



DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA

**Estudo Diagnóstico Pragmático de Algoritmo Clínico-Laboratorial
para Dengue 4 em uma Unidade de Pronto Atendimento no Rio de
Janeiro, 2013**

SIBELLE NOGUEIRA BUONORA

RIO DE JANEIRO

2016

**Estudo Diagnóstico Pragmático de Algoritmo
Clínico-Laboratorial para Dengue 4 em uma
Unidade de Pronto Atendimento no Rio de Janeiro,
2013**

SIBELLE NOGUEIRA BUONORA

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / Fiocruz para obtenção do título de Doutor em Pesquisa Clínica na área de Infectologia.

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Sonia Regina Lambert Passos
Prof^a. Dr^a. Regina Paiva Dumas

Rio de Janeiro

2016

SIBELLE NOGUEIRA BUONORA

**Estudo Diagnóstico Pragmático de Algoritmo
Clínico-Laboratorial para Dengue 4 em uma
Unidade de Pronto Atendimento no Rio de Janeiro,
2013**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / Fiocruz para obtenção do título de Doutor em Pesquisa Clínica na área de Infectologia.

Orientadoras: Profa. Dra. Sonia Regina Lambert Passos

Profa. Dra. Regina Paiva Daumas

Aprovada em: 29/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Augusto Ferreira de Andrade
Doutor em Saúde Pública
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / FIOCRUZ

Profa. Dra. Flávia Barreto dos Santos
Doutora em Virologia
Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Prof. Dr. Guilherme Amaral Calvet
Doutor em Pesquisa Clínica
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / FIOCRUZ

Prof. Dr. José Cerbino Neto
Doutor em Pesquisa Clínica
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / FIOCRUZ

Profa. Dra. Sheila Moura Pone
Doutora em Pesquisa Clínica
Instituto Nacional da Saúde da Mulher e da Criança Fernandes Figueira /
FIOCRUZ

Trabalho realizado no Laboratório de Epidemiologia Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / Fiocruz, Rio de Janeiro, com apoio operacional da Secretaria

Estadual de Saúde do Rio de Janeiro e do
Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo
Cruz/Fiocruz e apoio financeiro do CNPq.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Marco Polo, curioso insaciável e cientista nato que plantou em mim a sementinha do conhecimento que agora timidamente germina, e à minha mamãezinha Valéria, brava guerreira, exemplo de profissional e acima de tudo mãe, esposa e avó. Exemplos para toda a vida.

Não vá por onde há trilhas e sim onde não há trilhas e as deixe.

Ralph Waldo Emerson

Um homem deve ser grande para admitir seus erros, inteligente o bastante para tirar proveito deles, e forte o suficiente para corrigi-los.

John C. Maxwell

AGRADECIMENTOS

Homens são anjos com uma só asa.
Para voar, precisa grudar no outro.

Luciano de Crescenzo

Agradeço ao meu marido **Paulo Sergio da Silva Reis Junior** por, ao seu modo, me incentivar e apoiar durante o trabalho nem sempre tranquilo envolvendo a execução, elaboração e conclusão deste trabalho.

Aos meus filhos **Gabriel** e **Maria Clara**, meu príncipe e minha lindinha. O meu estímulo para manter sempre a chama da curiosidade e do conhecimento acesos. O tempo de nossa convivência “roubado” pela tese só fez fortalecer a vontade de estar junto de vocês.

Agradeço à minha orientadora, professora **Sonia Regina Lambert Passos** por ter acreditado nos devaneios da bombeira que a encontrou nas madrugadas de Rotterdam.

Agradeço à minha orientadora, professora **Regina Paiva Daumas** pelo companheirismo, apoio e disponibilidade durante todo o projeto.

Ao meu pai **Marco Polo Pereira Buonora**, minha mãe **Valéria Marcia Nogueira Buonora**, e meus irmãos **André** e **Eric Nogueira Buonora**; agradeço por compreenderem as minhas ausências, pelo apoio logístico, pelo carinho, amor, amizade e até pelas cobranças nos meus momentos de desânimo. Obrigada por tudo! Amo vocês!

Agradeço todo o apoio recebido pelo Laboratório de Flavivírus, em especial a querida **Monique Rocha de Lima** que mesmo na fase final do doutorado disponibilizou um pouco do seu precioso tempo para processar todas as minhas amostras.

Agradeço ao querido estatístico **Cleber Nascimento do Carmo** por ter conseguido desvendar os mistérios das minhas mais loucas solicitações.

À minha querida amiga **Patrícia Mouta Nunes de Oliveira** os meus braços, pernas, olhos e ouvidos durante estes quatro anos. Obrigada pelo carinho que sempre teve comigo.

