesquisa de anticorpos IgM e IgG, empregando-se *kits* de diferentes metodologias e/ou fabricantes sendo: 01 (um) ELISA e 01 (um) Teste Rápido, (TR), ou ainda em 02 (dois) TRs : 01 TR para a detecção do antígeno NS1, assim como 01 TR para a detecção de anticorpos IgM e IgG da dengue, disponíveis no mercado nacional no período avaliado. Vale ressaltar a inclusão neste trabalho da caracterização molecular para detecção do genoma viral e determinação do sorotipo infectante (DENV-1; DENV-2; DENV-3 e DENV-4), por RT-PCR, quando aplicável.

Testes sorológicos são comumente utilizados para diagnosticar infecções por dengue devido à sua facilidade de utilização quando comparados às técnicas envolvendo cultura de células ou detecção de RNA (PEELING et al., 2010).

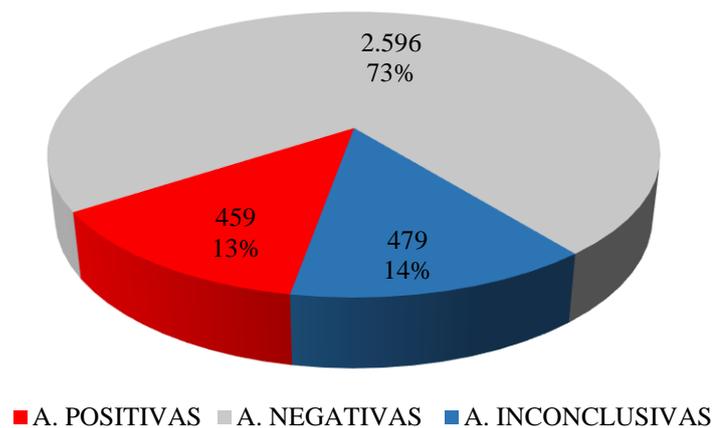
Os testes sorológicos imunoenzimáticos (ELISA) e imunocromatográficos (TR) são utilizados com maior frequência no diagnóstico sorológico da dengue tanto para a pesquisa de antígeno NS1 quanto para a pesquisa de anticorpos IgM e IgG e por isso foram utilizados na caracterização das amostras (LIMA et al., 2010; GILL et al., 2016). O TR é particularmente importante em ambientes de saúde e em estudos epidemiológicos, não requerendo equipamentos sofisticados para sua execução, enquanto o ELISA tem sua aplicabilidade restrita a laboratórios.

A detecção do genoma viral por RT-PCR também foi aplicada, uma vez que o diagnóstico molecular é de grande importância para identificação dos sorotipos virais circulantes, contribuindo para o sistema de vigilância epidemiológica da doença (SANTIAGO et al., 2013; NAJIOULLAH; VIRON; CESAIRE, 2014; SASMONO et al., 2014).

4.3.1.1 Análise das amostras clínicas quanto a presença do antígeno NS1 do DENV

A partir das 3.534 amostras clínicas selecionadas por volume, foi iniciada a caracterização quanto a presença ou não de antígeno NS1, obtendo-se os seguintes resultados: 13% (459/3.534) corresponderam a amostras positivas para o antígeno NS1, 73% (2.596/3.534) a amostras negativas e 14% (479/3.534) a amostras inconclusivas (Gráfico 5). As amostras consideradas inconclusivas, ou seja, com resultados discordantes do primeiro teste, foram excluídas e, portanto, não fizeram parte desse trabalho.

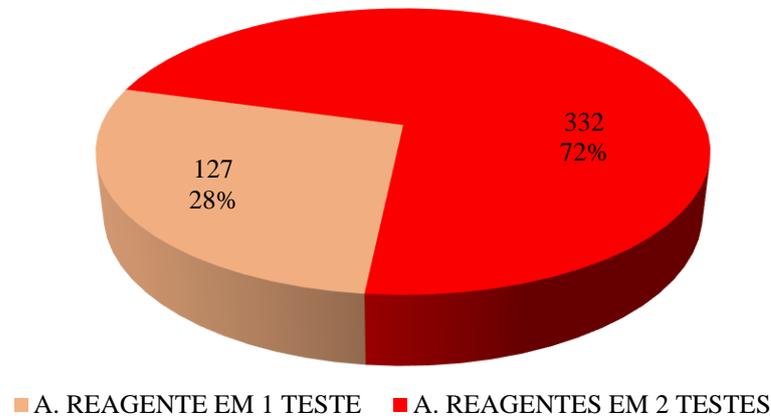
Gráfico 5 - Caracterização das amostras clínicas (A.) quanto à presença do antígeno NS1.



Fonte: (LSH, 2015)

Das 459 amostras reagentes para NS1 no primeiro teste, 28% (127/459) foram positivas somente para 1 dos testes realizados e 72% (332/459) foram reagentes em 2 testes empregando-se metodologias e/ou fabricantes diferentes, confirmando a positividade para o antígeno NS1. Cabe destacar que as amostras negativas em ambos testes para detecção do antígeno NS1, foram segregadas para análise posterior quanto a presença de anticorpos IgG e/ou IgM anti-dengue. Desta forma, seguiram para a etapa posterior da caracterização, 332 amostras reagentes para NS1 em 2 testes. As 127 mostras reagentes em apenas 1 teste, não foram utilizadas neste estudo, por apresentar resultados discordantes (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Distribuição das amostras clínicas reagentes para NS1 em 01 e em 02 testes de metodologias (ELISA e TR) e/ou fabricantes diferentes (N= 459).

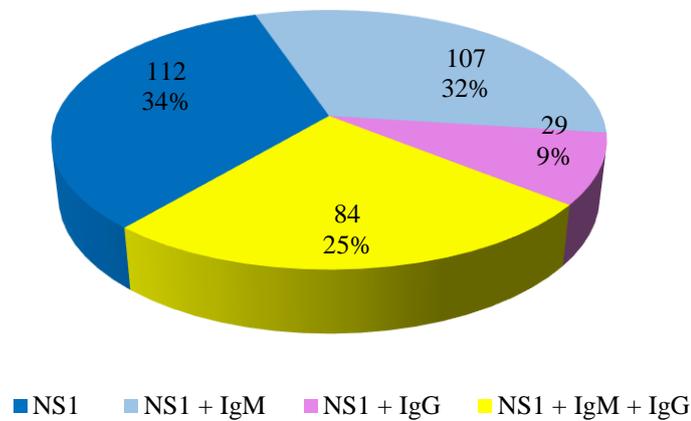


Fonte: (LSH, 2015)

4.3.1.2 *Análise das amostras clínicas quanto a presença de antígeno NS1 associada a anticorpos IgM e IgG da dengue*

Seguindo-se a caracterização do painel de amostras, investigou-se a presença de anticorpos IgM e IgG da dengue nas 332 amostras positivas em 02 testes para NS1. Destas, 112 (34%) confirmaram a reatividade apenas para o antígeno NS1, ou seja, não foram reagentes para os anticorpos IgM e IgG. Das 220 (66%) amostras NS1 restantes, 107 (32%) apresentaram reatividade associada a anticorpos IgM, 29 (9%) amostras a anticorpos IgG e 84 (25%) aos anticorpos IgM e IgG. Todas as 220 amostras foram submetidas a mais 1 teste para confirmação da positividade ou não para anticorpos IgM e/ou IgG associados a antígenos NS1 (Gráfico 7).

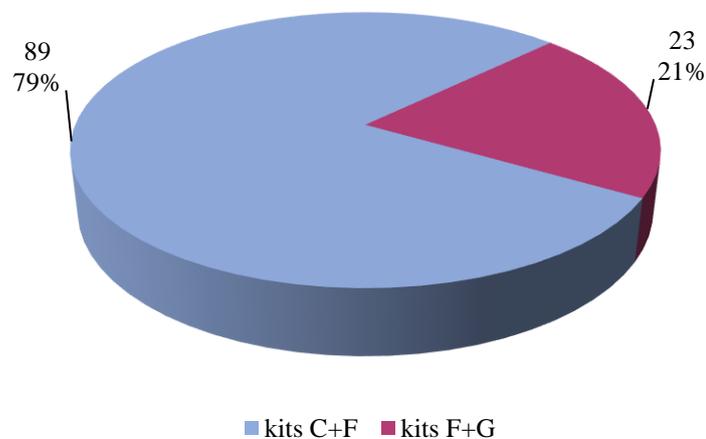
Gráfico 7- Amostras clínicas confirmadas reagentes para NS1 e NS1 associado a anticorpos IgM e/ou IgG (N=332).



Fonte: (LSH, 2015)

Nas 112 amostras reagentes apenas para NS1, foram utilizados 02 testes combinados de metodologias e/ou fabricantes diferentes, assim distribuídos: ELISA+TR (*kits* C+F) em 79% (89/112) das amostras ou TR+TR (*kits* F+G) em 21% (23/112) como demonstrado no Gráfico 8. O valor médio da razão (DO/CO) das amostras avaliadas pelo teste de ELISA foi de 3,7 confirmando, portanto, a alta reatividade das amostras.

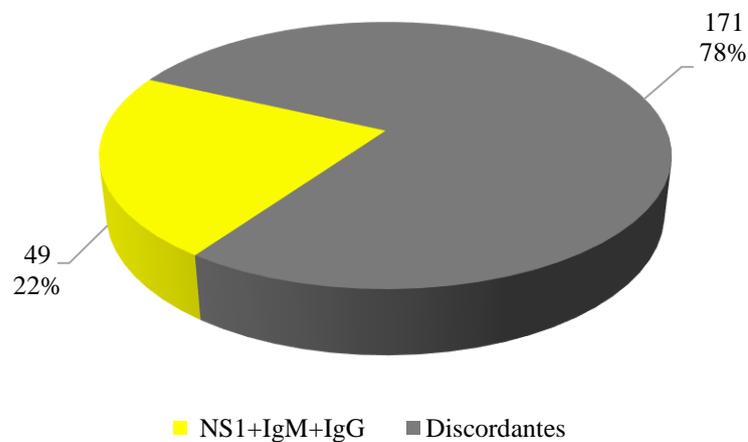
Gráfico 8 - Distribuição dos *kits* de diagnóstico utilizados nas análises de amostras clínicas positivas somente para o antígeno NS1 da dengue (N=112).



Fonte: (LSH, 2015)

Com a finalidade de confirmar a presença de antígeno NS1 associada a anticorpos IgM, e IgG as 220 amostras foram analisadas por um segundo teste para a pesquisa de anticorpos (IgM/IgG), apresentando os seguintes resultados: 22% (49/220) das amostras reagentes tanto para NS1 quanto para anticorpos IgM e IgG e continuaram na caracterização, enquanto que 78% (171/220) apresentaram resultados discordantes ao primeiro teste e, portanto, não foram utilizadas neste estudo (Gráfico 9).

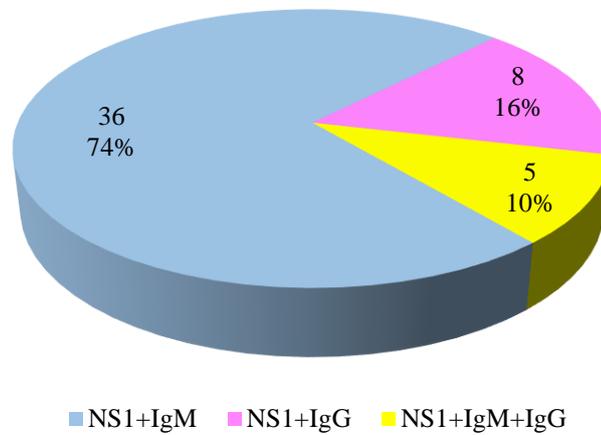
Gráfico 9 - Distribuição das amostras clínicas reativas para NS1+IgM+IgG confirmadas e amostras com resultados discordantes nos 2 testes sorológicos para detecção da dengue (N=220).



Fonte: (LSH, 2015)

Das 49 amostras reagentes tanto para antígeno NS1, quanto para anticorpos IgM e/ou IgG combinados: a) 74% (36/49) foram reagentes para antígeno NS1 e anticorpos IgM; b) 16% (08/49) para antígeno NS1 e anticorpos IgG; 10% (05/49) reagentes para antígeno NS1, anticorpos IgM e IgG em 2 testes combinados de metodologias e/ou fabricantes diferentes realizados para cada um dos marcadores avaliados (Gráfico 10).

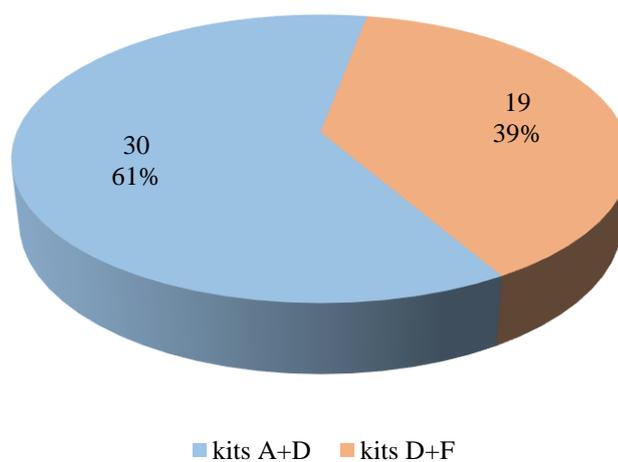
Gráfico 10 - Demonstrativo de amostras clínicas reagentes para antígeno NS1 e anticorpos IgM e/ou IgG anti-dengue (N=49).



Fonte: (LSH, 2015)

A presença do antígeno NS1 combinada aos anticorpos IgM e IgG foi avaliada empregando 02 testes combinados de metodologias e/ou fabricantes diferentes, assim distribuídos: das 49 amostras reagentes, 61% das amostras (30/49) empregou: ELISA+TR-*kits* A+D e em 39% (19/49): TR+TR- *kits* D+F (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Distribuição dos *kits* de diagnóstico A e D (Quadros 1 e 2); D e F (Quadro 2) utilizados nas análises de amostras clínicas (N=49) quanto à presença do antígeno NS1 combinado aos anticorpos IgM e/ou IgG da dengue.

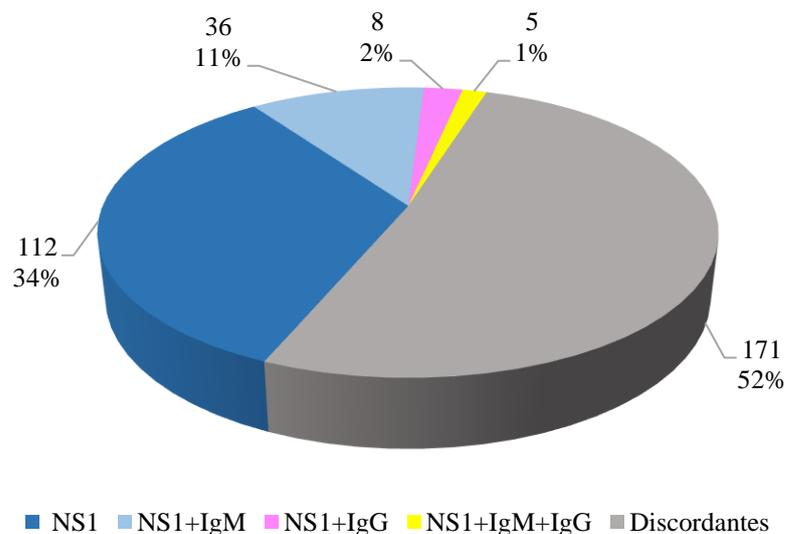


Fonte: (LSH, 2015)

O valor médio da razão (DO/CO) obtido no teste de ELISA aplicado foi de 7,6, confirmando com isso, a alta reatividade das amostras analisadas pela metodologia ELISA.

Das 332 amostras reagentes em 2 testes para o antígeno NS1 que seguiram na caracterização, foram sequencialmente aplicadas à 01 ou mais testes para pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-dengue, apresentando os seguintes resultados: a) 34% (112/332) amostras foram consideradas verdadeiramente positivas para o antígeno NS1; b) 11% (36/332) amostras que foram reagentes para o antígeno NS1 e anticorpos IgM; c) 2%; (08/332) amostras que foram reagentes para o antígeno NS1 e anticorpos IgG; d) 1%; (05/332) amostras reagentes para o antígeno NS1 e para anticorpos IgM e IgG, simultaneamente. Vale lembrar que, 52% das amostras (171/332) com resultados discordantes, não foram utilizadas neste estudo (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Distribuição das amostras clínicas verdadeiro-positivas para NS1 e NS1 combinado a anticorpos IgM e/ou IgG anti-dengue (N=332).



Fonte: (LSH, 2015)

O antígeno NS1 é fortemente imunogênico e tem relação com a viremia da dengue. ELISAs e TR são capazes de detectá-lo no plasma, soro e sangue total, sendo o diagnóstico de rotina da dengue realizado mundialmente por esses métodos (ZAINAH et al., 2009; HERMANN, et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Segundo dados da literatura, altos níveis da proteína NS1 foram demonstrados circulando na fase aguda da dengue por ELISA e TR nas infecções primárias e secundárias até o nono dia após o início de sintomas. De acordo com

estudos prévios pode ser confirmada a presença do NS1 entre os dias 0 a 9 da infecção com pico nos dias 6 a 10 (LIMA et al., 2010; CORDEIRO, 2012; HUSPENGER et al., 2016).

Nesta primeira etapa, foram compostos painéis de amostras clínicas verdadeiramente positivas para NS1, NS1+IgM; NS1+IgG e NS1+IgM+IgG, caracterizadas por diferentes metodologias (ELISA e TR) e/ou fabricantes diferentes, compostos de amostras que apresentaram alta reatividade quanto à presença de antígenos NS1, como observado nos valores da razão (DO/CO) obtidos nos testes de ELISA.

O maior número de amostras clínicas obtidas (N=112) foi referente a presença do antígeno NS1 não associado a anticorpos IgM e/ou IgG. Tal fato se deve a presença do antígeno NS1 ocorrer desde o início dos sintomas da doença, período em que há maior procura por diagnóstico em serviços de saúde e consequentemente, o maior número de amostras reagentes para a presença deste antígeno (LIMA et al., 2010). É possível sugerir que as amostras selecionadas nesta etapa para composição do painel NS1 pertenciam a indivíduos com infecção primária da dengue, uma vez que anticorpos IgG não foram detectados.

A presença do antígeno NS1 associado a anticorpos IgM foi verificada em 36 amostras, entretanto a detecção de anticorpos IgM ocorre em média no 5º dia da doença e nesta fase podem aparecer associados a presença do antígeno NS1. Possivelmente, as amostras caracterizadas quanto a presença de antígenos NS1 associado a anticorpos IgM, são equivalentes ao perfil da infecção primária recente pelo DENV (LIMA et al., 2012).

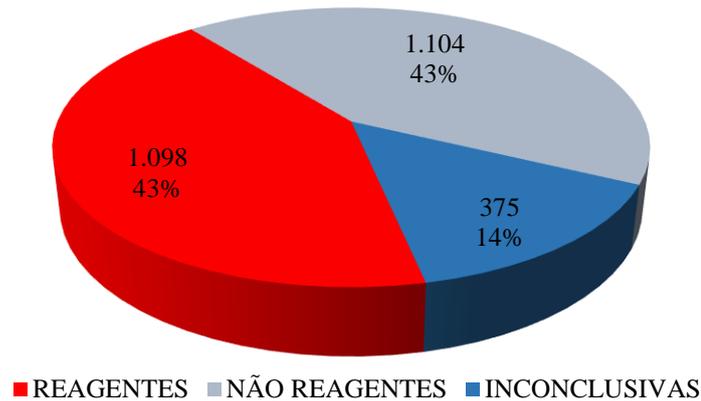
A detecção do antígeno NS1 associada a anticorpos IgG foi obtida em um quantitativo reduzido de amostras (N=8), possivelmente por tratar-se de infecção secundária recente onde observa-se o declínio do antígeno NS1, cuja detecção é observada em média até o 9º dia após início dos sintomas e títulos de IgG elevados e/ou IgM provavelmente ocorreram em indivíduos com infecção secundária onde o nível desses anticorpos é detectável desde os primeiros dias dos sintomas (LIMA et al., 2012).

4.3.1.3 Análise de amostras clínicas quanto a presença de anticorpos IgM e combinados IgM e IgG anti-dengue

Do total de 2.596 amostras negativas no primeiro teste para NS1, 2.577 foram analisadas quanto a presença de anticorpos IgM e 19 amostras foram excluídas do estudo por perda de volume. Na primeira análise, foi realizado 01 teste para detecção de anticorpos IgM

anti-dengue e, 43% (1.098/2.577) das amostras foram reagentes para IgM; 43% (1.104/2.577) foram não reagentes e 14% (375/2.577) apresentaram resultados inconclusivos (Gráfico 13).