À minha querida equipe da **Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar/ SES**, por permitirem que eu concluísse esta etapa sem deixar que as tarefas ficassem pendentes.

À **Diana Nascimento Rodrigues de Oliveira, Fernanda Moisés Quintela e Levy Vilas Boas Fukuoka** alunos de Iniciação Científica que tanto colaboraram para a construção e execução deste projeto.

À equipe do **Laboratório de Epidemiologia Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas**, muito obrigada por me acolher nesta grande família.

Ao meu chefe, **Alexandre Otávio Chieppe**, por compreender minhas ausências e me incentivar nessa nova etapa.

Ao meu amigo, **Nilson da Costa**, responsável pelo começo de tudo.

À minha estrela maior **Maria de Lourdes Leite Nogueira** que durante as maiores tribulações deste meu processo, havia apenas um par de pegadas na areia.

Buonora, S. N. **Estudo Diagnóstico Pragmático de Algoritmo Clínico-Laboratorial para Dengue 4 em uma Unidade de Pronto Atendimento no Rio de Janeiro, 2013.** Rio de Janeiro, 2016. 94 fls. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

O dengue é a arbovirose mundialmente mais relevante em termos de abrangência, morbidade e mortalidade. O vírus contém 4 sorotipos sendo o dengue-4 (DENV-4) o menos estudado. O diagnóstico precoce é importante para o manejo clínico adequado e melhor organização dos serviços assistenciais. Atualmente seu diagnóstico baseia-se em critérios clínicos inespecíficos e provas laboratoriais sorológicas cujas acurácias não foram avaliadas em cenários de DENV-4. A fim de contribuir para as ações de vigilância, diagnóstico laboratorial e para a identificação de características clínicas úteis para o diagnóstico do dengue, avaliamos a acurácia de algoritmo diagnóstico clínico-laboratorial para o dengue obtidos com o uso de instrumento padronizado em cenário amplo em termos de saúde pública e espectro clínico de doentes. Todos 372 sujeitos deste trabalho eram pacientes adultos com doença febril aguda atendidos nas primeiras 72 horas de doença em uma Unidade de Pronto Atendimento durante a epidemia de dengue de 2013 no Rio de Janeiro. Avaliamos a acurácia do teste imunocromatográfico NS1 Bioeasy[®] e de três critérios para o diagnóstico clínico do dengue, OMS 1997, OMS 2009 e INI-FIOCRUZ. Os dados clínicos foram coletados utilizando um questionário semi-estruturado e foram coletadas amostras de sangue dos doentes para a realização do teste índice NS1 Bioeasy[®] e para o padrão de referência, RT-PCR. De acordo com os resultados dos testes de referência, 148 pacientes foram classificados como DENV-4 e 177 como não-DENV-4. Foram obtidos os parâmetros de acurácia para o NS1 Bioeasy[®] sozinho e combinado aos critérios clínicos. O critério da OMS 1997 apresentou sensibilidade excelente (97.9%) para descartar a doença, mas especificidade extremamente baixa (2.8%) o que também ocorreu com o critério OMS 2009 (87,1% e 24,3%, respectivamente), enquanto o critério INI-FIOCRUZ apresentou sensibilidade e especificidade moderados (70.9% e 71.8%, respectivamente). Já os parâmetros do NS1 Bioeasy[®], 44.5% e 97.8%, nos indicam que o teste não deva ser usado para fins de triagem em epidemias de DENV-4, sendo o seu emprego mais aconselhável como teste confirmatório em um algoritmo à beira do leito. Descrevemos ainda concordância entre observadores quanto às informações da anamnese em 346 pacientes. Os dados clínicos foram coletados de forma independente por médico e enfermeiro ou interno de medicina e enfermeiro, utilizando um questionário semi-estruturado e a concordância interobservadores foi estimada pelo índice kappa. Com concordâncias substanciais dentre a maioria dos sinais e sintomas usados para avaliar doenças

febris agudas, o questionário aplicado por equipe multiprofissional (médicos e enfermeiros) deve ser usado como instrumento de avaliação diagnóstica durante epidemias de dengue. Os resultados obtidos neste trabalho sinalizam a necessidade de se desenvolver algoritmos clínico-laboratoriais mais acurados para o diagnóstico precoce de dengue possivelmente através de uma abordagem multiprofissional.

Palavras chave: 1.Dengue; 2. Acurácia; 3. Sensibilidade; 4.Especificidade; 5. Diagnóstico; 6.Confiabilidade; 7. NS1.

Buonora, S. N. **Pragmatic Diagnostic Study of a Clinical- Laboratory Algorithm for Dengue 4 in an Urgent Care Facility in Rio de Janeiro, 2013.** Rio de Janeiro, 2016. 94 p. Thesis [PhD in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

ABSTRACT

Dengue is the most important arboviroses in terms of widespread, morbidity and mortality. The virus has four serotypes and the serotype 4 (DENV-4) is the less studied. Early diagnosis is important to optimize the treatment and to better organize of the health care system. Nowadays the diagnosis is based on unspecific clinical criteria and serologic laboratory tests, however the accuracy in DENV-4 settings have not been well established DENV-4. In order to contribute with surveillance activities, laboratory diagnosis and to better identify the clinical aspects for dengue diagnosis, we have studied the accuracy of the clinical-laboratory dengue diagnosis algorithm using a standard instrument in an urgent health care setting with a large variety of clinical presentations. All 372 subjects in this work were adults with acute febrile disease within the first 72 hours of disease that were evaluated in an urgent care facility during the 2013 Rio de Janeiro dengue outbreak. We have evaluated NS1 Bioeasy[®] immunocromatografic test, WHO 1997, WHO 2009 and INI-FIOCRUZ accuracy parameters. Clinical data was collected using a semi-structured form and blood samples were collected for the NS1 Bioeasy[®] index test and the RT-PCR reference test. According to the latter, we identified 148 patients with DENV-4 and 177 not DENV-4. Alone and combined NS1 Bioeasy[®] accuracy parameters were obtained. WHO 1997 clinical criteria presented excellent sensitivity (97.9%) but extremely low specificity (2.8%) , the same with the WHO 2009 criteria (87.1% and 24.3%, respectively) but the INI-FIOCRUZ clinical criteria, presented moderate sensitivity and specificity (70.9% and 71.8%, respectively). NS1 Bioeasy[®] parameters (44.5% and 97.8%), however, indicate that the test alone cannot be a DENV-4 outbreak triage test. It would be better used as a bedside confirmatory test combined with a clinical algorithm. We have also described history taking interobserver agreement in 346 patients. Clinical data was independently collected using a semi-structured form by a clinician and nurse or by an intern and nurse pair. Kappa index was used to estimate the interobserver agreement. Substantial agreement was obtained in the majority of the signs and symptoms used to evaluate acute febrile illnesses which probably indicate that the form can be used for diagnostic evaluations in a mutiprofessional (nurse and clinician) manner during dengue outbreaks. The

results obtained in this work point out the need to develop more accurate clinical-laboratory early dengue diagnosis algorithms possibly with a multiprofessional approach.

Key words: 1.Dengue; 2. Accuracy; 3. Sensitivity; 4. Specificity; 5. Diagnosis; 6. Reliability; 7. NS1.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CNPq= Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONSORT= Consolidated Standards of Reporting Trials

DENV= dengue vírus

DENV-1= dengue vírus sorotipo 1

DENV-2= dengue vírus sorotipo 2

DENV-3= dengue vírus sorotipo 3

DENV-4= dengue vírus sorotipo 4

DNA= ácido desoxirribonucleico

ELISA= Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FD= Febre do dengue

FHD= Febre hemorrágica do dengue

FIOCRUZ= Fundação Oswaldo Cruz

GDTVZ= Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses

HIV= vírus da imunodeficiência humana

IC= intervalo de confiança

IgG= Imunoglobulina G

IgM= Imunoglobulina M

INI-FIOCRUZ= Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

IQR= intervalo interquartil

K = índice de Kappa

LLR+= razão de verossimilhança positiva

LLR-= razão de verossimilhança negativa

ND4= não-dengue 4

nm= nanômetros

NPV= valor preditivo negativo

NS1= proteína não-estrutural 1

OMS= Organização Mundial da Saúde

OR= odds ratio

PPV= valor preditivo positivo

RNA= ácido ribonucleico

RT-PCR= reação de transcriptase reversa seguida da reação pela cadeia de polimerase