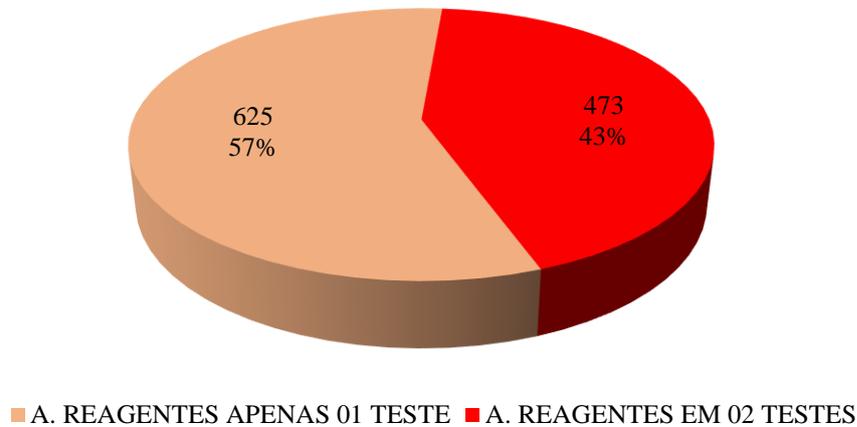
Gráfico 13 - Amostras clínicas de indivíduos com suspeita de dengue (N= 2.577) analisadas por 01 teste para detecção de anticorpos IgM da dengue.



Fonte: (LSH, 2015)

As 1.098 amostras reagentes para anticorpos IgM anti-dengue foram analisadas em um segundo teste e, 57% (625/1.098) foram reagentes em apenas 01 teste e 43% (473/1.098) apresentaram resultados positivos nos 02 testes para detecção de anticorpos IgM anti-dengue. As 625 amostras foram excluídas da análise por apresentarem resultados divergentes nos 2 testes. As 473 amostras que foram positivas para presença de anticorpos IgM anti-dengue nos 02 testes foram, posteriormente, submetidas à 02 testes para pesquisa de IgG anti-dengue (Gráfico 14).

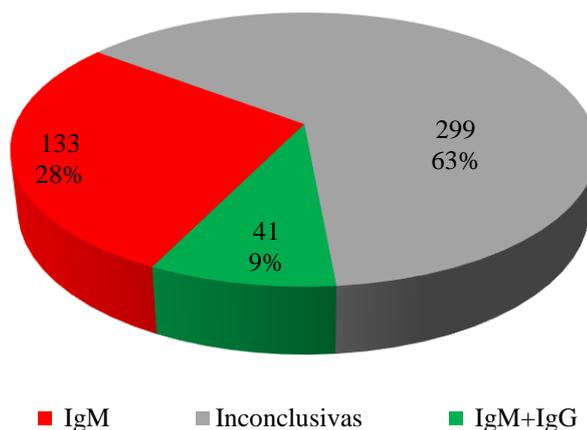
Gráfico 14 - Amostras clínicas de indivíduos com suspeita de dengue (N= 1.098) analisadas quanto à presença de anticorpos IgM.



Fonte: (LSH, 2015)

Um total de 133 (28%) amostras foi reagente para anticorpos IgM anti-dengue e 41 (9%) para anticorpos IgM e IgG, simultaneamente. As 299 amostras (63%) que apresentaram resultados inconclusivos foram excluídas e não fizeram parte deste estudo (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Amostras clínicas de indivíduos com suspeita de dengue (N=473) confirmadas reagentes para anticorpos IgM analisadas quanto à presença de anticorpos IgG.

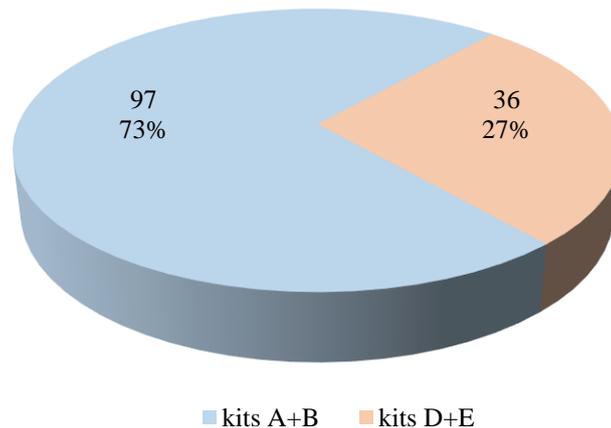


Fonte: (LSH, 2015)

A presença concomitante dos anticorpos IgM e IgG anti-dengue foi avaliada empregando-se 02 testes combinados de metodologia e/ou fabricantes diferentes, assim distribuídos para as 133 amostras confirmadas quanto a presença de anticorpos IgM anti-

dengue: ELISA+ELISA- kits A+B em 73% (97/133) das amostras; ou TR+TR- kits D+E em 27% (36/133) das amostras (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Distribuição dos kits de diagnóstico A e B (Quadro 1); kits D e E (Quadro 2) utilizados nas análises das amostras clínicas de indivíduos com suspeita de dengue (N=133) quanto à presença combinada dos anticorpos IgM e IgG.



Fonte: (LSH, 2015)

O valor médio da razão (DO/CO) do teste de ELISA (IgM) foi de 7,6 sugestivo de amostras fortemente reativas de indivíduos com infecção primária, e do ELISA (IgG) foi de 7,4; confirmando a alta reatividade das amostras analisadas pela metodologia ELISA.

Do total de 473 amostras reagentes em 02 testes para anticorpos IgM sequencialmente analisadas em 01 ou mais testes, para anticorpos IgM e anticorpos IgG, 28% (133/473) foram consideradas verdadeiro positivas para anticorpos IgM anti-dengue por apresentarem resultados negativos para IgG. Um total de 9% (41/473) de amostras positivas para IgM e IgG foram consideradas verdadeiro positivas para IgM e IgG anti-dengue. A positividade para anticorpos IgM e IgG indicam infecção secundária recente.

As 299 amostras restantes (63% do total) não foram utilizadas no estudo por apresentarem resultados discordantes.

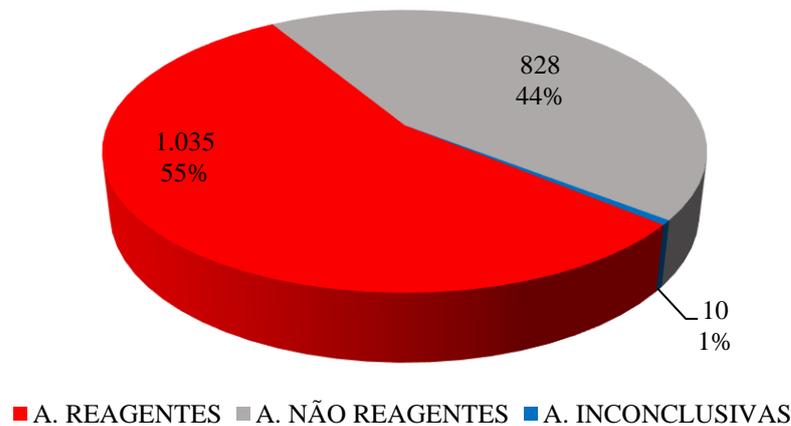
A detecção de amostras reativas para IgM (N=133) sem a presença de anticorpos IgG é indicativa de amostras de indivíduos com infecção primária. A maior parte dos indivíduos que são acometidos pela dengue apresenta níveis detectáveis de IgM no sexto dia após o aparecimento de sintomas, e são mantidos em média por duas semanas, com redução após 90

dias (NOGUEIRA et al., 1992). Quando associados a anticorpos IgG podem ser sugestivos de infecção secundária recente (LIMA et al., 2012).

4.3.1.4 Análise de amostras clínicas quanto à presença de anticorpos IgG da dengue

Um total de 1.104 amostras negativas para anticorpos IgM anti-dengue foi utilizado para à caracterização quanto a presença unicamente de anticorpos IgG anti-dengue. Além destas amostras, foram acrescentadas 769 novas amostras clínicas, totalizando 1.873 amostras. Estas amostras foram inicialmente analisadas por 01 teste para detecção de anticorpos IgG anti-dengue e, 55% (1.035/1.873) das amostras foram reagentes para anticorpos IgG; 44% (828/1.873) foram negativas e 1% (10/1.873) apresentou resultado inconclusivo (Gráfico 17).

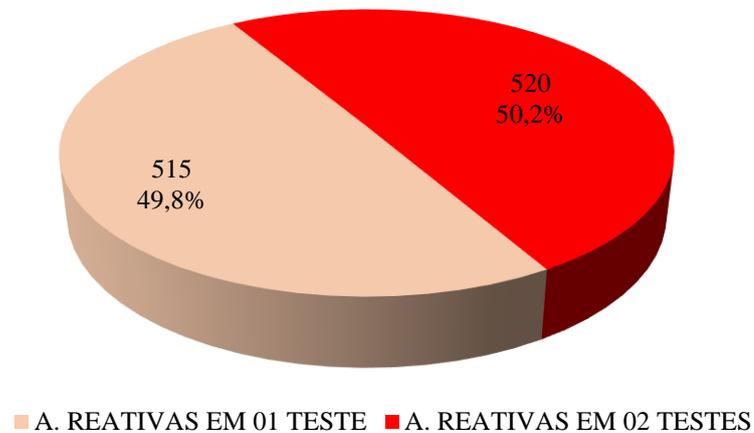
Gráfico 17 - Amostras clínicas (A) de indivíduos com suspeita de dengue analisadas por 01 teste para a detecção de anticorpos IgG (N=1.873).



Fonte: (LSH, 2015)

As 1.035 amostras reagentes em 01 teste para detecção de anticorpos IgG anti-dengue foram analisadas em um segundo teste e, 50,2% (520/1.035) das amostras apresentaram a segunda reatividade para anticorpos IgG e 49,8% (515/1.035) das amostras não confirmaram a presença deste anticorpo e, conseqüentemente, não foram incluídas neste trabalho (Gráfico 18).

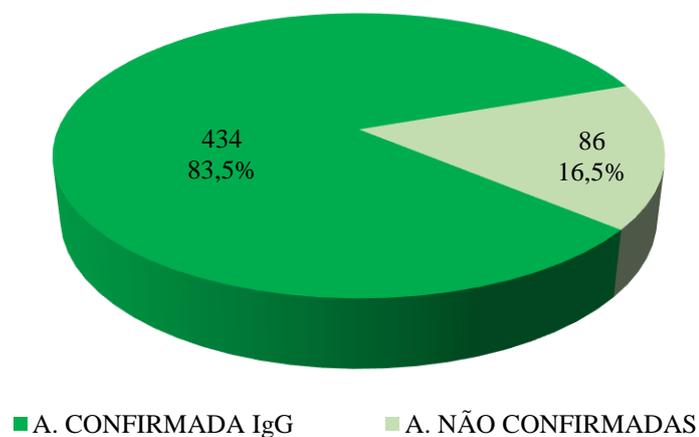
Gráfico 18 - Amostras clínicas (A) de indivíduos com suspeita de dengue reagentes em 01 e 02 testes para anticorpos IgG da dengue (N=1.035).



Fonte: (LSH, 2015)

Vale ressaltar que, na análise das 520 amostras reagentes para anticorpos IgG foram utilizados testes combinados para anticorpos IgM e IgG (ELISA- *kit* B e TR- *kits* D+E). A partir destes testes, 434 amostras (83,5%) confirmaram positividade para anticorpos IgG e 86 amostras (16,5%) não confirmaram e, conseqüentemente não fizeram parte deste trabalho. (Gráfico 19). O valor médio da razão DO/CO destas amostras no ELISA foi de 7,4.

Gráfico 19 - Amostras clínicas (A) de indivíduos com suspeita de dengue (N=520) analisadas quanto à confirmação de reatividade aos anticorpos IgG da dengue.



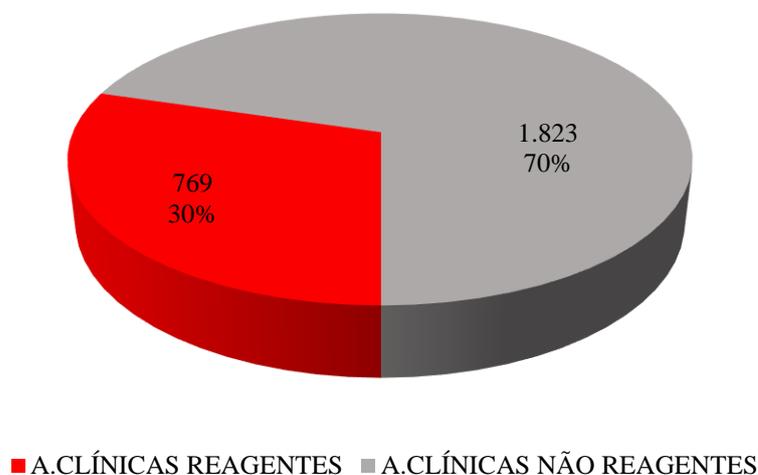
Fonte: (LSH, 2015)

Anticorpos IgG na infecção primária por DENV são detectados, em geral, a partir do quinto dia da doença, são tipo-específicos e permanecem por toda a vida. Na reinfeção, por um sorotipo heterólogo, o título de anticorpos IgG aumenta nos primeiros dias e podem ser detectados mesmo na fase aguda da doença (GUZMAN et al., 2010). O perfil das amostras caracterizadas como reagentes para anticorpos IgG é sugestivo de amostras de indivíduos com infecção secundária recente, corroborando com os valores de razão (D.O/C.O.) obtidos e com o *status* da doença, onde os indivíduos com sintomatologia buscam o diagnóstico.

A etapa de caracterização das amostras clínicas com a finalidade de compor painéis sorológicos para análise de *kits* de diagnóstico para detecção da infecção pela dengue incluiu inicialmente o quantitativo de 2.592 amostras que apresentaram resultados reagentes em pelo menos 01 teste para NS1 e/ou IgM e/ou IgG utilizados em uma primeira etapa para identificação de reatividade sendo: 459 amostras confirmadas para NS1; 1.098 amostras para IgM e 1.035 amostras para IgG. De acordo com o resultado obtido, as amostras prosseguiram nos diferentes testes adicionais utilizados nesta caracterização.

Ao realizar o segundo teste para os diferentes alvos utilizados para o diagnóstico de dengue, 30% das amostras (769/2.592) confirmaram reatividade para os marcadores NS1, IgM e IgG e 70% das amostras (1.823/2.592) foram não reagentes, e consequentemente, não foram utilizadas nesta etapa do estudo, (Gráfico 20).

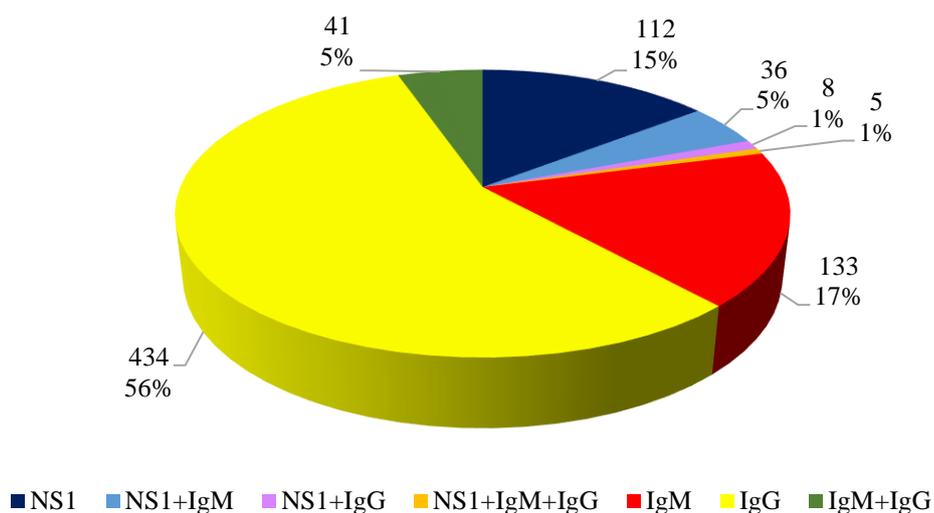
Gráfico 20 - Distribuição de amostras clínicas reagentes (N=769), e não reagentes (N=1.823) confirmadas em 02 testes sorológicos quanto a presença de antígeno NS1, combinados ou não a anticorpos IgM e IgG da dengue.



As 769 amostras clínicas reagentes para NS1 combinadas ou não a anticorpos IgM e IgG anti-dengue, fizeram parte dos painéis de amostras verdadeiro positivas (VP) e foram assim distribuídas: a) amostras VP apenas para antígeno NS1 (N=112), amostras VP para NS1+IgM (N=36); para NS1+IgG (N=8) e para NS1+IgM+IgG (N=5); b) amostras VP apenas para anticorpos IgM (N=133) e VP IgM+IgG (N=41) e c) amostras VP para anticorpos IgG, (N=434).

O Gráfico 21 mostra a distribuição numérica e percentual das amostras clínicas verdadeiramente positivas para os marcadores sorológicos da dengue, distribuídas nos diferentes painéis sorológicos confeccionados.

Gráfico 21 - Distribuição de amostras clínicas confirmadas em 02 diferentes testes sorológicos para a detecção do antígeno NS1, anticorpos IgM e IgG da dengue em diferentes associações (N=769).



Fonte: (LSH, 2015)

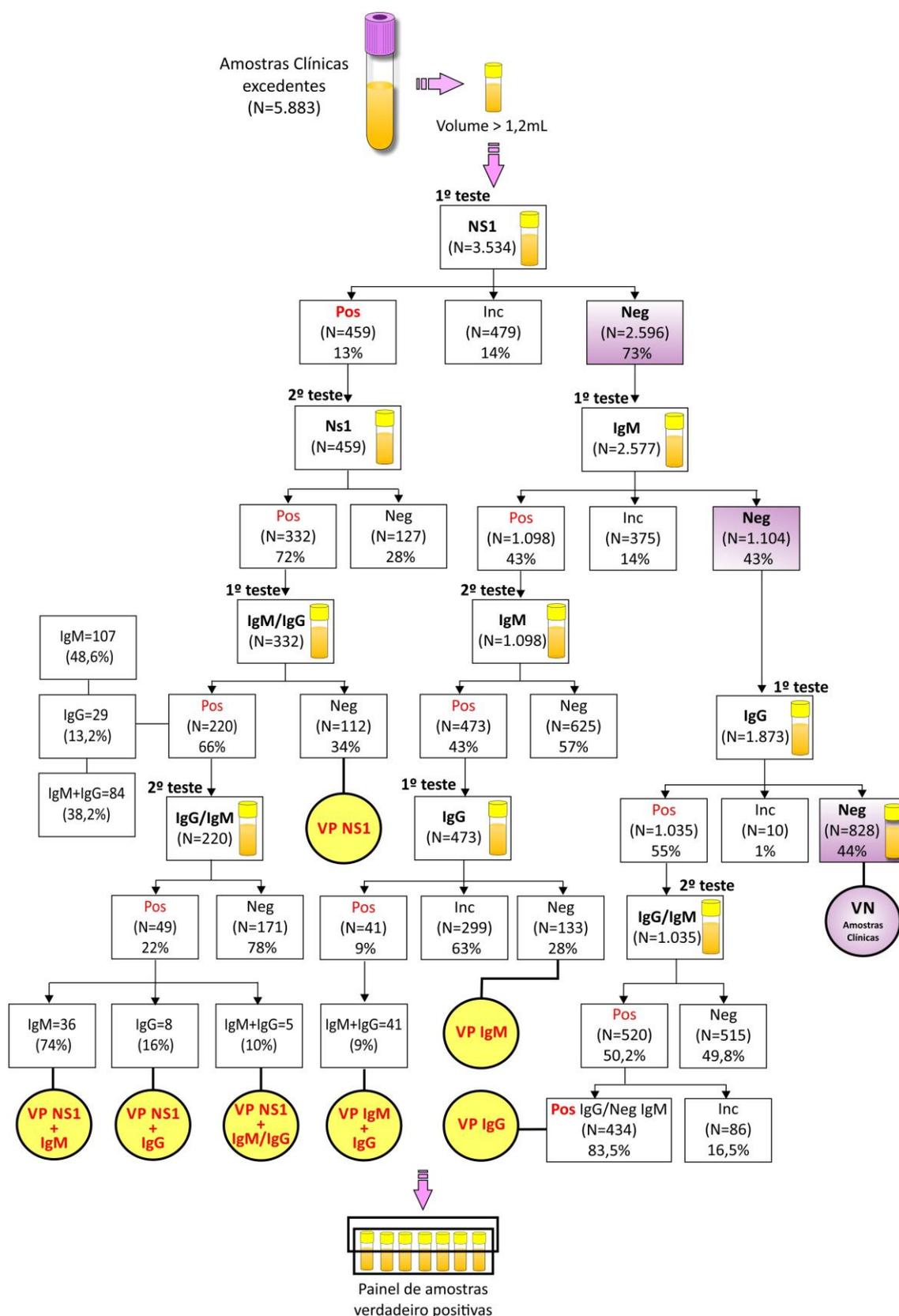
4.3.1.5 Análise de amostras clínicas quanto a ausência de antígeno NS1, anticorpos IgM e IgG anti-DENV – Painel de amostras verdadeiramente negativas

Do total de 828 amostras negativas para a pesquisa de antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG anti-dengue foram selecionadas 221 amostras com volume superior a 1,2 mL que apresentaram resultados não reagentes em pelo menos 2 testes que constituíram o painel de amostras clínicas verdadeiro negativas (Fluxograma 1).