SCD= síndrome do choque do dengue

SES-RJ= Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro

STARD= Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Study

UPA 24H= Unidade de Pronto Atendimento

VPP= valor preditivo positivo

VPN= valor preditivo negativo

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Mapa de risco de transmissibilidade do dengue	6
Figura 2	Genoma do dengue vírus	7
Figura 3	Mapa de co-circulação do DENV, distribuição da incidência dos sorotipos desde 1943	8
Figura 4	Número médio de casos de dengue nos 30 países que mais notificaram à OMS, 2004-2010	10
Figura 5	Curva epidemiológica de casos notificados por dengue no Rio de Janeiro de 1986 até 2013	12
Figura 6	Diagrama de controle do dengue, casos notificados por semana epidemiológica de início de sintomas, no Estado do Rio de Janeiro, anos 2010 a 2014.	13
Figura 7	Fluxograma para classificação e manejo do dengue	17
Figura 8	Comparação da sensibilidade dos testes positivos para o diagnóstico de dengue de acordo com o número de dias de doença	22
Figura 9	Cinética antígeno e anticorpo nas infecções por dengue	23
Figura 10	Extensão do CONSORT para estudos pragmáticos	27
Figura 11	Matriz de cálculo baseada na tabela de contingência para testes diagnósticos	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Dengue	1
1.1.1	Histórico	2
1.1.2	O vetor	4
1.1.3	Vírus do dengue	6
1.1.4	Epidemiologia	8
1.1.5	Caracterização clínica do dengue	14
1.1.6	Outros instrumentos para diagnóstico clínico	18
1.1.7	Diagnóstico laboratorial do dengue	21
1.2	O Atendimento ao caso suspeito de dengue na Unidade de Pronto Atendimento (UPA 24H)	24
1.3.	Preceitos epidemiológicos	25
1.3.1	Medidas de acurácia diagnóstica	27
1.3.2	Medidas de reprodutibilidade	30
1.3.3	Emprego de parâmetros epidemiológicos para o diagnóstico do dengue	30
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	MANUSCRITO 1 - Accuracy of Clinical Criteria and an Immunochromatographic Strip Test for Dengue Diagnosis in a DENV-4 Epidemic	35
5	MANUSCRITO 2 - Interobserver agreement of signs and symptoms during a dengue epidemic in Rio de Janeiro	45
6	MANUSCRITO 3 - Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat	61

	dissociation in acute Dengue-4	
7	CONCLUSÕES	73
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
9	REFERÊNCIAS	78
10	ANEXOS	84
10.1	Parecer de aprovação CEP/INI	85
10.2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	87
10.3	Questionário de Síndrome Febril Aguda	89
10.4	Manual de preenchimento do Questionário de Síndrome Febril Aguda	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

O dengue é considerado a principal arbovirose no mundo em termos de morbidade, mortalidade, impacto econômico e disseminação. Estima-se que ocorram 390 milhões de infecções/ano sendo 96 milhões de casos sintomáticos. Aproximadamente 40% da população mundial está em risco para o dengue [Bhatt, 2013].

O dengue impõe demandas significativas ao sistema de saúde. Apesar de dengue grave ocorrer em apenas uma pequena proporção de infectados, a identificação precoce de pacientes de alto risco é difícil e pacientes com infecções não complicadas são frequentemente internados para observação. Sistemas rápidos e efetivos de triagem por equipe experiente na atenção primária, referência e contra referência para reavaliação diária eficiente, campanhas de mobilização e educação públicas alertando os sinais de alarme ajudariam a manter o sistema menos sobrecarregado.

Uma vez que alguns doentes podem progredir das apresentações brandas até as mais graves em um curto intervalo de tempo, o diagnóstico precoce do dengue é fundamental para estabelecer medidas de monitoramento clínico-laboratorial dos pacientes [Hang, 2009].

A capacidade de um teste em discriminar portadores de não portadores de uma determinada condição de interesse é denominada acurácia. A acurácia diagnóstica de sinais e sintomas clínicos pode ser avaliada com o mesmo instrumental metodológico empregado nas avaliações de testes diagnósticos em geral (laboratoriais, radiológicos, por exemplo). Uma questão crítica na avaliação clínica, que tem reflexos em sua acurácia, é a reprodutibilidade dos resultados, particularmente a concordância entre diferentes examinadores quanto aos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes [Streiner e Norman, 2006].

Assim, os instrumentos diagnósticos outorgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) baseados exclusivamente nos sintomas clínicos têm baixa acurácia, mas a confirmação laboratorial precoce também não é uma realidade na

prática clínica, seja por questões de custo, seja por limitações intrínsecas aos testes [Chaterji, 2011].

A perspectiva próxima da introdução de uma vacina contra o dengue parece promissora, porém até que a mesma seja amplamente empregada nas áreas e populações suscetíveis muitos ainda adoecerão.

Neste contexto, ferramentas diagnósticas baseadas em dados clínicos e laboratoriais simples e testes diagnósticos de baixo custo que apresentem alta acurácia nos primeiros dias de doença podem auxiliar a selecionar os pacientes que necessitam ser monitorados, melhorando a eficiência do sistema de saúde na atenção ao dengue.

Com o objetivo de contribuir para o diagnóstico precoce e acurado de dengue, são apresentados neste trabalho os resultados de três estudos relacionados à acurácia de sinais clínicos e laboratoriais para o diagnóstico do dengue.