As amostras clínicas avaliadas com resultados não reagentes para antígeno e/ou anticorpos anti-dengue, são provavelmente pertencentes à indivíduos que apresentavam sintomatologia semelhante à da dengue ou ainda, níveis de antígeno e/ou anticorpos não detectáveis, uma vez que não tiveram o diagnóstico confirmado pelos testes sorológicos e/ou moleculares utilizados.

O Fluxograma 1 apresenta todas as etapas realizadas e os resultados obtidos na caracterização das amostras clínicas como verdadeiramente positivas para o antígeno NS1 e os anticorpos IgM e IgG anti-dengue e verdadeiramente negativas visando a confecção de painéis sorológicos.

Fluxograma 1 - Sequência de testes realizados e resultados obtidos na caracterização de amostras clínicas como verdadeiramente positivas (VP) e negativas (VN), quanto ao antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG da dengue.



Fonte: LSH, 2017

Pos: Positivas; Neg: Negativas; Inc: Inconclusivas

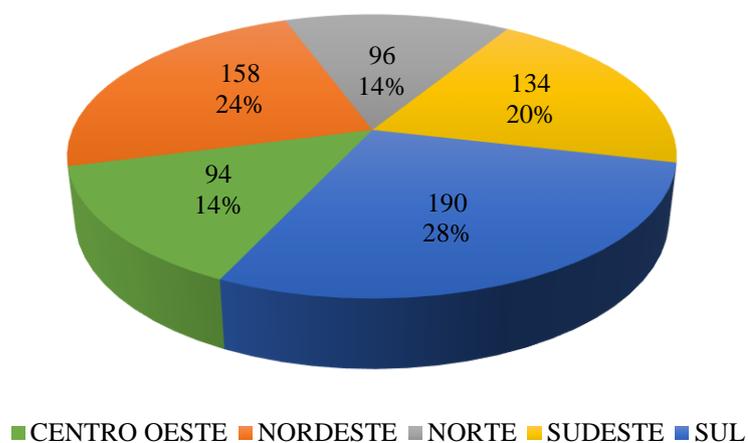
4.3.2 Caracterização das unidades de plasma fresco congelado (PFC)

A inclusão de amostras de plasma fresco congelado (PFC), hemocomponente obtido por centrifugação de bolsa de sangue total e posterior congelamento, excedentes de doação, teve como objetivo principal a complementação do quantitativo de amostras e de acréscimo de volumes de plasma para confecção dos painéis sorológicos. Entretanto, a transmissão do DENV associado a transfusão sanguínea reconhecida somente em 2008 (POZZETTO et al., 2015) é mais comum do que se conhece, devido a elevada proporção de infecções assintomáticas (53% a 87%) e a elevada incidência de ocorrência da doença, especialmente durante os surtos, um número substancial de doadores pode possuir o DENV no momento da doação sanguínea (DIAS et al., 2012; RIBAS-SILVA; EID, 2012; POZZETTO et al., 2015).

Em estudo realizado por Sabino e colaboradores (2016) em doadores do Rio de Janeiro e Recife em uma grande epidemia de infecção pelo DENV-4 no Brasil, um percentual superior a 0,5% das doações foram RNA positivas e aproximadamente um terço dos componentes resultou em dengue transfusional. Durante períodos epidêmicos máximos, 1% a 2% das doações podem ser positivas para o RNA do vírus e 0,3% a 0,6% de todas as transfusões podem transmitir a doença. Para a garantia do sangue transfundido, algumas ações devem ser tomadas envolvendo desde a captação de doadores à triagem clínica e epidemiológica, realizada de forma criteriosa, além da triagem sorológica de doadores que é prevista em breve em países tropicais e subtropicais (RIBAS-SILVA; EID, 2012).

Sendo assim, avaliamos o perfil sorológico dos doadores analisando as amostras de PFC, coletadas em Serviços de Hemoterapia das 5 regiões do país. O número total de 672 unidades de PFC coletadas no período de janeiro de 2013 a março de 2015, assim representadas: 24% das amostras (158/672) provenientes da região Nordeste; 28% das amostras (190/672) provenientes da região Sul; 20% das amostras (134/672) provenientes da região Sudeste; 14% das amostras (94/672) provenientes da região Centro-Oeste e 14% das amostras (96/672) provenientes da região Norte (Gráfico 22).

Gráfico 22 - Quantitativo de unidades de plasma fresco congelado obtidos por Região do país entre 2013 e 2015, para confecção de painel sorológico (N=672).

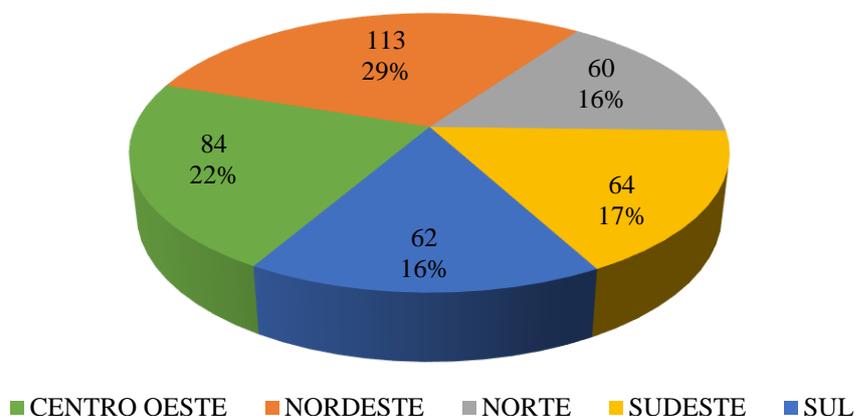


Fonte: (LSH, 2015)

4.3.2.1 Análise de PFC quanto a presença do antígeno NS1 do DENV

Das 672 amostras de PFC recebidas, 383 foram selecionadas para inclusão neste trabalho, e foram provenientes das seguintes macrorregiões do país: a) Centro Oeste- 84 amostras; b) Nordeste- 113 amostras; c) Norte- 60 amostras; d) Sudeste- 64 amostras; e) Sul- 62 amostras (Gráfico 23).

Gráfico 23 - Distribuição das amostras de plasma fresco congelado coletado no período de 2013 a 2015 por macrorregião do país selecionados para o estudo (N=383).



Fonte: (LSH, 2015)

As 383 amostras de PFC foram avaliadas quanto a presença de antígeno NS1, pelas metodologias ELISA e/ou TR (*kits* C e F) e destas, 1,3% (5/383) foram reagentes, 97,9% (375/383) não reagentes e 0,8% (3/383) apresentaram resultado inconclusivo. Amostras reagentes para antígeno NS1 foram observadas em PFC obtidos nas 5 regiões analisadas (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição das amostras de plasma fresco congelado coletados no período de 2013 a 2015 avaliadas quanto a presença de antígeno NS1 (N=383).

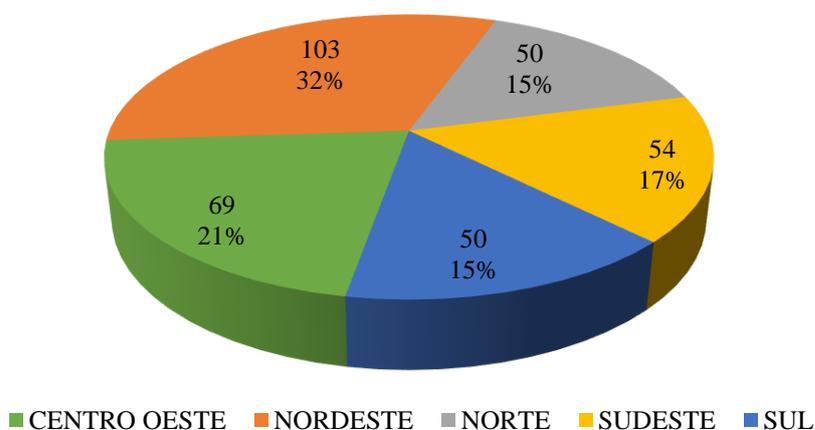
Região	Reagentes	Não Reagentes	Inconclusivas	Total
Centro Oeste	01	81	02	84
Nordeste	01	111	01	113
Norte	01	59	-	60
Sudeste	01	63	-	64
Sul	01	61	-	62
Total (%)	05 (1,3)	375 (97,9)	03 (0,8)	383

Fonte: (LSH, 2015)

4.3.2.2 *Análise de PFC quanto a detecção de anticorpos IgM anti-dengue*

Para a detecção de anticorpos IgM anti-dengue, foram avaliadas 326 amostras de PFC pelas metodologias ELISA e/ou TR (*kits* A e E) assim distribuídas por macrorregião do país: a) Centro Oeste- 69 amostras; b) Nordeste- 103 amostras; c) Norte- 50 amostras; d) Sudeste- 54 amostras; e) Sul- 50 amostras (Gráfico 24).

Gráfico 24 - Distribuição das amostras de plasma fresco congelado analisadas quanto à presença de anticorpos IgM da dengue por macrorregião do país (N=326).



Fonte: (LSH, 2015)

Destas, 0,9% (3/326) foram reagentes para IgM anti-dengue e provenientes das regiões Centro-Oeste e Nordeste, 95,7% (312/326) foram não reagentes e 3,4% (11/326), apresentaram resultado inconclusivo (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das amostras de plasma fresco congelado coletadas no período de 2013 a 2015 avaliadas quanto a presença de anticorpos IgM anti-dengue (N=326).

Região	Reagentes	Não Reagentes	Inconclusivas	Total
Centro-Oeste	02	63	04	69
Nordeste	01*	97	05	103
Norte	-	50	-	50
Sudeste	-	52	02	54
Sul	-	50	-	50
Total (%)	03(0,9)	312 (95,7)	11(3,4)	326

Fonte: (LSH, 2015)

*amostra reagente IgM/IgG

4.3.2.3 Análise das unidades de PFC quanto a detecção de anticorpos IgG anti-dengue

Foram avaliadas 326 amostras de PFC já avaliadas quanto a presença de anticorpos IgM anti-dengue analisadas pelas metodologias ELISA e/ou TR (*kits* B e D) para pesquisa de anticorpos IgG, que apresentaram a seguinte distribuição por macrorregião do país: a) Centro Oeste- 69 amostras; b) Nordeste- 103 amostras; c) Norte- 50 amostras; d) Sudeste- 54 amostras; e) Sul- 50 amostras. Destas, 11,7% (38/326) foram reagentes para IgG anti-dengue e provenientes de todas as regiões com exceção da região Sul e 88,3% (288/326) apresentaram resultado não reagente (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição das amostras de plasma fresco congelado avaliadas coletadas no período de 2013 a 2015 quanto a presença de anticorpos IgG anti-dengue (N=326).

Região	Reagentes	Não Reagentes	Total
Centro Oeste	06	63	69
Nordeste	24	79	103
Norte	01	49	50
Sudeste	07	47	54
Sul	-	50	50
Total (%)	38 (11,7)	288 (88,3)	326

Fonte: (LSH, 2015)

Dos 672 PFC coletados, 383(57%) foram avaliados quanto a presença de antígeno NS1 e 326 (48,5%) quanto a presença de anticorpos IgM e IgG. Destes, 1,3% (05/383) foram reagentes para o antígeno NS1, 0,9% (3/326) para anticorpos IgM, 11,7% (38/326) para anticorpos IgG. Um total de 375/383 (9%) amostras de PFC apresentou resultados não reagentes para o antígeno NS1; 324/326 (99,4%) foram não reagentes para anticorpos IgM, 288/326 (88,3%) não reagentes para IgG e, portanto, selecionadas para constituírem o painel de amostras verdadeiro negativas para antígenos e anticorpos da dengue. As amostras que apresentaram resultados inconclusivos não foram incluídas no painel.

A detecção de antígeno NS1 nas amostras de PFC avaliadas neste estudo sugere que provavelmente os doadores foram infectados pelo vírus e que podem apresentar viremia

subclínica com possibilidade de transmitir a infecção aos receptores do PFC. Um total de 3 amostras apresentou reatividade para anticorpos IgM. A detecção desses anticorpos se dá aproximadamente no 4º dia após o início dos sintomas. Neste caso, a presença de sintomas impediria a doação o que poderia ter sido a causa do número inferior de amostras IgM positivas. Além disso, indivíduos com infecção secundária apresentam níveis de IgM reduzido em relação aos anticorpos IgG (ASHSHI, 2015).

A presença de 11,7 % de PFC positivos avaliadas para IgG anti-dengue não caracteriza um resultado preocupante, uma vez que o quantitativo de amostras analisadas não é representativo da população de doadores do país, mas sugere que os doadores avaliados já tiveram contato com o vírus da dengue em todas as regiões avaliadas, exceto na Região Sul.

Segundo os dados do Boletim Epidemiológico do M.S., a Região Sul assim como a Região Norte registraram o menor número de casos de dengue no período de coleta avaliado. Segundo Ribas-Silva (2012), embora não ocorra transmissão da doença nesta fase, a transferência de anticorpos IgG anti-dengue ao receptor poderia torná-lo exposto a maiores riscos de uma dengue hemorrágica, caso contraísse outro sorotipo da dengue em um período de 6 meses após a transfusão do hemocomponente (ASHSHI, 2015).

4.4 Caracterização molecular das amostras

4.4.1 Caracterização molecular das amostras clínicas

Adicionalmente à caracterização sorológica, foi realizada a determinação do sorotipo da dengue pela técnica de RT-PCR (*kit H*), inicialmente nas amostras reativas em pelo menos 2 testes para NS1, IgM e IgG, cujo volume permitiu a realização dos ensaios.

Das 769 amostras clínicas caracterizadas como verdadeiro positivas por sorologia, foram avaliadas por RT-PCR para detecção do genoma viral e sorotipagem, 227 amostras, distribuídas em grupos conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Quantitativo de amostras clínicas distribuídas em diferentes grupos compostos por amostras verdadeiro positivas para os marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da dengue (NS1, IgM e IgG) analisadas por RT-PCR.

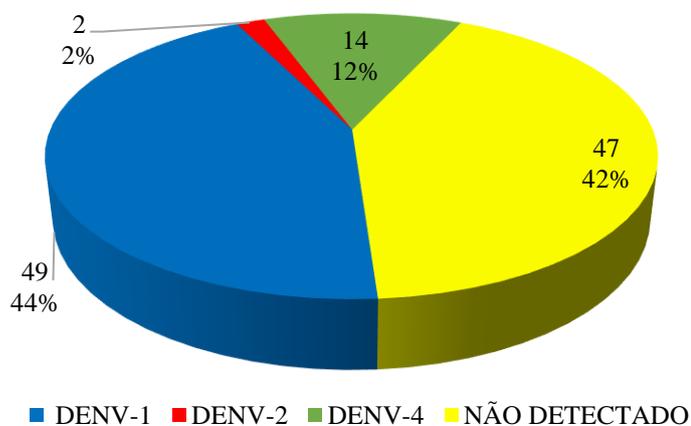
Grupo	Nº de Amostras Clínicas Reagentes (Sorologia)	Nº de Amostras Clínicas Analisadas por RT-PCR (%)
NS1	112	112 (100%)
NS1 + IgM	36	36 (100%)
NS1+IgG	8	8 (100%)
NS1+ IgM + IgG	5	5 (100%)
IgM	133	22 (16,5%)
IgG	434	44 (10,1%)
IgM+IgG	41	-
Total	769	227

Fonte: (LSH, 2015)

4.4.1.1 Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para antígeno NS1

Do total do grupo de amostras reagentes para NS1 (N=112), 49 (44%) pertenciam ao DENV-1; 02 amostras (2%), ao DENV-2 e 14 amostras (12%) ao DENV-4. Em 47 amostras (42%) o genoma viral não foi detectado, conseqüentemente, o sorotipo não foi determinado (Gráfico 25).

Gráfico 25 - Distribuição das amostras clínicas reagentes para NS1 quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=112).

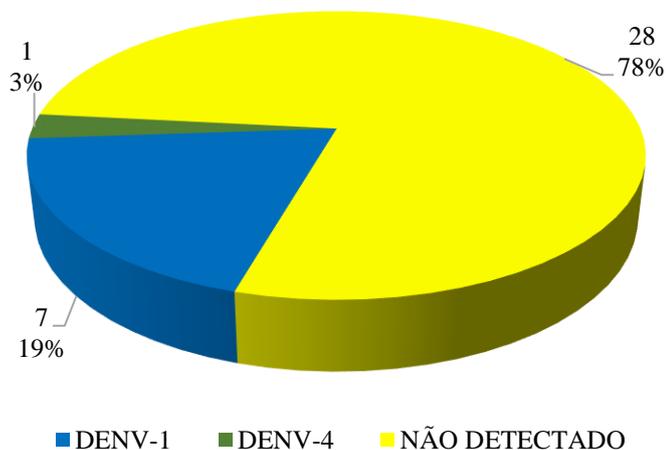


Fonte: (LSH, 2015)

4.4.1.2 Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para antígeno NS1 e anticorpos IgM

No grupo de amostras reagentes para NS1 e IgM, (N=36) o DENV-1 foi identificado em 07 amostras (19%), o DENV-4 em 01 amostra (3%) e, em 28 amostras (78%), o sorotipo infectante de DENV não pode ser identificado (Gráfico 26).

Gráfico 26 - Distribuição das amostras clínicas reagentes ao combinado NS1 e anticorpos IgM quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=36).

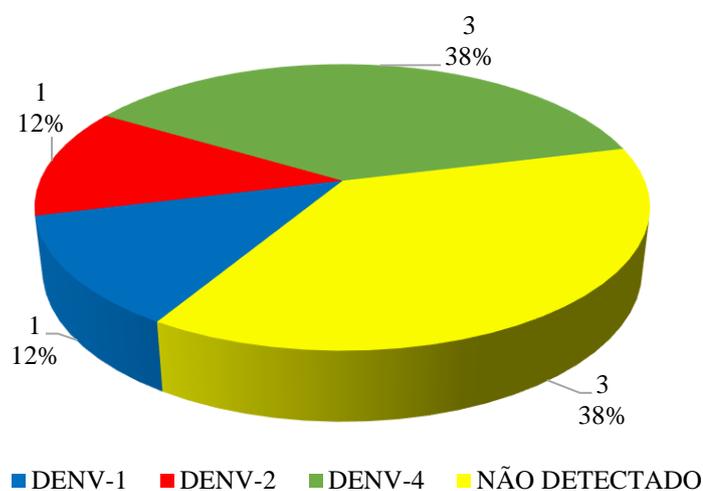


Fonte: (LSH, 2015)

4.4.1.3 Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para antígeno NS1 e anticorpos IgG

No grupo de 08 amostras reagentes para NS1+IgG, 01 (12%), foi caracterizada como DENV-1; 01 (12%) amostra como DENV-2; 03 amostras (38%), como DENV-4. Em 03 amostras (38%), não foi detectado o genoma viral (Gráfico 27).

Gráfico 27 - Distribuição das amostras clínicas reativas para NS1 e IgG quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=8).

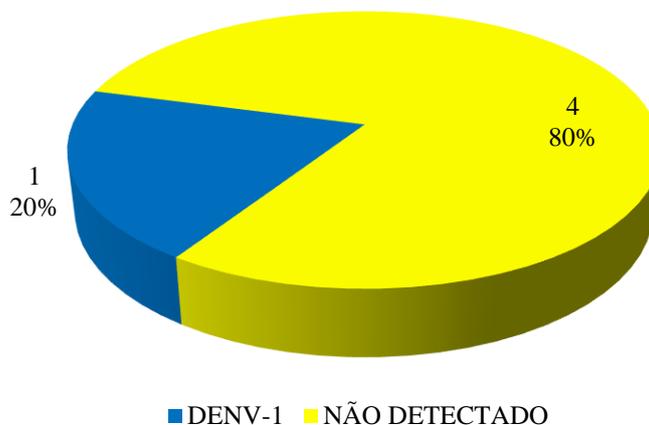


Fonte: (LSH, 2015)

4.4.1.4 Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para antígeno NS1 combinado a anticorpos IgM e IgG

No grupo das reagentes NS1, anticorpos IgM e IgG, composto por 5 amostras, 01 amostra (20%) foi sorotipada como DENV-1 e em 04 amostras (80%), não foi detectado o genoma do vírus (Gráfico 28).

Gráfico 28 - Distribuição das amostras clínicas reagentes NS1, IgM e IgG quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=5).

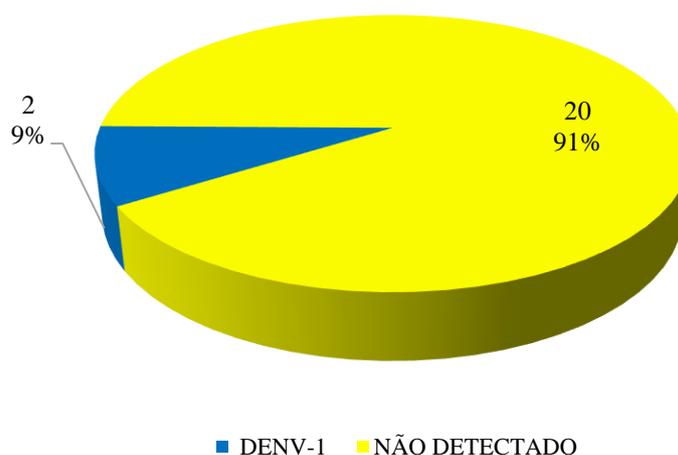


Fonte: (LSH, 2015)

4.4.1.5 Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para anticorpos IgM

Do total de 133 amostras do grupo de reagentes para anticorpos IgM, 22 (16,5%) foram submetidas a identificação dos sorotipos do DENV por RT-PCR. Das 22 amostras analisadas, 02 amostras (9%) eram sorotipo DENV-1 e, em 20 amostras (91%), o sorotipo infectante não foi identificado (Gráfico 29).

Gráfico 29 - Distribuição das amostras clínicas reagentes para anticorpos IgM quanto ao sorotipo do vírus da dengue (DENV) determinado por RT-PCR (N=22).



Fonte: (LSH, 2015)

4.4.1.6 *Determinação do sorotipo por RT-PCR das amostras clínicas reagentes para anticorpos IgG*

Do total de 434 amostras clínicas reagentes pertencentes ao grupo IgG, 44 (10,1%) foram submetidas a sorotipagem. O genoma viral não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas e, portanto, o sorotipo não foi determinado.

As amostras pertencentes ao grupo de amostras verdadeiro positivas para anticorpos IgM e IgG (N= 41) não foram submetidas a sorotipagem. Foi dada prioridade de realização do teste de RT-PCR aos grupos de amostras que apresentaram reatividade aos antígenos NS1 associados ou não a anticorpos IgM e/ou IgG e as amostras que apresentavam volumes superiores a 1,0 ml.

Sendo assim, do total de 769 amostras clínicas caracterizadas por pelo menos 2 testes sorológicos distribuídas em grupos de amostras de acordo com a reatividade para NS1 associadas ou não a anticorpos IgM e/ou IgG, 227 amostras (29,5%) foram submetidas a sorotipagem. Destas, 26% (60/227) pertenciam ao DENV-1, 1% (03/227) ao DENV-2, 8% (18/227) ao DENV-4 e, em 65% (146/227), o genoma viral não foi detectado e o sorotipo não pode ser identificado (Tabela 8). Um total de 542 amostras (70,5%) não foi submetido a caracterização molecular por apresentarem volume reduzido para realização do ensaio.

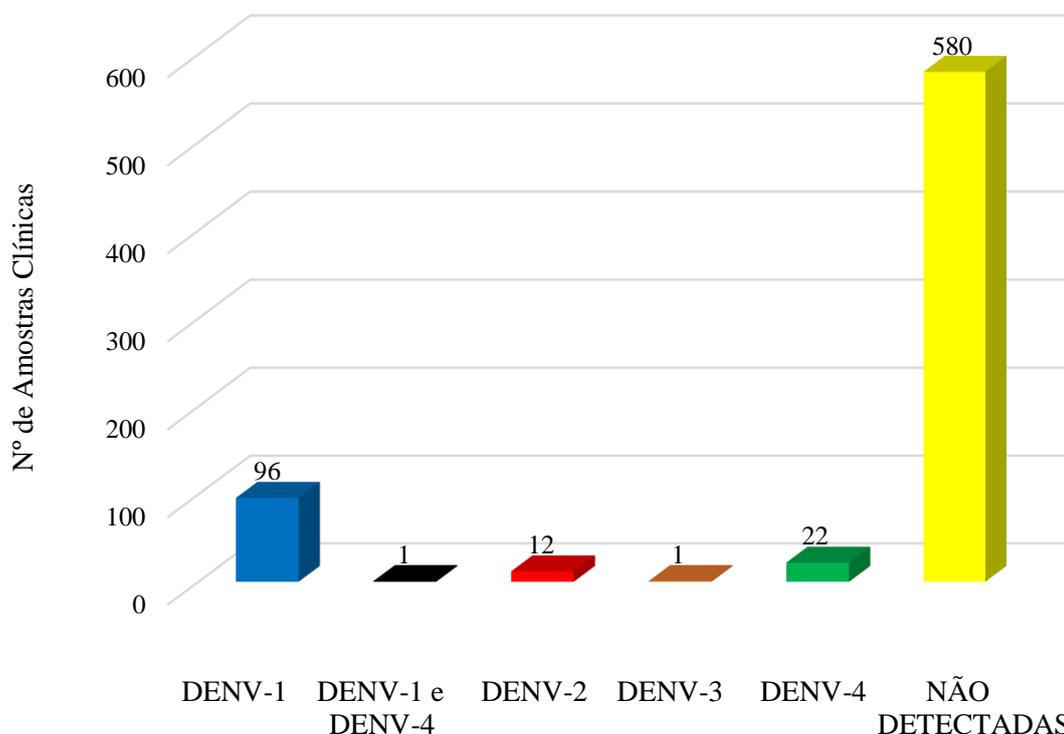
Tabela 8 - Distribuição dos sorotipos do DENV identificados por RT-PCR em amostras clínicas verdadeiro positivas agrupadas de acordo com a reatividade em pelo menos 2 testes sorológicos para pesquisa de antígeno e anticorpos anti-dengue.

Grupo	Nº de Amostras Analisadas por RT-PCR (%)	DENV-1 (%)	DENV-2 (%)	DENV-3 (%)	DENV-4 (%)	Genoma Viral não detectado (%)
NS1 (%)	112 (100)	49 (44)	2 (2)	-	14 (12)	47 (42)
NS1+ IgM (%)	36 (100)	7 (19)	-	-	1 (3)	28 (78)
NS1+IgG (%)	8 (100)	1 (12)	1 (12)	-	3 (38)	3 (38)
NS1+ IgM+IgG (%)	5 (100)	1 (20)	-	-	-	4 (80)
IgM (%)	22 (16,5)	2 (9)	-	-	-	20 (91)
IgG (%)	44 (10,1)	-	-	-	-	44 (100)
Total (%)	227 (100)	60 (26)	3 (1)	-	18 (8)	146 (65)

Fonte: (LSH, 2015)

Além das amostras clínicas que constituíram os grupos de amostras reagentes em pelo menos 2 testes sorológicos (N=227), foram acrescentadas para avaliação molecular e determinação dos sorotipos, 712 amostras clínicas que apresentaram reatividade para antígenos e/ ou anticorpos anti-dengue em pelo menos 1 teste sorológico aplicado na etapa de caracterização das amostras. Das 712 amostras avaliadas, 132 (18,5%) tiveram o sorotipo determinado, sendo 73% (96/132) pertencentes ao DENV-1, 1% (1/132) aos DENV-1 e DENV-4 simultaneamente, 9%, (12/132) ao DENV-2; 1% (1/132) ao DENV-3 e 16% (22/132) ao DENV-4. Em 580 (81,5%) amostras não foi detectada carga viral (Gráfico 30).

Gráfico 30 - Distribuição dos sorotipos de DENV identificados por RT-PCR, em amostras clínicas reagentes em pelo menos 1 teste sorológico para pesquisa de antígeno e/ou anticorpos anti-dengue (N=712).



Fonte: (LSH, 2015)

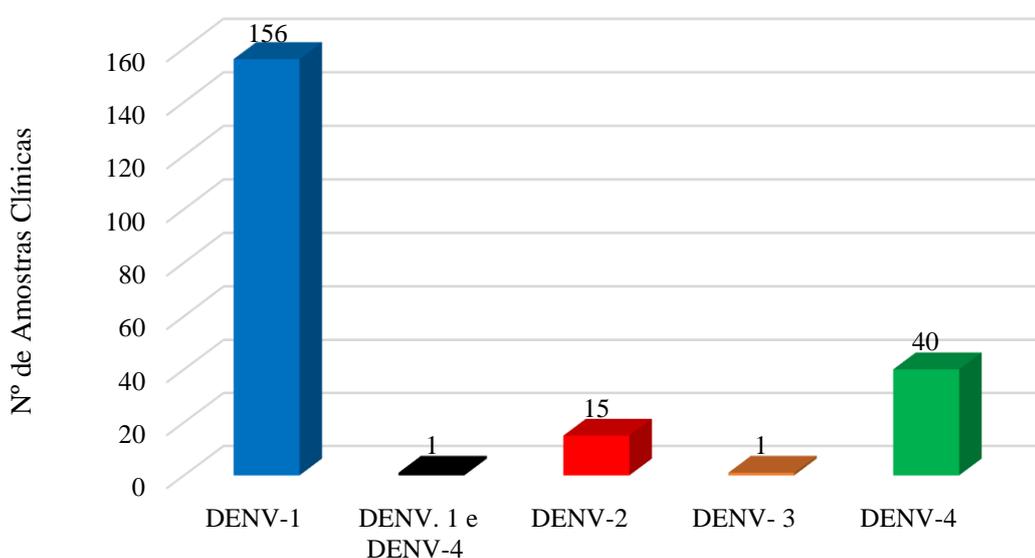
Com a finalidade de identificar o sorotipo do DENV nas amostras reagentes em pelo menos 1 (N=712) ou 2 (N=227) testes para detecção de antígenos e anticorpos anti-dengue empregados na caracterização sorológica, foram sorotipadas um total de 213 amostras que apresentaram os seguintes resultados: a) 73,2% (156/213) amostras de DENV-1; b) 0,5% (1/213) aos DENV-1 e DENV-4; c) 7% (15/213) ao DENV-2; d) 0,5%, (1/213) ao DENV-3; e 18,8% (40/213) ao DENV-4, pertencentes aos diferentes painéis de amostras com sorotipo determinado (Tabela 9 e Gráfico 31).

Tabela 9 - Distribuição das amostras clínicas reagentes em pelo menos 1 ou 2 testes sorológicos para detecção de antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG anti-dengue, de acordo com o sorotipo (N=939) do vírus da dengue (DENV) coletadas no estado do Rio de Janeiro no período de 2010 a 2015.

Testes sorológicos realizados	DENV 1	DENV 1 e 4	DENV 2	DENV 3	DENV 4	Total Detect.	Total Não Detect.	Total Avaliado
1 Teste	96	1	12	1	22	132	580	712
2 Testes	60	-	3	-	18	81	146	227
Total (%)	156 (73,2)	1 (0,5)	15 (7,0)	1 (0,5)	40 (18,8)	213 (22,2)	726 (77,8)	939 (100)

Fonte: (LSH, 2015)

Gráfico 31 - Distribuição final das amostras clínicas coletadas no estado do Rio de Janeiro, no período de 2010 a 2015, sorotipadas por RT-PCR para o vírus da dengue (DENV).



Fonte: (LSH, 2015)

Os sorotipos da dengue identificados nas amostras avaliadas corroboram com os dados epidemiológicos apresentados no período de coleta das amostras (2010-2015), que na sua totalidade foram procedentes do estado do Rio de Janeiro onde predominavam os sorotipos DENV-1 e DENV-4. Foi verificada a presença do DENV-3 em 01 amostra e co-infecção pelos sorotipos 1 e 4 em 01 amostra.

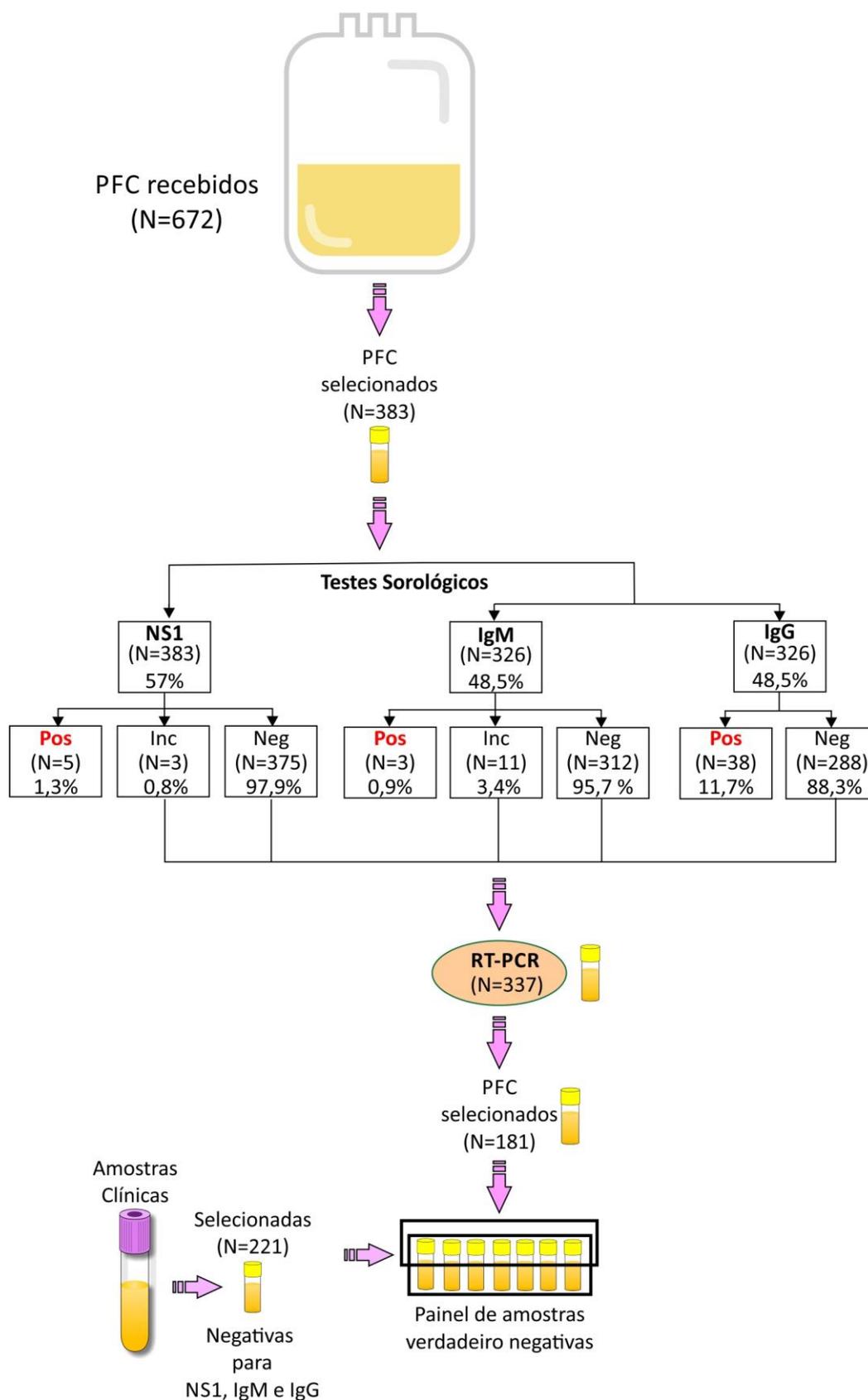
De acordo com a série histórica apresentada no Boletim Epidemiológico SINAN/GDTVZ/SES-RJ (2015), nos anos de 2011, 2014 e 2015 houve predominância do sorotipo DENV-1 e nos anos de 2012 e 2013 do DENV-4, com detecção do DENV-1 no Rio de Janeiro.

A confecção de um painel de amostras sorotipadas terá seu uso aplicado na avaliação futura da sensibilidade e especificidade dos testes para detecção do genoma viral por técnicas moleculares. Vale salientar que não foi objeto deste trabalho a avaliação dos valores de sensibilidade e especificidade dos produtos por sorotipo da dengue, embora na literatura há descrição de resultados inferiores de sensibilidade atribuídos aos sorotipos DENV-4, e DENV-2 (FELIX et al., 2012; SEA, et al., 2013; ACOSTA et al., 2014).

4.5 Caracterização molecular das amostras de plasma fresco congelado (PFC)

Das amostras de PFC avaliadas nos testes sorológicos para pesquisa de antígeno NS1 (N=383), anticorpos IgM (N=326) e anticorpos IgG (N=326), 46 (12%) apresentaram reatividade, sendo 05 (1,3%) amostras reagentes para NS1, 03 amostras para IgM (0,9%) e 38 para IgG (11,7%). Todas foram submetidas a caracterização molecular quanto a presença do genoma do DENV e nenhuma apresentou carga viral detectável no teste de RT-PCR. Destas, 181 foram selecionadas e passaram a compor o painel de amostras verdadeiro negativas. No Fluxograma 2 são apresentadas as etapas de caracterização dos PFC assim como a confecção do painel de amostras verdadeiro negativas para dengue.

Fluxograma 2 - Caracterização sorológica e molecular dos PFC e confecção do painel de amostras verdadeiro negativo para dengue (amostras clínicas e PFC).



Fonte: (LSH, 2017)

4.6 Confeção de painéis sorológicos

A partir das amostras clínicas caracterizadas em pelo menos dois testes sorológicos quanto a presença ou ausência de antígeno NS1 e/ou anticorpos IgM e/ou IgG anti-dengue, foram confeccionados 7 painéis de amostras verdadeiro-positivas e 01 painel amostras verdadeiro-negativas (N=402) constituído por 221 amostras clínicas e por 181 dos 337 PFCs não reagentes para o antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG da dengue (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição de amostras verdadeiro positivas e verdadeiro negativas para confeção de painéis sorológicos para avaliação de *kits* comercialmente disponíveis para o diagnóstico laboratorial da dengue.

Painel de Amostras	Marcadores virológicos (antígeno, anticorpo/RNA viral)	Nº de Amostras
Verdadeiro positivas	NS1 (pos)	112
	NS1 + IgM (pos)	36
	NS1+IgG (pos)	8
	NS1+ IgM + IgG (pos)	5
	IgM (pos)	133
	IgG (pos)	434
	IgM+IgG (pos)	41
Verdadeiro negativas	NS1+ IgM + IgG (neg) e genoma viral (não detectado)	181
	NS1+ IgM + IgG (neg)	221

Fonte: (LSH, 2017)

4.7 Avaliação dos *kits* empregados no diagnóstico da dengue

Foi avaliado um total de 13 *kits* empregados no diagnóstico sorológico das infecções pelo DENV, adquiridos no mercado nacional assim distribuídos: 05 testes ELISA e 08 TRs, para pesquisa de antígenos e anticorpos da dengue. Cabe ressaltar, que o quantitativo de *kits* analisados é referente ao número de distribuidores que atenderam aos critérios estabelecidos

para o fornecimento dos produtos como: registro válido no Ministério da Saúde, pronta entrega, dentre outros critérios, dado o prazo para execução do presente trabalho.

No Quadro 5 são descritos os princípios metodológicos dos 5 testes ELISA analisados, codificados de 1 a 5 de acordo com a finalidade de uso, marcador sorológico e matriz amostral declarados nas instruções de uso do produto fornecidas pelos fabricantes.

Quadro 5 - Identificação dos testes ELISA avaliados.