A seguir, são apresentados alguns aspectos sobre o dengue, a vigilância epidemiológica da doença, características da unidade de saúde onde o estudo foi realizado e a avaliação de testes diagnósticos.

1.1.1. Histórico

Através de análises filogenéticas é possível supor que o vírus do dengue surgiu há cerca de 1000 a 2000 anos entre macacos asiáticos ou africanos [Holmes, 2003].

Desde os primeiros relatos históricos, a descrição de uma ampla gama de sintomatologias e curso da doença torna difícil a correta identificação do agente etiológico. É possível que outros vírus, causadores de síndromes febris agudas com sintomatologia e transmissibilidade semelhantes, como chikungunya e febre amarela tenham sido os verdadeiros causadores das diversas síndromes clínicas descritas no período que antecede o primeiro isolamento do vírus do dengue [Kuno, 2009].

Em 1780, na Filadélfia usa-se o termo “febre de quebra ossos”, sendo a primeira vez em que se descreve uma doença com sintomatologia bifásica e já é

possível suspeitar do envolvimento da circulação de pessoas doentes vindas de regiões caribenhas [Rush, 1951]. A primeira descrição completa na literatura moderna de uma doença clinicamente compatível com dengue ocorreu em 1801 através de cartas da rainha da Espanha a um militar de sua confiança. Nelas, há a descrição de uma doença febril, novamente denominada de “febre de quebra ossos”, surgida após um período chuvoso, autolimitada, associada à mialgia, artralgia, alterações de paladar, fenômenos hemorrágicos e icterícia [Rigau-Pérez, 1998].

Oriundas de corruptelas da língua dos escravos negros trazidos do oeste da África para o Caribe na epidemia de 1827 os termos “dengue” e “dandy disease” foram usados como sinônimos para uma mesma doença [Smart, 1877], [Rigau-Pérez, 1998]. Porém, as características da doença descrita em 1827 por Smart [Smart, 1877], com prostração associada à febre exantemática bifásica e sintomas mais graves no período pós-defervescência, levantam a dúvida sobre tratar-se verdadeiramente de dengue ou chikungunya [Kuno, 2009].

A definição de dengue pelo comitê da Real Academia Médica de Londres em 1869 foi a primeira tentativa de padronizar a caracterização clínica do dengue [Kuno, 2009].

Entre 1845 e 1873 ocorreram relatos esporádicos de casos de dengue nas Américas [Brathwaite Dick, 2012]. Os primeiros relatos de epidemias ocorreram em ilhas do Oceano Índico em 1827, chegando à Índia na epidemia de 1871 a 1874 [Smart, 1877]. Nestas localidades os surtos ocorriam nos verões, ocasionalmente associados à febre amarela. Iniciavam-se na região portuária através dos reservatórios de água das embarcações disseminando-se depois para outras nações como Singapura e China.

Ao final do século XIX já havia descrições da doença em todo o continente americano à exceção apenas do Canadá [Brathwaite Dick, 2012]. Historicamente, as epidemias de dengue passam a atingir padrões pandêmicos e a se disseminar rapidamente, podendo ter dimensões transcontinentais pelo Novo e Velho Mundo como ocorreu em 1779 a 1784, 1823 a 1829, 1844 a 1856 e 1870 a 1875 [Kuno, 2009].

Nos primeiros 25 anos do século XX, as epidemias estavam restritas às regiões tropicais e não mereciam posição de destaque no meio científico, porém, em torno dos anos 1920 uma epidemia no sul dos Estados Unidos fez com que o exército norte-americano incluísse o dengue nos estudos do Comitê de Virologia e Epidemiologia [Kuno, 2009], [Sabin, 1950].

Após a Segunda Guerra Mundial, epidemias passaram a ocorrer de forma mais disseminada devido ao aumento da circulação dos indivíduos, desequilíbrio ecológico e trânsito de equipamentos. Tanto o dengue quanto a malária passaram a acometer primariamente os países asiáticos chegando no Japão em 1945 [Messina, 2014], [Gibbons, 2012].

Apesar de catastrófica para a humanidade, a Segunda Grande Guerra representou grandes avanços na pesquisa do vírus do dengue. Albert Sabin, médico polonês radicado em Nova Iorque, Estados Unidos, conhecido pelos estudos em poliomielite desde 1931, alistou-se em 1941, passando a fazer parte do Comitê de Virologia e Epidemiologia do Exército Norte-americano. Trabalhando na Europa, África, Oriente Médio e Pacífico, a equipe do Dr. Sabin, em colaboração com pesquisadores japoneses identificou os dois primeiros sorotipos do dengue (DENV 1 e 2) em 1943 e 1945, bem como estabeleceu a duração da imunidade pós-doença, a correlação com outras doenças como a febre amarela e noções iniciais de fisiopatogenia viral [Sabin 1950], [Messina, 2014]. Mais tarde, na década de 1950 os outros dois sorotipos (DENV-3 e DENV-4) foram identificados [Messina, 2014].