CÓDIGO	IDENTIFICAÇÃO DOS TESTES ELISA
<i>Kit 1</i>	Método imunoenzimático de uma fase, do tipo sanduiche para detecção de <u>antígeno NS1</u> , da dengue no soro ou plasma humano.
<i>Kit 2</i>	Método imunoenzimático indireto para detecção de <u>anticorpos IgG</u> anti-dengue em amostras de soro ou plasma humano.
<i>Kit 3</i>	Método imunoenzimático indireto para detecção de <u>anticorpos IgM</u> anti-dengue em amostras de soro ou plasma humano.
<i>Kit 4</i>	Método imunoenzimático indireto para detecção de <u>anticorpos IgG</u> anti-dengue em amostras de soro.
<i>Kit 5</i>	Método imunoenzimático do tipo sanduiche para pesquisa de <u>antígenos NS1</u> em amostras de soro.

Fonte: (LSH, 2015)

Além disso, foram avaliados 08 TRs para detecção de antígeno e anticorpos da dengue codificados de 6 a 13 no Quadro 6, onde são descritas a finalidade de uso e matriz de amostra utilizadas de acordo com as instruções de uso do produto fornecidas pelos fabricantes.

Quadro 6 - Identificação dos testes rápidos avaliados.

CÓDIGO	IDENTIFICAÇÃO DOS TESTES RÁPIDOS
<i>Kit 6</i>	teste imunocromatográfico de fluxo lateral para detecção de antígeno NS1 , no plasma e soro humano.
<i>Kit 7A</i> ¹	teste imunocromatográfico, em uma etapa, para detecção do antígeno NS1 do vírus da dengue, em amostras de soro, plasma e sangue total.
<i>Kit 7B</i> ¹	teste imunocromatográfico, em uma etapa, para detecção de anticorpos IgG do vírus da dengue, em amostras de soro, plasma e sangue total.
<i>Kit 7C</i> ¹	teste imunocromatográfico, em uma etapa, para detecção de anticorpos IgM do vírus da dengue, em amostras de soro, plasma e sangue total.
<i>Kit 8</i>	teste imunocromatográfico em uma etapa, projetado para determinação qualitativa do antígeno NS1 do vírus da dengue em soro humano, plasma ou sangue total.
<i>Kit 9</i>	teste imunocromatográfico, fase sólida, para detecção qualitativa da presença do antígeno NS1 no sangue total, soro e plasma humano.
<i>Kit 10 A</i> ²	teste imunocromatográfico, para detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-dengue em sangue humano, soro ou plasma.
<i>Kit 10 B</i> ²	teste imunocromatográfico, para detecção qualitativa de anticorpos IgG anti-dengue em sangue humano, soro ou plasma.
<i>Kit 11</i>	teste imunocromatográfico, para determinação qualitativa do antígeno NS1 para o vírus da dengue em amostras de soro, plasma.
<i>Kit 12</i>	teste imunocromatográfico, em uma única etapa desenvolvido para detecção do antígeno NS1 do vírus da dengue em soro, plasma ou sangue total.
<i>Kit 13</i>	teste imunocromatográfico para determinação qualitativa do antígeno NS1 do vírus da dengue em amostras de sangue total, soro e plasma humano.

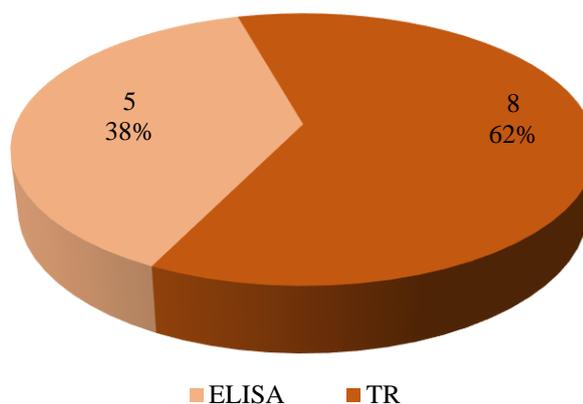
Fonte: (LSH, 2015)

- (1) O produto 7 se trata de um produto combinado para detecção de antígeno e anticorpos da dengue (NS1/IgM/IgG)
 (2) O produto 10 se trata de um produto combinado para detecção de anticorpos da dengue (IgM/IgG)

4.7.1 Distribuição dos kits ELISA e TRs adquiridos de acordo com as metodologias avaliadas

Do total de 13 kits recebidos para análise e detecção sorológica da dengue, 05 foram referentes à metodologia ELISA e 08 a TRs (Gráfico 32).

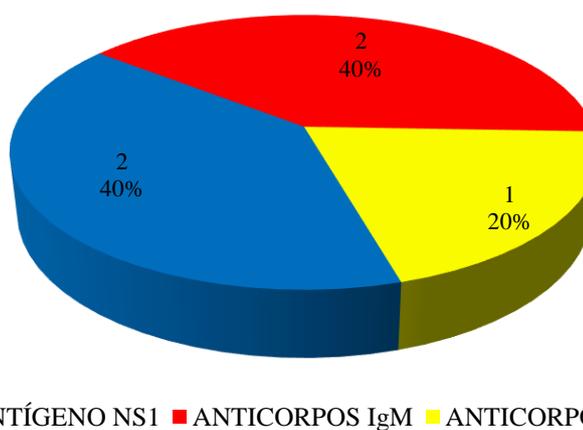
Gráfico 32. Distribuição dos kits de diagnóstico ELISA e TR recebidos e analisados (N=13).



Fonte: (LSH, 2015)

Os 05 *kits* de ELISAs recebidos foram assim distribuídos: 40% (02) dos *kits*: ELISAs para detecção de antígenos NS1; 40% (02) dos *kits*: ELISAs para detecção de anticorpos IgG e 20% (01) dos *kits*: ELISAs para detecção de anticorpos IgM (Gráfico 33).

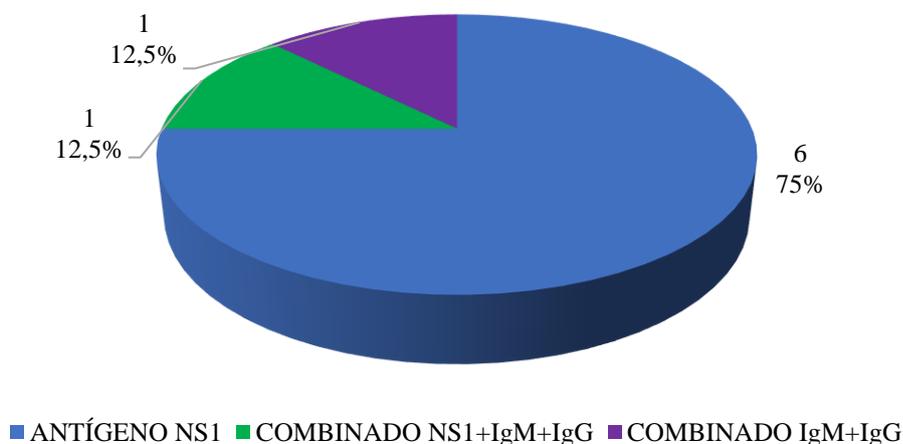
Gráfico 33. Distribuição dos *kits* de diagnóstico de ELISA de acordo com o marcador sorológico (N=5).



Fonte: (LSH, 2015)

Dos 08 *kits* de TRs, 06 TRs (75%) são para pesquisa de antígeno NS1; 01 (12,5%) teste combinado para pesquisa de NS1 e anticorpos IgM/IgG e 01 (12,5%) teste para pesquisa de IgM/IgG (Gráfico 34).

Gráfico 34 - Distribuição dos Testes Rápidos quanto aos marcadores para o diagnóstico da dengue (N=8).



Fonte: (LSH, 2015)

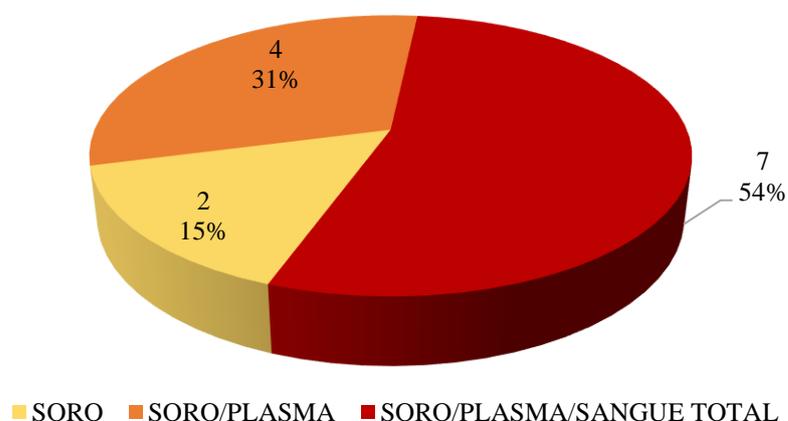
4.7.2 Avaliação das instruções de uso que acompanham os produtos

A primeira etapa da avaliação dos *kits* submetidos a análise diz respeito a avaliação das Instruções de Uso que acompanham os produtos frente a legislação pertinente, a Resolução RDC nº 8/2006 e atualmente, à Resolução RDC nº36/2016. Os dados obtidos são apresentados a seguir.

4.7.2.1 Avaliação quanto a matriz de análise

De acordo com as informações contidas nas Instruções de Uso que acompanham os *kits* do total de 13 produtos avaliados, 54% (07/13), utilizam as matrizes soro, plasma e sangue total; 31% (04/13) utilizam as matrizes soro e plasma e 15% (02/13) utilizam apenas soro humano, coletado sem o uso de substâncias anticoagulantes (Gráfico 35).

Gráfico 35. Distribuição por matriz de análise dos testes de ELISA e TR disponíveis comercialmente selecionados para avaliação (N=13).

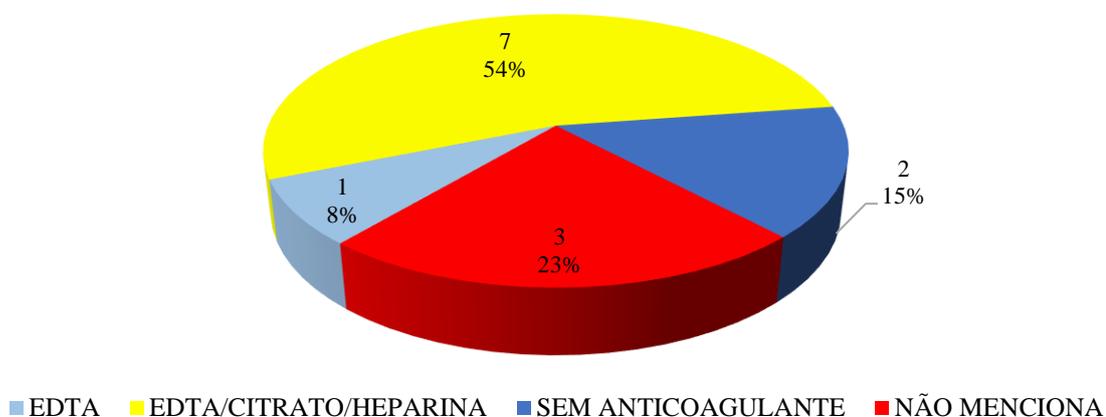


Fonte: (LSH, 2015)

4.7.2.2 Análise quanto ao uso ou não e tipo de anticoagulante utilizado na obtenção das amostras

De acordo com as informações obtidas nas Instruções de Uso que acompanham os *kits*, 54% (07/13), utilizam na obtenção das amostras de plasma humano e/ou sangue total coletado com EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) ou citrato de sódio ou heparina; 23% (03/13) não mencionaram o tipo de anticoagulante utilizado na coleta de amostra de sangue total e plasma humano; 15% (02/13) não utilizam anticoagulante, ou seja os *kits* são analisados apenas frente a amostras de soro humano e 8% (01/13) utilizam apenas o anticoagulante EDTA para a obtenção de amostras de plasma humano e sangue total, conforme Gráfico 36.

Gráfico 36. Distribuição quanto aos tipos de anticoagulantes empregados na obtenção de amostras segundo instruções de uso, utilizados para coleta de amostras nos kits de ELISA e TR para diagnóstico da dengue (N=13).

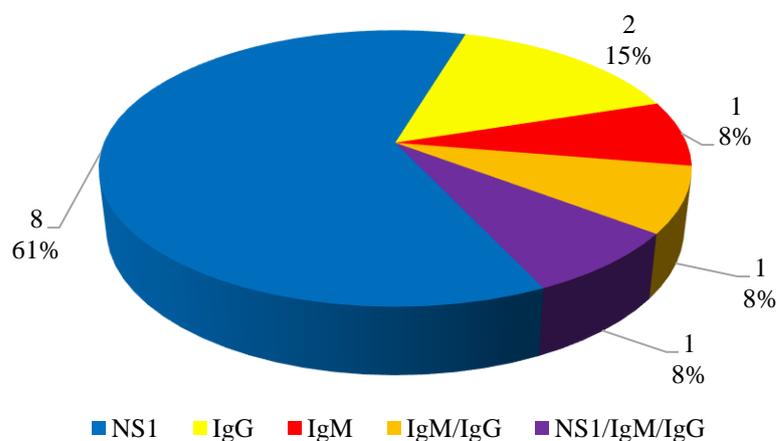


Fonte: (LSH, 2015)

4.7.2.3 Análise quanto ao tipo e natureza dos marcadores (antígeno e anticorpos) utilizados na sensibilização da fase sólida

De acordo com as informações obtidas nas Instruções de Uso que acompanham os kits, 61% dos kits (08/13) detectam o antígeno NS1; 15% (02/13) detectam anticorpos da classe IgG; 8% (01/13) detectam anticorpos da classe IgM; 8% (01/13) detectam a combinação de anticorpos da classe IgG/IgM e 8% (01/13) detectam antígenos NS1 e combinação de anticorpos das classes IgG e IgM, conforme Gráfico 37.

Gráfico 37 - *Kits* para pesquisa de antígeno NS1 e de anticorpos IgM e IgG analisados, utilizados no diagnóstico sorológico da dengue (N=13).

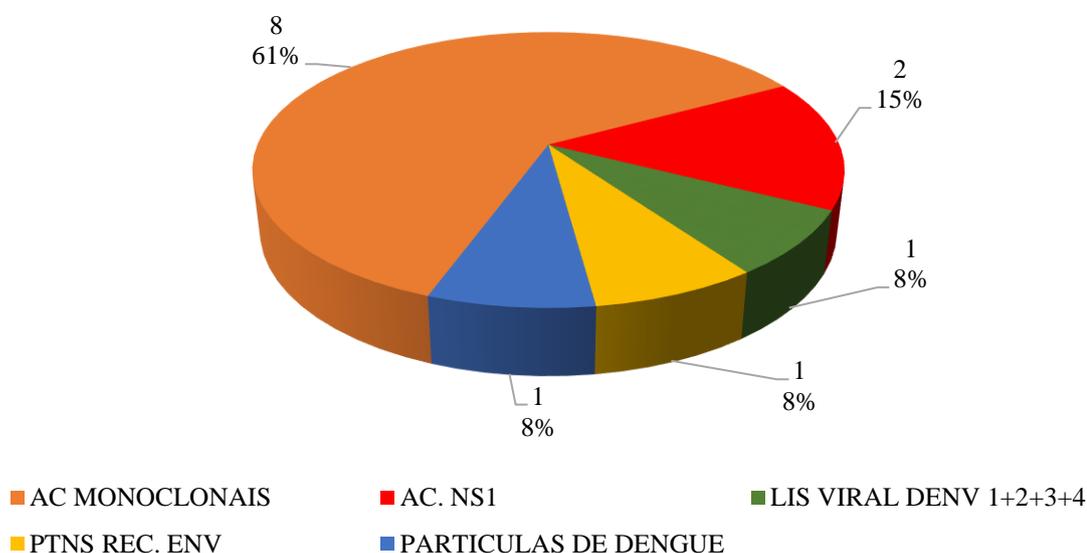


Fonte: (LSH, 2015)

4.7.2.4 *Análise quanto aos tipos de proteínas utilizadas na sensibilização da fase sólida*

Dos 13 produtos analisados, 08 utilizavam anticorpos monoclonais; 02 utilizavam anticorpos NS1; 01 utilizava proteínas recombinantes do envelope viral; 01 empregava lisado viral da dengue subtipos DENV-1+ DENV-2+ DENV-3+ DENV-4 e 01 partículas do DENV, conforme o Gráfico 38.

Gráfico 38 - Natureza dos antígenos e anticorpos (AC) utilizados para sensibilização da fase sólida dos *kits* de ELISA e TR para o diagnóstico da dengue, incluindo proteínas recombinantes do envelope viral (ptns rec. env) e lisado viral (lis viral).



Fonte: (LSH, 2015)

De acordo com a avaliação realizada nas Instruções de Uso que acompanhavam os *kits* analisados, foi verificada a ausência de informações ou informações confusas, porém, imprescindíveis quanto: a) a descrição do ensaio; ao tipo de sensibilização das tiras da Linha Controle e Linha Teste antígeno e/ou anticorpos; tipo de anticoagulante utilizado; ausência de informação quanto ao uso ou não de punção digital; b) interpretação dos resultados pouco elucidativa, implicando em equívoco na leitura visual dos mesmos. Estas informações implicam tanto na execução do teste, quanto na segurança e eficácia, além de estarem em desacordo com o preconizado na legislação vigente, a RDC 36/2015. Estas informações foram devidamente notificadas à GEVIT/GGTPS/ANVISA.

4.8 Avaliação dos atributos de sensibilidade e especificidade clínica

A terceira etapa deste trabalho envolveu a avaliação dos *kits* diagnósticos da dengue disponíveis no mercado nacional quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade.

Do total de 53 *kits* que possuíam registro no país segundo dados do DATAVISA, no período de 2015 a 2020, 13 produtos foram adquiridos, obedecendo aos mesmos princípios utilizados para compra dos *kits* empregados na caracterização das amostras, ou seja disponibilidade de entrega do quantitativo solicitado, preços não abusivos além de registro válido no país.

O quantitativo de *kits* avaliados foi referente ao número de distribuidores que atenderam aos critérios estabelecidos para o fornecimento de produtos. Cabe salientar que os nomes dos produtos foram propositalmente omitidos pela natureza do trabalho desenvolvido no INCQS, cuja competência legal impede a vinculação a marcas ou produtos sujeitos ao regime de vigilância sanitária.

Por tratar-se de um trabalho pioneiro na avaliação de produtos de Classe de risco III (BRASIL, 2015) cuja análise prévia ainda não estava prevista e, portanto, não havendo parâmetros mínimos nacionais e internacionais referentes à sensibilidade e especificidade estabelecidos, foi tomado como referência para avaliação desses parâmetros, os valores declarados pelos fabricantes/detentores de registro estabelecidos nas instruções de uso de cada produto.

Desta forma, os valores de sensibilidade e especificidade obtidos após realização das análises laboratoriais, frente aos painéis sorológicos constituídos, foram comparados aos valores declarados pelos fabricantes/distribuidores nas instruções de uso. Foram classificados como INSATISFATÓRIOS os produtos cujos valores de sensibilidade e especificidade obtidos após análise laboratorial não corroboraram com os valores declarados nas instruções de uso e SATISFATÓRIOS aqueles que possuíam valores iguais ou superiores aos declarados. Cabe ressaltar que os valores declarados de sensibilidade e especificidade pelos fabricantes, nas instruções de uso até o presente, nortearam o mercado nacional e internacional para a aquisição e a utilização desses produtos (GUZMAN et al., 2010).

4.8.1 Análise quanto aos dados de desempenho de sensibilidade e especificidade declarados pelos fabricantes para a metodologia de ELISA

Os atributos de sensibilidade e especificidade declarados pelos fabricantes, nas Instruções de Uso que acompanham os *kits* ELISA avaliados (N=5) para pesquisa de antígeno NS1 e anticorpos IgM e IgG foram propositalmente omitidos. Os valores de sensibilidade e

especificidade são apresentados em faixas de acordo com as informações declaradas pelos fabricantes.

Para os *kits* destinados à detecção de antígeno NS1, IgM e IgG da dengue, a faixa para o estudo de sensibilidade declarado pelos fabricantes para os testes ELISA variou de 88,2% a 96,0% e a especificidade foi de 93% a 100%.

4.8.2 Análise quanto aos dados de desempenho de sensibilidade e especificidade declarados nas instruções de uso fornecidas pelos fabricantes para os testes rápidos (imunocromatográficos)

De acordo com as informações obtidas nas Instruções de Uso que acompanham os TRs (N=8), os resultados obtidos nos estudos de desempenho, para definição do atributo de sensibilidade e especificidade, fornecidos pelos fabricantes foram propositalmente suprimidos e são apresentados em faixas assim distribuídas:

- *Kits destinados a detecção de antígenos NS1 da dengue* - Os resultados obtidos no estudo de sensibilidade variaram de 92,4% a 94,6% e no estudo de especificidade entre 98,4% a 99%;
- *Kits destinados a detecção dos anticorpos IgG/IgM da dengue* - Os resultados obtidos no estudo de sensibilidade variaram entre 94,2% a 95,8% e no estudo de especificidade entre 96,4% a 99,0%.