1.1.2. O vetor

Segundo Wang *et al.* o vírus do dengue (DENV) pode ser transmitido a partir de dois ciclos distintos: 1) epidêmico e endêmico envolvendo hospedeiros humanos e transmissão pelo *Aedes aegypti*, com o *Aedes albopictus* e outros mosquitos do gênero *Aedes* como vetores secundários, e 2) ciclo zoonótico ou silvático em ambientes com densa cobertura florestal na África e Malásia

envolvendo hospedeiros primatas não humanos e vários tipos diferentes de *Aedes* [Wang, 2000].

O *Aedes aegypti* é o vetor mais importante na transmissão urbana e o *Aedes albopictus*, vetor secundário, tem ganhado importância epidemiológica nos últimos anos causando epidemias em regiões de clima mais temperado [WHO, 2009], [Fredericks, 2014]. Outros *Aedes* são geralmente mais suscetíveis a infecções experimentais [Wang, 2000].

Embora mundialmente isolado nas áreas tropicais e subtropicais, o habitat preferencial do *Aedes aegypti* é entre as latitudes 35° norte e 35° sul. A altitude também é um fator limitante da distribuição do mosquito, normalmente encontrado até 1000 metros acima do nível do mar [WHO, 1997].

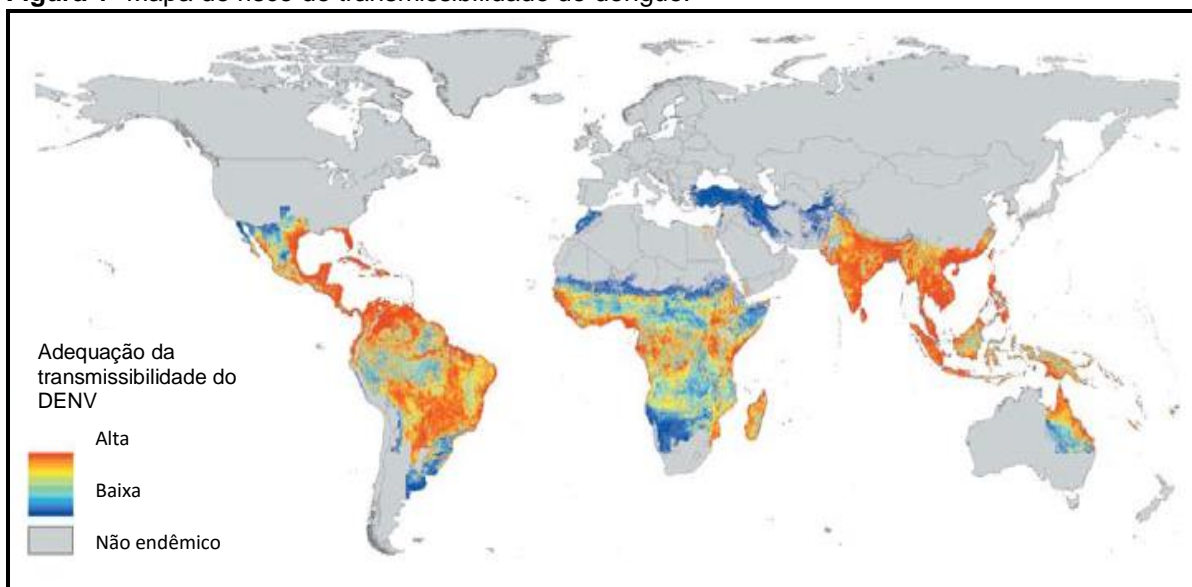
Altamente adaptado à vida urbana, o vetor tem hábitos alimentares diurnos; alcance de voo limitado, cerca de 500 metros; e reproduz-se em água parada [WHO, 1997], [Fredericks, 2014]. Alimenta-se de múltiplos indivíduos em um curto intervalo de tempo. É capaz de transmitir a doença a outro indivíduo suscetível cerca de quatro a 10 dias após picar um doente permanecendo com esta capacidade durante toda a vida [Fredericks, 2014].