4.9 Avaliação da sensibilidade e especificidade clínica

Os treze *kits* comerciais (05 ELISAs e 8 TRs) foram avaliados quanto aos critérios de sensibilidade e especificidade clínica, empregando-se amostras verdadeiro positivas (VP) e verdadeiro negativas (VN) para a infecção por DENV. Para a execução e interpretação dos ensaios foram seguidas rigorosamente as Instruções de Uso que acompanham os produtos.

Os valores de sensibilidade e especificidade clínica ou diagnóstica foram calculados utilizando as seguintes equações:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{VP (Verdadeiro Positivas)}}{\text{VP+FN (Falso Negativas)}} \times 100$$

e

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{\text{VN (Verdadeiro Negativas)}}{\text{VN+FP (Falso Positivas)}} \times 100$$

4.9.1 Avaliação da sensibilidade e especificidade dos testes ELISA

Para execução e interpretação dos resultados dos ELISAs, foram seguidas rigorosamente as instruções de uso que acompanham os produtos.

Os *kits* para captura de antígeno NS1 (*kits* 1 e 5) avaliados, apresentaram sensibilidade e especificidade de 90,7% e 94,2% e 92,5% e 90,7% respectivamente. As sensibilidades dos *kits* para detecção do IgG anti-dengue (*kits* 2 e 4), foram de 87,7% e 95%, no entanto, ambos com baixa especificidade (62,3% e 61,8%), respectivamente. O único *kit* de ELISA para captura de anticorpo IgM anti-dengue avaliado neste estudo, apresentou sensibilidade de 98,9% e especificidade de 86,8%, Tabela 11.

Tabela 11 - Valores de sensibilidade e especificidade obtidos nos testes ELISA para o diagnóstico laboratorial das infecções pelo DENV, avaliados frente a amostras sorológicas verdadeiro positivas (VP) e verdadeiro negativas (VN) para dengue.

KIT	Nº total de amostras testadas	VP	FN	VN	FP	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Kit 1 (NS1)	266	117	12	129	8	90,7	94,2
Kit 2 (IgG)	263	172	24	42	25	87,7	62,3
Kit 3 (IgM)	262	184	2	66	10	98,9	86,8
Kit 4 (IgG)	255	190	10	34	21	95,0	61,8
Kit 5 (NS1)	263	124	10	117	12	92,5	90,7

Um quantitativo médio de 260 amostras clínicas e de PFC realizado para cada um dos testes ELISA avaliados. Estes foram analisados frente a um conjunto de amostras verdadeiro positivas para o marcador sorológico a que se destinava, além de amostras de painel de referência comercial, padrão internacional (NIBSC), amostras interferentes (HIV, HTLV, Chagas, Sífilis e Hepatites B e C) controles e/ou calibradores inerentes a cada produto, além de amostras verdadeiro negativas.

Todos os 05 kits de ELISA avaliados foram considerados **INSATISFATÓRIOS** para especificidade quando comparados com os valores declarados nas instruções de uso que acompanham o produto, apresentando resultados que variaram de 6 a 36% inferiores aos declarados pelos fabricantes.

Os resultados apresentados demonstraram que os valores de sensibilidade obtidos nos kits de ELISA variaram de 90,7% a 92,5% para antígeno NS1. Segundo os dados da literatura, os valores obtidos são semelhantes ou ainda superam, como demonstrado por diversos autores (PAL et al., 2015).

O teste ELISA para detecção de anticorpos IgM obteve sensibilidade de 98,9%, resultado que corrobora com os valores obtidos por Huspenger e colaboradores (2016) e é superior aos apresentados por De Decker e colaboradores (2015).

Para a pesquisa de anticorpos IgG, a sensibilidade dos produtos variou de 87,7% a 95,0%. Os percentuais obtidos nesse estudo corroboram com os apresentados na literatura (PAL, et al., 2015).

Na Tabela 12 são apresentados os resultados da diferença percentual entre os valores de sensibilidade declarados pelos fabricantes e os obtidos na análise de sensibilidade frente às amostras verdadeiro positivas e de especificidade frente às amostras verdadeiro negativas.

Tabela 12 - Comparação entre a sensibilidade e especificidade declarada e obtida para os kits de ELISA avaliados.

KIT	Sensibilidade Obtida	Resultado	Especificidade Obtida	Resultado
Kit 1 (NS1)	1% inferior a declarada	Insatisfatório	6% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 2 (IgG)	4% inferior a declarada	Insatisfatório	36% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 3 (IgM)	5% superior a declarada	Satisfatório	12% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 4 (IgG)	1% inferior a declarada	Insatisfatório	31% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 5 (NS1)	4% superior a declarada	Satisfatório	9% inferior a declarada	Insatisfatório

4.9.2 Avaliação da sensibilidade e especificidade dos Ensaio Imunocromatográficos - Testes Rápidos (TRs)

Para execução e interpretação dos TRs foram seguidas rigorosamente as instruções de uso que acompanham os produtos.

As sensibilidades dos TRs para captura de antígeno NS1 (*kits* 6, 7, 8, 9, 11, 12 e 13) variou de 59,1% a 86,6%, com especificidades de 98,2% a 100%. Dois TRs para captura de IgM anti-dengue foram avaliados (*kits* 7 e 10) e as sensibilidades variaram de 44,7% a 84,5% e especificidades entre 95,6% a 98,9%. Os *kits* para detecção de IgG anti-dengue avaliados (*kits* 7 e 10) apresentaram sensibilidades entre 55,6% e 74,6% e especificidades entre 79,3% e 86,3%, Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de sensibilidade e especificidade apresentados nos **TESTES RÁPIDOS** para o diagnóstico laboratorial de dengue, avaliados frente às amostras verdadeiro positivas (VP) e verdadeiro negativas (VN).

KIT	Nº total de amostras testadas	VP	FN	VN	FP	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Kit 6 (NS1)	268	136	21	109	2	86,6	98,2
Kit 7 (NS1)	267	132	48	87	0	73,3	100
Kit 7 (IgG)	290	162	55	63	10	74,6	86,3
Kit 7 (IgM)	288	186	34	65	3	84,5	95,6
Kit 8 (NS1)	276	99	59	117	1	62,6	99,1
Kit 9 (NS1)	295	113	62	118	2	64,6	98,3
Kit 10 (IgM)	281	85	105	90	1	44,7	98,9
Kit 10 (IgG)	281	124	99	46	12	55,6	79,3
Kit 11 (NS1)	292	157	26	108	1	85,8	99,1
Kit 12 (NS1)	276	133	34	103	6	79,6	94,5
Kit 13 (NS1)	281	101	70	108	2	59,1	98,2

FN: Falso negativas; FP: Falso Positivas

Foi realizada uma análise comparativa entre os valores de sensibilidade e especificidade declarados e os valores de sensibilidade e especificidade obtidos após avaliação laboratorial. Todos os TRs avaliados apresentaram resultados **INSATISFATÓRIOS** para sensibilidade e/ou especificidade, Tabela 14.

Tabela 14 - Comparação entre a sensibilidade e especificidade obtida e a declarada nas instruções de uso do produto para os Testes Rápidos avaliados (N=8).

KIT	Sensibilidade Obtida x Declarada	Resultado	Especificidade Obtida x Declarada	Resultado
Kit 6 (NS1)	6% inferior a declarada	Insatisfatório	2% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 7 (NS1)	19% inferior a declarada	Insatisfatório	2% superior a declarada	Satisfatório
Kit 7 (IgG)	20% inferior a declarada	Insatisfatório	10% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 7 (IgM)	10% inferior a declarada	Insatisfatório	1% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 8 (NS1)	30% inferior a declarada	Insatisfatório	1% superior a declarada	Satisfatório
Kit 9 (NS1)	30% inferior a declarada	Insatisfatório	1% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 10 (IgM)	51% inferior a declarada	Insatisfatório	1% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 10 (IgG)	40% inferior a declarada	Insatisfatório	20% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 11 (NS1)	9% inferior a declarada	Insatisfatório	1% superior a declarada	Satisfatório
Kit 12 (NS1)	13% inferior a declarada	Insatisfatório	4% inferior a declarada	Insatisfatório
Kit 13 (NS1)	35,5% inferior a declarada	Insatisfatório	1% inferior a declarada	Insatisfatório

Todos os 8 TRs avaliados, (06 para pesquisa de antígeno NS1; 01 para pesquisa de IgG/IgM e 1 para pesquisa de NS1, IgG e IgM) foram considerados **INSATISFATÓRIOS** para sensibilidade com resultados que variaram de 6% a 51% inferiores aos declarados nas instruções de uso. Um total de 3 kits apresentou resultados satisfatórios para especificidade.

A análise incluiu ainda avaliação dos produtos frente a painel sorológico comercial (PVD 201- *Anti-Dengue Mixed Titer Performance Panel* – Sera Care Life Science[®]) composto por 21 amostras de plasma (20 positivas e 1 negativa) com volume de 1,2 mL cada, provenientes de diferentes indivíduos, apresentando reatividade para anticorpos IgM e IgG

anti-dengue. Foi incluído ainda na avaliação o padrão Internacional OMS “*Anti-Dengue Virus Types 1+2+3+4*, (*Reference Reagent 02/186 NIBSC*), reagente de referência proveniente de indivíduos infectados pelo DENV, disponível para estudos de validação, além de amostras interferentes e reativas para HIV, HCV, HTLV, HBsAg, doença de Chagas e sífilis e quando aplicável, amostras de sangue total (*spike*). Foram incluídos obrigatoriamente nas análises, os controles e calibradores pertencentes a cada produto.

A sensibilidade obtida nos diferentes TRs para detecção de NS1 variou de 59,1% a 86,6%, para IgM de 44,7% a 84,5% e de para IgG 55,6% a 74,6%.

A especificidade para a detecção do antígeno NS1 nos TRs avaliados variou de 94,5% a 100% para a presença do antígeno NS1, de 95,6% a 98,9% para anticorpos IgM e de 86,3% a 98,9% para os TRs que detectam anticorpos IgG da dengue.

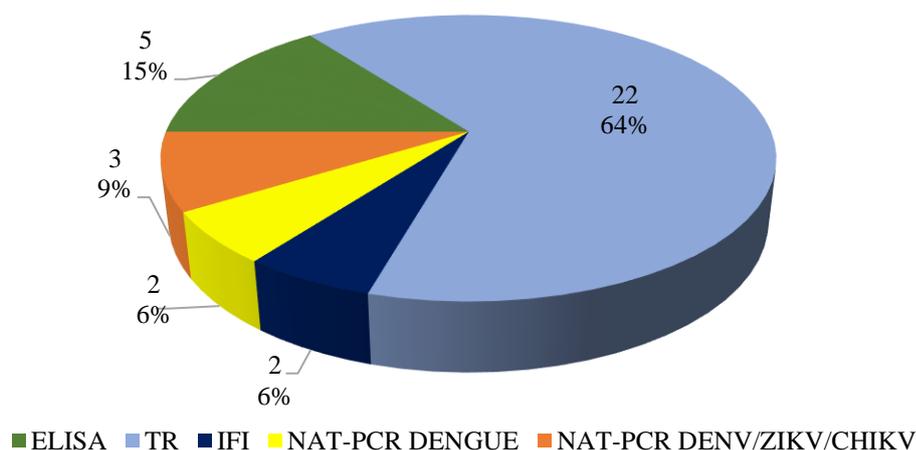
Cabe destacar que todos os *kits* foram analisados frente a um conjunto de amostras VP e VN para o DENV constituídos de amostras representativas de todos os estágios da doença.

Após conclusão das análises realizadas no LSH, os laudos referentes foram encaminhados a ANVISA como parte da execução do projeto ANVISA/PNUD. Diante dos resultados obtidos e, frente ao indicativo do Ministério da Saúde quanto a presença de resultados falso positivos e negativos apresentados pelos *kits* utilizados no mercado nacional, somado aos estudos apresentados na literatura (ANDRIES et al., 2016; SEA et al., 2013) foi constatada pela ANVISA a necessidade da implantação da análise prévia, objetivando a melhoria e manutenção da qualidade de tais produtos. Desta forma deu-se início a realização das análises prévias, que a partir de maio de 2016 tornaram-se obrigatórias, cujo o laudo emitido pelo INCQS é parte do processo com vistas ao registro/revalidação de produtos na ANVISA. Além disso, o Ministério da Saúde ao adquirir tais produtos, por licitação, dentre a documentação solicitada também exige a avaliação da qualidade e conformidade do produto por meio de Análise Controle.

Para o registro de produtos de Classe III a que pertencem os *kits* de diagnóstico da dengue, segundo a legislação vigente, a empresa deve apresentar à ANVISA, em relatório técnico, estudos de sensibilidade e especificidade do produto, dentre outros pertinentes a estocagem, conservação, execução e análise de resultados. Segundo a legislação vigente a análise prévia para essa classe de produtos (Classe III) não era obrigatória e os valores de sensibilidade e especificidade declaradas pelos fabricantes eram aceitos para o registro dos produtos, no entanto como desfecho desse trabalho tornou-se obrigatória a análise de tais produtos.

Nesta etapa, as empresas detentoras de produtos registrados ou em fase de registro foram comunicadas para encaminhar ao INCQS a amostragem de 300 testes de mesmo número de lote para avaliação. No período de maio de 2016 a março de 2017 foram recebidos na Central de Recebimento de Amostras do INCQS 34 *kits* para análise: a) ELISA, 05 *kits* (15%); b) TRs, 22 *kits* (64%); c) Imunofluorescência Indireta (IFI) 02 *kits* (6%); d) NAT-PCR (detecção de ácidos nucleicos), apenas Dengue 02 *kits* (6%); e) NAT-PCR combinado dengue (DENV), vírus da Zika (ZIKV) e vírus Chikungunya (CHIKV) - 03 *kits* (9%), Gráfico 39.

Gráfico 39 - Distribuição dos *kits* recebidos para Análise (Prévia ou Controle) por metodologia (N=34) ELISA, Teste rápido (TR) e RT-PCR em tempo real para a detecção do genoma do vírus da dengue, zika e chikungunya (NAT-PCR).



Fonte: (LSH, 2015)

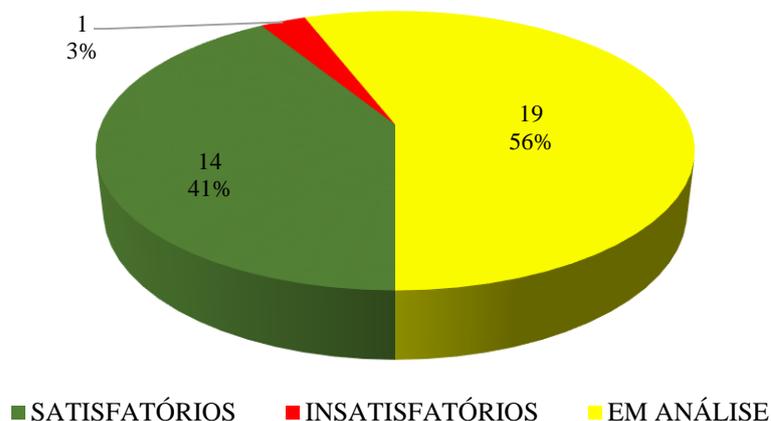
Cabe ressaltar que os 34 *kits* recebidos para análise prévia se apresentavam nos formatos de ELISA, TRs, Imunofluorescência (IFI) e molecular para a detecção do antígeno (NS1), anticorpos (IgM e /ou IgG) e ácido nucleico viral (NAT), incluindo os ZIKV e CHIKV, Tabela 15.

Tabela 15. Caracterização e quantidade dos *kits* para o diagnóstico laboratorial de dengue avaliados pelo LSH/INCQS/Fiocruz em 2017.

Tipo	Marcadores virológicos (antígeno, anticorpo/RNA viral)	Nº de <i>kits</i> recebidos
ELISA	NS1	02
ELISA	IgM	02
ELISA	IgG	01
TR	NS1	12
TR	NS1/ IgM /IgG	02
TR	IgM/IgG	08
IFI	IgM	01
IFI	IgG	01
NAT- PCR	RNA viral DENV	02
NAT- PCR	RNA viral DENV/ZIKV/CHIKV	03
Total		34

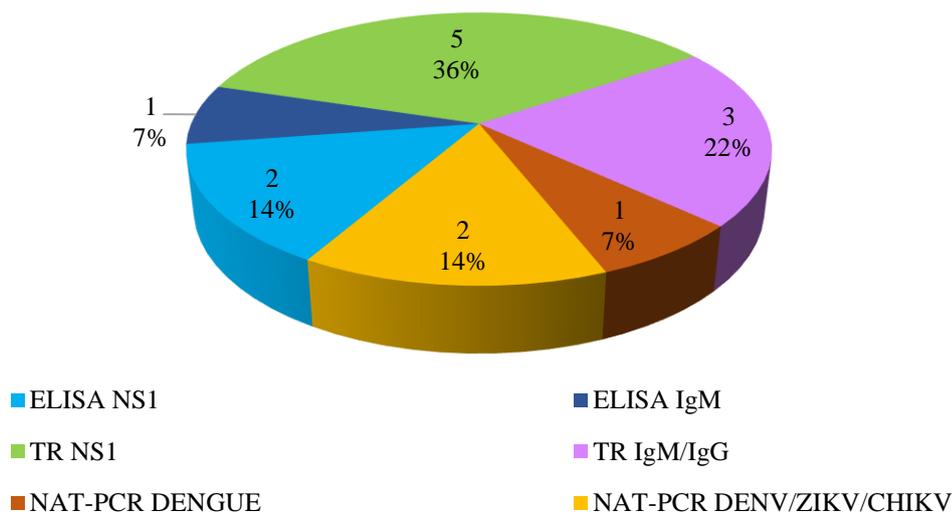
Os *kits* encaminhados foram submetidos a análise laboratorial para a avaliação da sensibilidade e especificidade de acordo com a análise prevista na legislação vigente. O procedimento de análise adotado foi o mesmo realizado para os *kits* anteriormente avaliados. Do total de 34 *kits* recebidos e analisados até a conclusão deste trabalho em março de 2017, 14 foram considerados **SATISFATÓRIOS**, 1 **INSATISFATÓRIO** e 19 estão em análise (Gráfico 40).

Gráfico 40 - Resultados obtidos na análise prévia efetuada de *kits* de diagnóstico após avaliação pelo LSH/INCQS/Fiocruz até março de 2017.



Dos 14 *kits* com resultados **SATISFATÓRIOS**, 02 são de ELISA NS1; 01 de ELISA IgM- 05 TRs para NS1, 03 TRs para IgM/IgG, 01 NAT-PCR Dengue e 02 *kits* para NAT-PCR DENV/ZIKV/CHIKV- Gráfico 41.

Gráfico 41 - Distribuição dos *kits* para o diagnóstico laboratorial de dengue analisados e com resultado satisfatório após avaliação pelo LSH/INCQS/Fiocruz até março de 2017.



Fonte: (LSH, 2015)

Testes ELISA e TR comercialmente disponíveis para pesquisa de NS1 têm sido avaliados em muitos países onde a doença é endêmica, com valores de sensibilidade que variaram de 45% a 91% assim como para especificidade de 62% a 100% mostrando reatividades cruzadas com outras doenças febris (HUNSPERGER et al., 2009; SHAMALA, 2015).

Segundo Shamala e colaboradores (2015), os valores de sensibilidade para os anticorpos IgM avaliados variaram de 53,5% a 100% e de 75% a 100% para especificidade. A sensibilidade para anticorpos IgG nos TRs e de ELISAs variou segundo dados da literatura de 39% a 99,4%. A especificidade avaliada foi de 54% a 100% (VIKERS et al., 2015).

Foi constatado que os *kits* de ELISAs avaliados foram mais sensíveis e os TRs mais específicos para o diagnóstico sorológico da dengue. Os *kits* para detecção de anticorpos IgG nas metodologias avaliadas (ELISA e TR) apresentaram os menores valores de sensibilidade e especificidade.

Sabe-se que os valores divergentes de sensibilidade e especificidade obtidos podem estar associados às diferentes populações analisadas, ao quantitativo de amostras, estágio da infecção ou ainda nas infecções prévias por diferentes sorotipos (BLACKSELL, 2012). Entretanto, Peeling e colaboradores (2010) alertam para a qualidade das validações dos produtos disponibilizados, muitas delas realizadas de forma errônea onde ocorrem falhas desde o quantitativo de amostras avaliadas, inconsistências na avaliação das metodologias, erro de interpretação e execução dos ensaios e título de anticorpos.

Vale ressaltar que a quase totalidade dos produtos são importados de países da América do Norte, Europa e Ásia, em alguns casos onde a doença não é endêmica e portanto não correspondendo a realidade no que diz respeito ao perfil da população de nosso país. Além da dengue, convivemos com outras doenças com sintomas e perfis sorológicos que se cruzam no diagnóstico clínico e laboratorial (MORELI; VIVALDO, 2013).

Uma vez implantada a análise prévia de um total de 34 *kits* recebidos até a presente data, tem demonstrado a necessidade de harmonização da produção quanto a variabilidade entre lotes no que diz respeito aos valores de sensibilidade e especificidade. A variabilidade interlotes tem sido observada, antes de serem lançados no mercado nacional. Há que se atentar para os valores obtidos como alerta da necessidade da vigilância constante.

A avaliação da estabilidade dos produtos mediante as condições de estocagem e transporte, embora não tenham sido objeto deste trabalho devem ser levadas em consideração, pois o Brasil é um país de dimensões continentais e com temperaturas variadas. Em estudo realizado por Sengvilaipaseuth e colaboradores (2017) foi verificado que componentes (anticorpos) de um TR foram afetados pela estocagem em temperatura elevada, reduzindo com isso a sensibilidade do produto.

A implantação e implementação da análise laboratorial dos *kits* de diagnóstico da dengue constitui apenas uma etapa da busca por produtos sensíveis e específicos, caminho já percorrido pelos produtos diagnósticos da Classe IV utilizados na triagem de doadores em serviços de hemoterapia, os quais a análise prévia é aplicada (HIV, HTLV, Hepatites B e C, Chagas e Sífilis), e atualmente com parâmetros de sensibilidade e especificidade bem definidos. A perspectiva é de que as análises implantadas e implementadas para produtos da Classe III neste momento especificamente para dengue sejam em breve extensivas aos produtos para o diagnóstico da Chikungunya e Zika.

5. CONCLUSÕES

- Os painéis sorológicos confeccionados contendo amostras verdadeiro positivas de sorotipos circulantes no Brasil e verdadeiro-negativas, constituem uma ferramenta fundamental na avaliação da sensibilidade e especificidade dos *kits* de diagnóstico *in vitro* utilizados no país na pré e pós-comercialização com vistas ao registro do produto e posterior monitoramento por meio de análise controle.
- Por se tratar de material biológico com volume reduzido se faz necessária a obtenção e caracterização contínua de amostras de indivíduos com suspeita de infecção pela dengue, para retroalimentação dos painéis já constituídos, evitando assim a interrupção das análises dos produtos.
- Se faz necessária a revisão exaustiva das instruções de uso dos produtos avaliados.
- Os ELISAs avaliados possuem sensibilidade superior aos TRs, no entanto os TRs demonstram ser mais específicos quando comparados aos ELISAs.
- Os *kits* para detecção de anticorpos IgG nas metodologias avaliadas (ELISA e TR) apresentaram os menores valores de sensibilidade e especificidade quando comparados a pesquisa de antígeno NS1 e anticorpos IgM.
- Todos os 13 testes avaliados obtiveram resultados de sensibilidade e/ou especificidade inferiores e/ou discrepantes dos declarados nas instruções de uso que acompanham os produtos e, portanto, considerados INSATISFATÓRIOS.
- Os TRs apresentaram resultados extremamente preocupantes, ratificando, portanto, a indicação e informação do Ministério da Saúde de que os *kits para diagnóstico da dengue poderiam estar apresentando resultados Falso Negativos*, fato constatado com os resultados obtidos.

- A análise prévia implantada e implementada como principal desfecho desse trabalho, permitirá que os produtos que atendam aos requisitos básicos de garantia da qualidade, sejam comercializados no país, possibilitando o diagnóstico mais preciso, e consequentemente resultando no tratamento mais eficaz da doença.

6. PERSPECTIVAS

Espera-se que a implantação e implementação das análises prévias e controle para os conjuntos diagnósticos de uso *in vitro* da dengue, fruto da excelência e imprescindibilidade deste trabalho, contribua para melhoria da qualidade dos *kits* de diagnóstico da dengue registrados e conseqüentemente comercializados no país.

Por fim, este feito ratifica que um trabalho inicialmente de pesquisa, porém totalmente vinculado a missão institucional e, por conseguinte à Vigilância Sanitária, tornou de forma obrigatória e irreversível, as análises prévias e controle como mais um atributo no registro de *kits* de diagnóstico da dengue.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V. **Produtos para diagnóstico de uso *in vitro* no Brasil: Uma avaliação do cenário na ANVISA dos últimos cinco anos (2004-2008)**. 2009. 68f. Monografia (Especialista em Vigilância Sanitária) - Escola Nacional de Saúde Pública, Diretoria Regional de Brasília, Fundação Oswaldo Cruz, Brasília, 2009.

ACOSTA, P. O. A. et al. False-negative dengue cases in Roraima, Brazil: an approach regarding the high number of negative results by ns1 ag kits. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, p. 447-450, 2014.

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, p. 376-381, 2002.

ANDRIES, A. C. et al. Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens. **BMC Infect. Dis.**, v. 16, p. 201, maio 2016.

ASHSHI, A. M. Serodetection of Dengue virus and its antibodies among blood donors in the western region of Saudi Arabia: a preliminary study. **Blood Transfusion**, v.13, n. 1, p. 135-138, 2015.

BALMASEDA, A. et al. Diagnosis of Dengue Virus Infection by Detection of Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgA Antibodies in Serum and Saliva. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 317-322, mar. 2003.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estud. av.**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 53-72, dez. 2008.

BEZERRA, M.T. et al. *Aedes (Stegomyia) albopictus* dynamics influenced by spatiotemporal characteristics in a Brazilian dengue-endemic risk city. **Acta Tropica**, v. 164, p. 431-437, 2016.

BHATT S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, abr. 2013.

BLACKSELL, S. D. et al. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 11, p. 1458-64, nov. 2007.

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, 2012. Edição especial 1760.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: history of control in Brazil **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, n. 2, jun. 2007.

BRASIL. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 1973. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1970-1979/lei-5991-17-dezembro-1973-358064-norma-actualizada-pl.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

BRASIL. Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 1976. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6360.htm>. Acesso em: 28 fev. 2017.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 1990. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Lei%20Federal%20N%208080%201990.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2017.

BRASIL. Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 1999. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9782.htm>. Acesso em: 28 fev. 2017.

BRASIL. Decreto Nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneamento e outros. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 1999. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1970-1979/decreto-79094-5-janeiro-1977-428252-publicacaooriginal-1-pe.html>>. Acesso em: 28 fev.2017

BRASIL. Decreto nº 74.170, de 10 de junho de 1974. Regulamenta a Lei número 5.991, de 17 de dezembro de 1973, que dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 1974. Disponível em: <<https://presrepublica.jusbrasil.com.br/legislacao/109691/decreto-74170-74>>. Acesso em: 25 abr. 2017.

BRASIL. Decreto nº 8.077, de 14 de agosto de 2013. Regulamenta as condições para o funcionamento de empresas sujeitas ao licenciamento sanitário, e o registro, controle e monitoramento, no âmbito da vigilância sanitária, dos produtos de que trata a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2013/decreto/d8077.htm>. Acesso em: 28 fev. 2017.

BRASIL, Resolução RDC nº 185 de 17 de 22 de outubro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/2001/185_01rdc.htm>. Acesso em: 26 abr. 2017.

BRASIL. Resolução RDC nº 206 de 17 de novembro de 2006. Estabelece Regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* e seu Registro, Cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/rdc0206_17_11_2006.html>. Acesso em: 05 fev. 2017.

BRASIL. Resolução RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015a. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 2015a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2862781/RDC_36_2015_COMP.pdf/7c073709-b482-4493-b486-16e9940b1665?version=1.0>. Acesso em: 01 mar. 2017.

BRASIL. Portaria SVS nº 08 de 23 de janeiro de 1996. Dispõe sobre o registro de produtos para diagnóstico de uso *in vitro* na Secretaria de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 1996. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/portarias/08_96.htm>. Acesso em: 05 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Febre de chikungunya**: manejo clínico. Brasília: Ministério da Saúde, 2015b. 28 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 58 p.

BRATHWAITE, D. O. et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 4, p. 584-593, 2012.

CAMPOS, F. E; WERNECK, G. A. F; TONON, L. M. **Cadernos de Saúde n. 4**. Belo Horizonte: Coopmed, 2001. 129 p.

CDC, 2017. Laboratory Guidance and Diagnostic Testing Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>>. Acesso em: 2 fev. 2017.

CHATCHEN S; SABCHAREON, A; SIRIVICHAYAKUL C. Serodiagnosis of asymptomatic dengue infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 11–14, 2017.

CHEN, L.; WILSON, M. E. Non-vector transmission of dengue and another mosquito borne flaviviruses. **Dengue Bull**, v. 29, p. 18-31, 2005.

CLARKE, D. H; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropode-borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 7, p. 561-573, 1958.

CORDEIRO, M. T. Laboratory diagnosis for dengue. In: I International Symposium on Dengue of the School of Medicine University of São Paulo on October 6, 2011. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 2012, v. 54, (Suppl. 18): S10-S12.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da vigilância sanitária no Brasil. In: ROZENFELD, S. (Org). **Fundamentos da vigilância sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 15-40, 2000.

COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: saúde e cidadania**. Belo Horizonte: Coopmed, 2001. (Cadernos de Saúde n.4: vigilância sanitária).

CUCUNAWANGSIH; LUGITO, N. P. H.; KURNIAWAN, A. Immunoglobulin G (IgG) to IgM ratio in secondary adult dengue infection using samples from early days of symptoms onset. **BMC Infect. Dis.**, v. 15, n. 276, 2015.

DIAS, L.B.A. et al. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 2, p. 143-152, 2010.

DIAS, L.L. et al. Detection of dengue virus in sera of Brazilian donors. **Transfusion**, v. 52, p. 1667-1671, 2012.

DIRCIO, M. S. A. et al. Leptospirosis Prevalence in Patients with Initial Diagnosis of Dengue. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

DROSTEN, C. et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2323-30, 2002.

FARES, R. C.G. et al. Epidemiological scenario of dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

FELIX, A. C. et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. **J. Med. Virol.**, 2017.

FELIX, A. C. et al. Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos, Brazil, in 2010 **Clin Vaccine Immunol.** v. 19, n. 12, p. 1972-1976, dez. 2012

FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. **Virus Rev. Res.**, v. 1-2, p. 9-16, 1996.

FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1643-1649, 2000.

FRACP, I.R. et al. Dengue Fever and International Travel. **J. Travel. Med.**, v. 20, p. 384–393, nov./dez., 2013.

GILL, M.K. et al. Comparative evaluation of a rapid test with ELISA for the detection of Dengue Infection. **Indian J. Microbiol. Res.**, v. 3, n.4, p. 405-407, 2016.

GUIMARÃES, M. C. S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p.117-120, abr./jun. 1985.

GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 158-165, 1984.

GUBLER, D. J.; SATHER, G. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: HOMMA, A.; CUNHA, J. F. (Eds). **Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue**. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 1988. p. 291-322.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 480–496, 1998.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. **Trop. Med. Health.**, v.39, n. 4, p. 3–11, dez. 2011.

GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp.**, v. 277, p. 3-22, 2006.

GUO, X. X. et al. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for DEN2-43 and New Guinea C virus strains of dengue 2 virus. **Acta Trop.**, v. 128(3), p. 566-70, dez. 2013.

GUPTA, R. K. et al. Dengue Virus Transmission from Living Donor to Recipient in Liver Transplantation: A Case Report. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 6, n. 1, p. 59–61, 2016.

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

GUZMÁN, M.G; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int. J. Infec. Dis.**, v. 8, p. 69-80, 2004.

GUZMÁN, M. G. et al. Multi-Country Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Two Commercially-Available NS1 ELISA Assays for Dengue Diagnosis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 8, e. 811, 2010.

GUZMÁN, M. G., HARRIS E. Dengue. **Lancet**; v. 385, p.453–65, 2015
GYAWALI, N.; BRADBURY, R. S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W.. The epidemiology of dengue infection: harnessing past experience and current knowledge to support

implementation of future control strategies. **J. Vector Borne Dis**, v. 53, p. 293-304, dez. 2016.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **The Lancet**, v. 370, p. 1644-1654, 2007.

HERMANN, L. L. et al. Evaluation of a dengue NS1 antigen detection assay sensitivity and specificity for the diagnosis of acute dengue virus infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 10, p. 1-8, 2014. Ed. especial 3193.

HOTTZ E. et al. Platelets in dengue infection. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 8, p. 33-38, 2011.

HUNSPERGER, E. A. et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus ns1 antigen and anti-dengue virus igm antibody. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 10, p. 1-11, 2014. Ed. Especial 3171.

IGARASHI, A. Isolation of a single's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **J Gen Virol**, v. 40, p. 531-544, 1978.

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, abr. 1989.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP INCQS n° 65.3420.013**: cadastro, distribuição e armazenamento de plasma para confecção de painéis sorológicos. Rev.04. Rio de Janeiro, 2012.

JOHNSON, B.W.; RUSSELL, B.J.; LANCIOTTI, R.S. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 10, p. 4977-4983, 2005.

KAPTEIN, S. J. F.; NEYTS, J. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. **Curr Opin Pharmacol**, v. 30, p. 1-7, jun. 2016.

KASSIM, F. M. et al. Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.**, v. 42, n. 3, p. 562-9, maio 2011.

KATZELNIK, L. C.; COLOMA, J.; HARRIS, E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. **The Lancet**, p. 1-13, fev. 2017.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1-14, 2016.

KING, C. A.; ANDERSON, R.; MARSHALL, J. S. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. **J. Virol.**, v. 76, p. 8408-19, 2002.

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, 2010. Ed. especial 646.

LAPPHRA, K. et al. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 60 (4), p. 387-91, abr. 2008.

LANTERI, M. C.; BUSCH, M. P. Dengue in the context of safe blood and global epidemiology: to screen or not to screen? **Transfusion**, v. 52, p. 1634-1639, 2012.

LEVI, J. E. Dengue Virus and Blood Transfusion (Editorial Commentary). **The Journal of Infectious Diseases**, 2016.

LIMA, M. R. Q. 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. 1-8, 2010. Edição Especial 738.

LIMA, M. R. Q. **Antígeno NS1 dos vírus dengue**: desempenho de testes disponíveis comercialmente e aplicações alternativas para o diagnóstico precoce das infecções por dengue. 2014. 198 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. **Fields Virology**, p. 991–1041, 2001.

LINNEN J. M. et al. Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil and Australia. **Transfusion**, v. 48, p. 1355-1362, 2008.

LIU, Y.; LIU, J.; GONG, C. Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. **Emerging Microbes and Infections**, v. 5, p. 1-6, maio 2016. Edição especial 77.

MARTINEZ, T. E. Dengue. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 33-52, 2008.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta tropica**, v. 166, p. 155-163, 2017.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Evaluation of IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **J Clin Virol**, v. 14, p. 183-189, 1999.

MOHAMMED, H. et al. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. **Transfusion**, v. 48, p. 1348-54, 2008.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, v. 1, p. 1-8, 2013.

MOTA, M. T. O. et al. Mosquito-transmitted viruses - the great Brazilian challenge. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 47, p. 38-50, dez. 2016. Supl. 1.

MUNGRUE, K. The laboratory diagnosis of dengue virus infection, a review. **Adv Lab Med Int.**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; SMITH, W. A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v.5, p. 299-309, 2013.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): a new public health dilemma in dengue control. **Med. J. Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, jan. 2015.

NAJIOULLAH, F.; VIRON, F.; CÉSAIRE, R. Evaluation of Four Commercial Real-Time RT-PCR Kits for the Detection of Dengue Viruses in Clinical Samples. **Virology Journal**, v. 11, 2014.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 253-253, jun. 1990.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n.1, p. 205-211, 2000.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: cocirculation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiol. Infect.**, v. 111, p. 163-170, 1993.

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, nov.-dez. 1992.

OOI, E. E.; GOH, K. T.; GUBLER, D. J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n. 6, p. 887-893, 2006.

OPAS. SESSION OF THE EXECUTIVE COMMITTEE, 156., 2015, Washington.
Provisional Agenda Item 7.8 CE156/INF/8 23. Washington, 2015.

OPAS. 2017 Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by country: epidemiological week / EW 15 (Updated April 20, 2017). Disponível em: <http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=39621&lang=es>. Acesso em: 02 abr. 2017.

OSANAI, C.H. et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, p. 53-54, 1983.

PAL, S. et al. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-8, 2014. Edição especial 113411.

PEELING, R. W.; SMITH, P. G.; BOSSUYT, P. M. M. A guide for diagnostic evaluations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S2-S6, 2010.

PEELING, R.W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue, **Nature Reviews Microbiology**, v .8, p. S30-S37, 2010.

PORTAL DA SAÚDE/MS. **Casos de dengue:** Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016. 2017a. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classica-ate-2016.pdf>>. Acesso em: 05 mar. 2017.

PORTAL DA SAÚDE/MS. **Óbitos por dengue:** Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2016. 2017b. Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/obitos-ate-2016.pdf>>. Acesso em: 05 mar. 2017.

POZZETTO, B.; MEMMI, M.; GARRAUD, O. Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? **World J Virol.**, v. 12, p. 113-123, maio 2015.

RAMOS-CASTAÑEDA, J. et al. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005224>>. Acesso em: 04 mar. 2017.

RAMÍREZ-JARAMILLO, V. et al. Vigilancia epidemiológica, biología molecular y dengue. **Med. Exp. Salud Publica**, v. 31, n. 2, p. 393-401, 2014.

RIVERA, J. et al. Detección de antígenos del virus del dengue en tejidos post mórtem. **Biomédica**, v. 34, n. 4, p. 514-520, 2014.

SABINO, E. C. et al. Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 213, n. 5, p. 694-702, 2016.

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, 2010.

SANG, C. T et al. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of Dengue vírus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 3, p. 407-409, maio 1998.

SANTIAGO, G. A. et al. Correction: Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7 n. 7, 2013.

SASMONO, R. T. et al. Performance of simplexa dengue molecular assay compared to conventional and SYBR green RT-PCR for detection of dengue infection in Indonesia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-8, 2014. Edição Especial 103815.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245-246, 1986.

SEA, V. R. F. et al. Underreporting of Dengue-4 in Brazil Due to Low Sensitivity of the NS1 Ag Test in Routine Control Programs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013. Edição especial 64056.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS/ MS). **Balanco da dengue**: janeiro a julho de 2007. 2007. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue_0210.pdf>. Acesso em: 03 set. 2012.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS/ MS). **Relatório dos casos de dengue 2008**. 2009. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/003_rj_relatorio_de_situacao.pdf>. Acesso em: 03 set. 2012.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS/ MS). **Informe epidemiológico da dengue análise de situação e tendências**. 2010. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_26_final_11_8_10.pdf>. Acesso em: 03 set. 2012.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS/ MS). Dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012). **Boletim epidemiológico**. 2012. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/bolepi_vol_43_n1.pdf>. Acesso em: 03 set. 2012.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS/ MS). Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 3, 2015. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico>>. Acesso em: 11 maio 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS/ MS). Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 14, 2017. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico>>. Acesso em: 11 mai. 2017.

SENGVILAI PASEUTH, O. et al. Temperature of a dengue rapid diagnostic test under tropical climatic conditions: a follow up study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p 1-7, 2017.

SHARP, T.M., et al. A New look at an old disease: recent insights into the global epidemiology of dengue. **Curr Epidemiol Rep**. v. 4, n. 1, p. 11-21. 2017.

SILER, J. F.; HALL, M. W.; HITCHENS, A. P. **Dengue**: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. Manila: Bureau of printing, 1926.

TAHIR, U. et al. *Wolbachia pipiensis*: a potential candidate for combating and eradicating dengue epidemics in Pakistan, **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**; v. 8, n. 12, p. 989-998, 2015.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: vinte e cinco anos da reemergência no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.

TEO, D.; Ng, L. C.; LAM, S. Is dengue a threat to the blood supply? **Transfusion Medicine**, v. 19, p. 66-77, 2009.

VALLE, D. (Org.). **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2015.

VASILAKIS, N. et al. The daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in South East Asia. In: **International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**, 3., 2013.