A primeira iniciativa para eliminar o *Aedes aegypti* ocorreu em 1901 em Havana [Brathwaite Dick 2012]. No Brasil, em 1903, Oswaldo Cruz em colaboração com a Fundação Rockefeller, iniciou uma campanha para erradicação do *Aedes aegypti*, vetor tanto da febre amarela quanto do dengue [Lourenço-de-Oliveira, 2008]. A técnica se baseava na fumigação dos ambientes e eliminação dos criadouros através da retirada dos vasilhames vazios [Brathwaite Dick 2012]. As medidas empregadas foram bem sucedidas e, em 1920, houve controle da febre amarela no Rio de Janeiro com erradicação do vetor em todo o território nacional em 1955 [Lourenço-de-Oliveira, 2008].

O sucesso brasileiro estimulou a Organização Panamericana de Saúde a elaborar em 1947, um plano de erradicação continental do *Aedes aegypti* [Brathwaite Dick 2012]. Em 1972 o vetor foi considerado erradicado em 23 países. No entanto, devido a questões multifatoriais como: avanço da urbanização a partir da década de 1970; aumento do tráfico aéreo internacional; eliminação do sistema de vigilância; resistência do mosquito ao inseticida; falta de envolvimento

comunitário para eliminar os criadouros; e, instabilidade política, o vetor foi reintroduzido nas áreas tratadas, atingindo em 1995 níveis de infestação semelhantes ao período pré-erradicação (figura 1) [Gubler, 2011], [Brathwaite Dick 2012], [Simmons, 2012], [Fredericks, 2014].

Figura 1- Mapa de risco de transmissibilidade do dengue.



Adaptado de Simmons, *et al.* [Simmons, 2012]

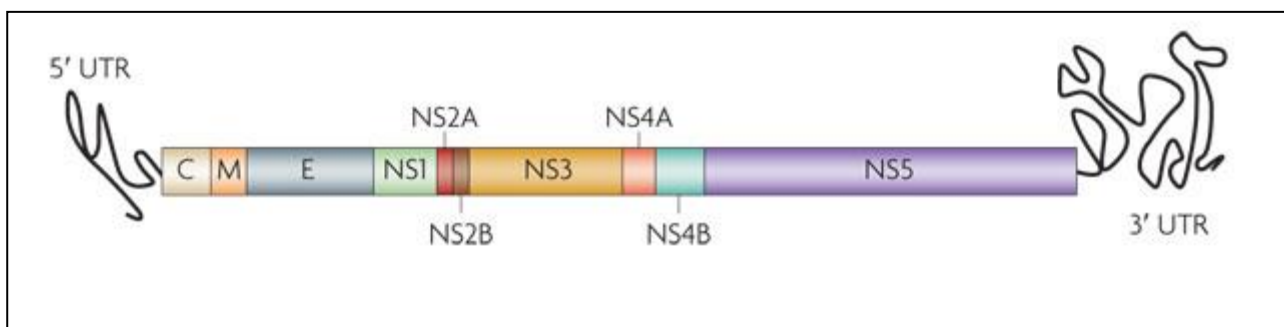
A proliferação e o desenvolvimento do *Aedes aegypti* estão associadas a diversos condicionantes, tais como: mudanças globais, alterações climáticas, variabilidade do clima, uso da terra, armazenamento de água e irrigação, falhas no controle efetivo do vetor com trânsito do mesmo entre regiões, aglomerações urbanas, e, a má qualidade da infraestrutura de saúde [Viana, 2013], [Tatem, 2006]. Além disso, o comércio internacional de pneus usados contribui para a disseminação de vetores, especialmente o *Aedes albopictus*, para áreas previamente livres de mosquito [Reiter, 1998].

1.1.3. Vírus do dengue

O DENV pertence ao gênero Flavivirus, o qual inclui também o Zika vírus, o vírus do Oeste do Nilo, da febre amarela e da encefalite japonesa, entre outros [Fredericks, 2014].

O vírion do dengue é esférico, mede cerca de 50 nm de diâmetro, contém uma dupla camada lipídica derivada do hospedeiro e uma fita única de ácido ribonucleico (RNA) com cerca de 11.000 bases que codificam três proteínas estruturais (PrM, C e E), sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e duas regiões não transcritas 3'UTR e 5'UTR [WHO, 2009], [Guzman, 2010], figura 2.

Figura 2- Genoma do dengue vírus [Guzman, 2010].



Especificamente a proteína NS1 é uma glicoproteína altamente preservada nos vírus 1 a 3 sendo essencial para a replicação e viabilidade do vírus, no dengue 4 há uma alteração na cisteína o que a torna discretamente diferente [Lima, 2014]. É expressa na superfície da célula infectada, produz uma resposta humoral intensa e é um antígeno fixador de complemento [Idrees, 2012], [Lima, 2014]. O NS1 pode ser identificado desde o primeiro até o nono dia após a infecção com picos variando de acordo com o tipo de infecção se primária ou secundária, mesmo quando o RNA viral não é identificado através da reação de transcriptase reversa seguida da reação pela cadeia de polimerase (RT-PCR) [Idrees, 2012], [Lima, 2014].