VICKERS, I.E. et al. The Performance of the SD bioline dengue DUO® Rapid Immunochromatographic test kit for the detection of NS1 Antigen, IgM and IgG antibodies during a dengue type 1 epidemic in Jamaica. **Journal of Biomedical Science** v. 22.1, n.55, 2015.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler, D. J.; Kuno G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York, CAB International, 1997. p. 313–333

WAGNER, D. et al. Nosocomial acquisition of dengue. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1872-1873, 2004.

WIWANITKIT, V. Non vector-borne transmission modes of dengue. **J. Infect. Dev. Ctries**, v.4, n. 1, p. 051-054, 2010.

WHO. **Dengue and severe dengue (Fact sheet N°117)**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

WHO. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2. ed. Geneva, 1997.

WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**, Geneva, p. 144, 2009a.

WHO. **Global Strategy for dengue prevention and control, 2012–2020**. 2012. Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf>.

WHO. **Special programme for research and training in tropical diseases: evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests, 2009b**. (Diagnostics evaluation series, 3)

WHO. **Weekly epidemiological record**. In: RELEVÉ ÉPIDÉMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE, 91., 2016, 2016. p. 349-364. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf?ua=1>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

XAVIER, A. R. et al. Manifestações clínicas na dengue: diagnóstico laboratorial. **JBM**, v. 102 n. 2, p. 1-14, mar./abr. 2014.

XU, H. et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 8, p. 2872-8, 2006.

ZAINAH, S. et al. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. **J. Virol. Methods.**, v. 155, n. 2, p. 157-60, 2009.

ZHANG, B. et al. Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. **Nanomedicine**, v. 11, n. 7, p. 1745-61, out. 2015.

ZHANG, H. et al. NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue infection: a meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p 57–66, 2014.

ANEXO A – OFÍCIO DE SOLICITAÇÃO DE ANÁLISE PRÉVIA ENCAMINHADO PELA ANVISA

Sistema de Arrecadação - Acesso - Caixa Postal

Página 1 de 2

 Ministério da Saúde	 Agência Nacional de Vigilância Sanitária <small>www.anvisa.gov.br</small>	Caixa Postal	
DE: GEVIT ASSUNTO: Análise prévia - INCQS		ENVIADA EM:	
 			
Ofício nº		/2016, GERÊNCIA DE PRODUTOS DIAGNÓSTICOS DE USO IN VITRO/ANVISA Brasília, '2016	
Ao(À) Senhor(a)			
Produto : Ref.: Processo:			
Assunto: Análise Prévia INCQS – Kits sorológicos			
<p>1. Conforme disposto no inciso IV do Art. 16 da Lei nº 6360/76, solicitamos o envio ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS de amostras dos produtos constantes neste processo, para realização de análise prévia, cujos custos serão por conta da empresa solicitante. Orientações quanto ao pagamento das análises poderão ser obtidas diretamente na instituição.</p> <p>2. Salientamos que ao encaminhar os produtos ao INCQS, estes deverão ser <u>de um único lote</u> e estar identificados com o respectivo nome comercial e número de processo a que se referem. De acordo com a metodologia do produto, encaminhar o equivalente a:</p>			
Metodologia		Amostragem	
ELISA; Quimioluminescência; Teste Rápido; Aglutinação; Hemaglutinação		1.000 testes	
Western Blot, ImunoDot, IFI (Imunofluorescência)		300 testes	
VDRL e RPR (Sífilis)		500 testes	
Dengue – ELISA; Teste Rápido		300 testes	
Dengue – IFI (Imunofluorescência)		200 testes	
Reagentes confirmatórios (acompanhados dos reagentes específicos para realizar as análises)		Quantitativo suficiente para esgotar 300 testes	
Controles e Calibradores (acompanhados dos reagentes específicos para realizar as análises)		Quantitativo suficiente para esgotar 200 testes	
Soro Controle de parâmetro único ou multiparamétrico		Quantitativo suficiente para esgotar 300 testes	
Produtos para amplificação de Ácido Nucléico (acompanhados dos reagentes específicos para realizar as análises)		400 testes	
<p>3. Os produtos deverão ser entregues pelo solicitante com vida útil superior ou igual a 50% do tempo de validade previsto pelo fabricante, no período normal de expediente da instituição (de segunda à sexta-feira, das 08h às 17h), no seguinte endereço:</p>			

<http://www.anvisa.gov.br/Datavisa/CaixaPostal/CaixaPostal.asp>

Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro/RJ, CEP: 21040-900
Telefones: (21) 3865-5184 e (21) 2598-4290, Ramal: 5184
Fax: (21) 2290-0915
Email: incqs@incqs.fiocruz.br ou ish@incqs.fiocruz.br

4. Esta mensagem visa agilizar os procedimentos de análise prévia inerentes a este tipo de produto. Destacamos que a petição ainda não sofreu análise técnica.

5. No momento da entrega dos produtos ao INCQS, a empresa deverá apresentar a seguinte documentação, referente ao lote em questão, a fim de subsidiar a análise:

- a) Dossiê completo de produção e controle de qualidade;
- b) Certificado de liberação emitido pelo controle da qualidade;
- c) Equipamento específico, reagentes complementares e acessórios necessários à execução das análises (caso se aplique);
- d) Painel comercial para o marcador, de título baixo ou título misto ou painel com resultados qualitativos e/ou quantitativos para NAT (caso se aplique);

Atenciosamente,

Gerência de Produtos Diagnósticos de Uso *in vitro*

Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Setor de Indústria e Abastecimento (SIA) - Trecho 5, Área Especial 57 / Lote 200
CEP: 71205-050 - Brasília/DF
Fone: 0800-642 9782
www.anvisa.gov.br
Controle 0574AC2FDAE841B98332D9295A0B6658

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Setor de Indústria e Abastecimento (SIA) - Trecho 5 - Área Especial 57 - Brasília (DF) - CEP 71205-050 - Tel: (61) 3462-6000 - Disque Saúde: 0 800 61 1997

Copyright © 2003 Anvisa

ANEXO B - FORMULAÇÃO E EXIGÊNCIA EMITIDA PELA ANVISA

Exigência nº Notificação de Exigência Nº

Página 1 de 2

	Agência Nacional de Vigilância Sanitária GERÊNCIA DE PRODUTOS DIAGNÓSTICOS DE USO IN VITRO SIA, trecho 5, área especial 57 - CEP 71.205-050 - Brasília - DF	
FORMULAÇÃO DE EXIGÊNCIA		
Exigência nº:	Notificação de Exigência Nº	
Expediente nº:		
Empresa:		
Representante Legal:		
Endereço:		
Nº Telefone:	Fax:	
Nº Processo:		
Expediente do Documento:		
Assunto:		
Produto:		
EXPLICITAÇÃO DA EXIGÊNCIA		
<p>1. Considerando a publicação da Resolução RDC nº 23, de 5 de junho de 2015, em que fica estabelecido no artigo 6º o prazo de cumprimento de exigência em 120 (cento e vinte) dias IMPRORROGÁVEIS, contados a partir da data da CONFIRMAÇÃO DO RECEBIMENTO DA EXIGÊNCIA, solicita-se, visando otimizar o procedimento das análises prévias, que a empresa apresente como cumprimento de exigência o comprovante de recebimento de amostras para análise prévia no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). TAL COMPROVANTE, PREFERENCIALMENTE A NOTA FISCAL, SERÁ DEVIDAMENTE PROTOCOLADO NO ATO DA ENTREGA NA CENTRAL DE RECEBIMENTO DE AMOSTRAS DO INCQS. Solicitamos entrar em contato com o INCQS para proceder à análise.</p>		
<p>Conforme dispõe o art. 7º da resolução RDC nº 204/05, o interessado</p>		

deverá cumprir as exigências técnicas, solicitar prorrogação de prazo, contestar as exigências ou solicitar o arquivamento temporário do processo, em **prazo máximo de 120 dia(s)**.

Ressaltamos que o cumprimento de exigências deverá contemplar todos os itens descritos neste documento. Não serão aceitos cumprimentos parciais de exigências.

Ainda, por razões administrativas, informamos que a documentação encaminhada deve ser numerada, rubricada e protocolizada.

No formulário de resposta ao Cumprimento de Exigência e/ ou Prorrogação de Prazo, a ser protocolado na UNIAP, no campo Gerência Geral, Gerência ou Unidade a que se destina, especificar a coordenação responsável pela análise. Utilizar o número do expediente gerado para a exigência, e não o número do expediente da petição.

Em caso de dúvidas ou solicitação de desconsideração de itens da exigência, entrar em contato via ANVISATENDE no telefone 0800-642-9782.

Brasília,
/2017

Documento Assinado Digitalmente
GERÊNCIA DE PRODUTOS DIAGNÓSTICOS DE USO IN VITRO

**ANEXO C - RESPOSTA À SOLICITAÇÃO DE ANÁLISE, ENCAMINHADA PARA
AS EMPRESAS INCLUINDO PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM,
DOCUMENTAÇÃO, ACESSÓRIOS, EQUIPAMENTOS (CASO SE APLIQUE) E
PAGAMENTO DA ANÁLISE**



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Rio de Janeiro, de de 2017.

EMPRESA-

Processo UPD/ANVISA n°: **Produto:**

Em resposta a sua mensagem transmitida por meio eletrônico datada de temos a informar que para análise prévia do(s) produto(s) supracitado(s), solicitamos:

1. Cópia do comprovante de pagamento da taxa de análise no valor de **RS** _____ em favor da FIOTEC INCQS Institucional, Projeto: _____, através de depósito bancário ou ordem de pagamento: **Banco do Brasil, Agência n°:** _____, **conta n°:** _____ para cada lote de produto e/ou para cada diferente produto;

2. A documentação e a amostragem dos kits para diagnóstico a ser apresentada no ato da entrega dos produtos estão descritas no Ofício emitido pela GEVIT/GGTPS/ANVISA/MS.

NOTA: Solicito a atenção quanto ao item **5.c** do Ofício encaminhado pela ANVISA:

Equipamento específico, reagentes complementares e acessórios necessários à execução da análise (caso se aplique)

Ratificamos que caso o kit necessite para a execução do teste deste conjunto de itens é imprescindível a sua entrega juntamente com o kit objeto da análise. No caso de ausência de um destes itens, inviabilizará a realização do teste e o laboratório ficará aguardando o recebimento de **TODOS** os itens envolvidos para iniciar a análise proposta.

Entretanto, as informações acima fornecidas, somente deverão ser consideradas se a empresa encaminhar a diligência emitida pela Gerência de Produtos para Diagnóstico In Vitro da Gerência Geral de Tecnologia e Produtos para a Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, solicitando a Análise Prévia dos produtos supracitados, haja vista o INCQS realizar apenas as análises preconizadas na legislação vigente, caso contrário, desconsiderar esta mensagem.

Prot. nº:
/DI/17.

ANEXO D - ANÁLISE CONTROLE - OFÍCIO ENCAMINHADO VIA MINISTÉRIO DA SAÚDE PARA SOLICITAÇÃO DE AVALIAÇÃO DE PRODUTO PARA AQUISIÇÃO DE KITS, DISTRIBUIÇÃO E USO NOS SERVIÇOS DE SAÚDE DO PAÍS.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Rio de Janeiro, de de 2017.

EMPRESA:**PRODUTO:**

ANÁLISE CONTROLE – EXIGÊNCIA PARA ANÁLISE

1- PAGAMENTO DA ANÁLISE:

1.1. Cópia do comprovante de pagamento da taxa de análise no valor de **R\$** _____ em favor da FIOTEC INCQS Institucional, Projeto: _____, através de depósito bancário ou ordem de pagamento: **Banco do Brasil, Agência nº: conta nº:** para cada lote de produto e/ou para cada diferente produto;

2- AMOSTRAGEM:

Conforme tabela abaixo discriminada:

MARCADOR	METODOLOGIA	AMOSTRAGEM
- HIV antígenos e anticorpos - HTLV anticorpos - HEPATITE B antígenos e anticorpos - HEPATITE C antígenos e anticorpos - DOENÇA DE CHAGAS - SÍFILIS	- ELISA - QUIMIOLUMINESCÊNCIA - TESTE RÁPIDO - HEMAGLUTINAÇÃO - AGLUTINAÇÃO	- 500 TESTES
- DENGUE NS1 - DENGUE IgM - DENGUE IgG - DENGUE IgM/IgG - DENGUE NS1/IgM/IgG - CHIKUNGUNYA - CHIKUNGUNYA IgM - CHIKUNGUNYA IgG - ZIKA NS1 - ZIKA IgM - ZIKA IgG - ZIKA NS1/IgM/IgG - DENGUE/CHIKUNGUNYA/ZIKA - OUTROS MARCADORES	- ELISA - TESTE RÁPIDO	- 300 TESTES

1/3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde


- HIV antígenos e anticorpos - HTLV anticorpos - DOENÇA DE CHAGAS - SÍFILIS - MOSAICO- DENGUE/CHIKUNGUNYA/ ZIKA - OUTROS MARCADORES	- WESTERN BLOT - IMMUNODOT - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	- 200 TESTES
- Sífilis	- VDRL - RPR	- 300 TESTES
- Produtos para amplificação de Ácido Nucléico (acompanhados dos reagentes específicos para realizar as análises)	- HIV; - HBV; - HCV; - HIV; HBV; HCV; - DENGUE/CHIKUNGUNYA/ZIKA	- 250 TESTES

3. ENTREGA DOS PRODUTOS PARA ANÁLISE:

3.1. Os produtos deverão ser entregues pelo solicitante com vida útil superior ou igual a 50% do tempo de validade previsto pelo fabricante, no período normal de expediente da instituição (de segunda à sexta-feira, das 08h às 17h), no seguinte endereço:

<p>INCQS - FIOCRUZ</p> <p>Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro/RJ, CEP: 21040-900</p> <p>Telefones: (21) 3865-5184 e (21) 2598-4290, Ramal: 5184</p> <p>Fax: (21) 2290-0915</p> <p>Email: incqs@incqs.fiocruz.br ou marisa.adati@incqs.fiocruz.br ou helena.guedes@incqs.fiocruz.br ou margaret.guimaraes@incqs.fiocruz.br</p>
--

3.2. No momento da entrega dos produtos ao INCQS, a empresa deverá apresentar a seguinte documentação, referente ao lote em questão, a fim de subsidiar a análise:

3.2.1. Dossiê completo de produção e controle de qualidade;

2/3

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
 Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



3.2.2. Certificado de liberação emitido pelo controle da qualidade;

3.2.3. IMPRESCINDÍVEL: Equipamento específico, reagentes complementares e acessórios **NECESSÁRIOS** à execução das análises e principalmente os reagentes e acessórios que não são fornecidos (caso se aplique – por exemplo: reagentes para extração e PCR das amostras)

NOTA: ao fornecer os equipamentos, é **IMPRESCINDÍVEL**, a empresa enviar um profissional destinado a instalação dos equipamentos e treinamento dos técnicos do laboratório.

3.2.4. Painel comercial para o marcador, de título baixo ou título misto ou painel com resultados qualitativos e/ou quantitativos para NAT (caso se aplique);

Equipamento específico, reagentes complementares e acessórios necessários à execução da análise (caso se aplique)

*Ratificamos que, caso o kit necessite para a execução do teste deste conjunto de itens é **imprescindível** a sua entrega juntamente com o kit objeto da análise. No caso de ausência de um destes itens, inviabilizará a realização do teste e o laboratório ficará aguardando o recebimento de **TODOS** os itens envolvidos para iniciar a análise proposta.*

Prot. s/n
/DI/17

APÊNDICE A - PROTOCOLO DE ANÁLISE ESTABELECIDO PARA AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS POR ANÁLISE PRÉVIA PARA METODOLOGIA ELISA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



PROTOCOLO DE ANÁLISE: DENGUE- PRÉVIA

INSTRUÇÃO DE TRABALHO (IT) nº: 02, rev. 1

1. PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE- METODOLOGIA: ELISA

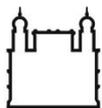
- 1.1. Ao abrir o kit, verificar todos os componentes;
- 1.2. Analisar cuidadosamente a Instrução de uso;
- 1.3. Iluminar as informações pertinentes a execução do ensaio;
- 1.4. Preencher atentamente a Lista de Verificação.

1.5. MICROPLACA # 1

- 1.5.1. Preencher atentamente o protocolo de ensaio;
- 1.5.2. Registrar no protocolo de ensaio o número de **Controles Positivos (CP); Negativos (CN) e Calibradores (CAL) e Branco (B)** (caso aplicável), correspondente ao quantitativo designado na Instrução de Uso no início da microplaca. Deverá ser repetido na última coluna da Microplaca;
- 1.5.3. Distribuir as amostras na seguinte ordem:
 - ✓ Amostras **NEGATIVAS para Dengue;**
 - ✓ Coluna 4 ou 5- inserir uma coluna com apenas **CN**;
 - ✓ Coluna 7 ou 8- inserir uma coluna com apenas **CP**;
 - ✓ Coluna 9 ou 10- inserir uma coluna com apenas **CAL** (caso aplicável);
 - ✓ No caso não aplicável, inserir esta coluna com **amostras INTERFERENTES**: spike- soro negativo para:
 - ✓ Soro negativo+ **HCV pos**- 02 amostras
 - ✓ Soro negativo + **HIV pos**- 02 amostras;
 - ✓ Soro negativo + **HBsAg pos**- 02 amostras;
 - ✓ Soro negativo + **Zika pos**- 02 amostras;
 - ✓ Completar até o final com **amostras NEGATIVAS para Dengue.**

1.6. MICROPLACA # 2

- 1.6.1. Distribuir as amostras na seguinte ordem:
 - ✓ Amostras **POSITIVAS para Dengue;**
 - ✓ Coluna 4 ou 5- inserir uma coluna com apenas **CN**;
 - ✓ Coluna 7 ou 8- inserir uma coluna com apenas **CP**;
 - ✓ Coluna 9 ou 10- inserir uma coluna com apenas **CAL** (caso aplicável);
 - ✓ Inserir 02 amostras **POS** para Dengue de Bio-Manguinhos, preferencialmente CG009 e CG012;



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



- ✓ Inserir o Soro Referência NIBSC para Dengue (IgM e IgG)
- ✓ Inserir também de 03 a 4 amostras POS para Dengue do Painel BBI;
- ✓ Inserir o *spike* com cultura de células para **DENGUE**;
- ✓ Complementar a microplaca com amostras a caracterizar para Dengue

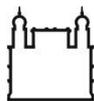
1.7. MICROPLACA # 3 e 4

1.7.1. Distribuir as amostras na seguinte ordem:

- ✓ Repetir as amostras com resultados discordantes;
- ✓ Coluna 4 ou 5- inserir uma coluna com apenas **CN**;
- ✓ Coluna 7 ou 8- inserir uma coluna com apenas **CP**;
- ✓ Coluna 9 ou 10- inserir uma coluna com apenas **CAL** (caso aplicável);
- ✓ Complementar a microplaca com amostras a caracterizar para Dengue.

Elaborado por: Marisa C. Adati
REV. 01
Em, 07.09.2016

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE ANÁLISE ESTABELECIDO PARA AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS POR ANÁLISE PRÉVIA PARA METODOLOGIA TESTE RÁPIDO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



PROTOCOLO DE ANÁLISE: DENGUE

INSTRUÇÃO DE TRABALHO (IT) nº: 07

PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE- METODOLOGIA- TESTE RÁPIDO

- 1.1. Ao abrir o kit, verificar todos os componentes;
- 1.2. Analisar cuidadosamente a Instrução de uso;
- 1.3. Iluminar as informações pertinentes a execução do ensaio;
- 1.4. Preencher atentamente a Lista de Verificação.

1.5. PREENCHER ATENTAMENTE O PROTOCOLO DE ENSAIO:

- ✓ Distribuir as amostras no PROTOCOLO na seguinte ordem:

1.5.1. **CASSETES 1; 2; 19 e 20: CONTROLES- POS. NEG;**

1.5.2. **DEMAIS CASSETES:** Amostras **POSITIVAS** para DENGUE;

1.5.3. **A CADA 20 CASSETES-** REPETIR OS CONTROLES conforme disposto no item 1.5.1;

1.5.4. Inserir no PROTOCOLO: **amostras INTERFERENTES:** *spike-* soro negativo para:

- ✓ Soro negativo+ **HCV pos- 02 amostras;**
- ✓ Soro negativo + **ZIKA IgG POS. (para o caso de DENGUE)- 05 amostras;**
- ✓ Soro negativo + **MAYARO POS. (para o caso de CHIKUNGUNYA)- 02 amostras;**

1.5.5. Após a distribuição acima descrita continuar a análise com **amostras NEGATIVAS** para o marcador analisado;

1.5.6. Complementar o ensaio com amostras a caracterizar ou LSH para o marcador analisado.

Elaborado por: Marisa C. Adati
Em, 07.09.2016