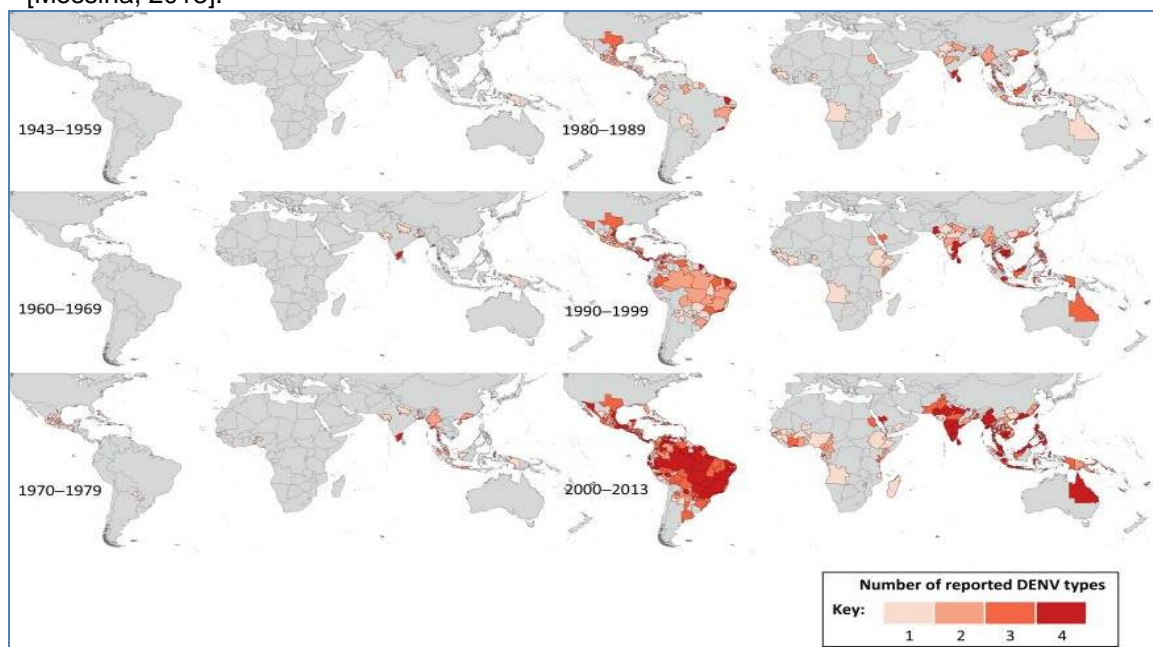
São reconhecidos quatro sorotipos de DENV. Suas características influenciam a natureza da epidemia: extensão, espectros clínicos e faixas etárias mais acometidas. Em cada sorotipo há múltiplos genótipos com sequências filogenéticas distintas e características específicas do sítio geográfico em que se desenvolvem [Simmons, 2012].

1.1.4. Epidemiologia

O padrão epidemiológico do dengue tem se modificado. O intervalo entre as primeiras pandemias (1897-1902 e 1926-1931) foi de aproximadamente 24 anos. A terceira pandemia (1940-1944) ocorreu nove anos após a segunda. A frequência de pandemias aumentou consideravelmente depois da Segunda Guerra [Kuno 2009]. Em 1998, todos os quatro sorotipos foram identificados em diversas partes do mundo [WHO, 2012].

Desde 2011 é possível identificar dengue em todos os continentes não polares, com situações de hiperendemicidade nas áreas tropicais, notadamente na Ásia e Américas, com picos epidêmicos a cada três a cinco anos, figura 3 [WHO, 1997], [WHO, 2009], [Messina, 2014], [Simmons, 2012], [Gubler, 1998], [Schatzmayr, 2000].

Figura 3- Mapa de co-circulação do DENV, distribuição da incidência dos sorotipos desde 1943 [Messina, 2013].



Antes de 2013, estimava-se que a incidência anual de dengue no mundo era de 50-100 milhões de casos, dos quais 250.000-500.000 seriam de dengue grave [Gubler, 2002]. No entanto, em 2013 Bhatt *et al.* [Bhatt, 2013], usando uma metodologia complexa baseada em georreferenciamento através de pesquisa

sistemática da literatura, estimaram que ocorrem anualmente cerca de 390 milhões (quatro a nove vezes a estimativa original) de infecções por dengue sendo que 96 milhões (25%) apresentam alguma sintomatologia aparente [Bhatt, 2013].

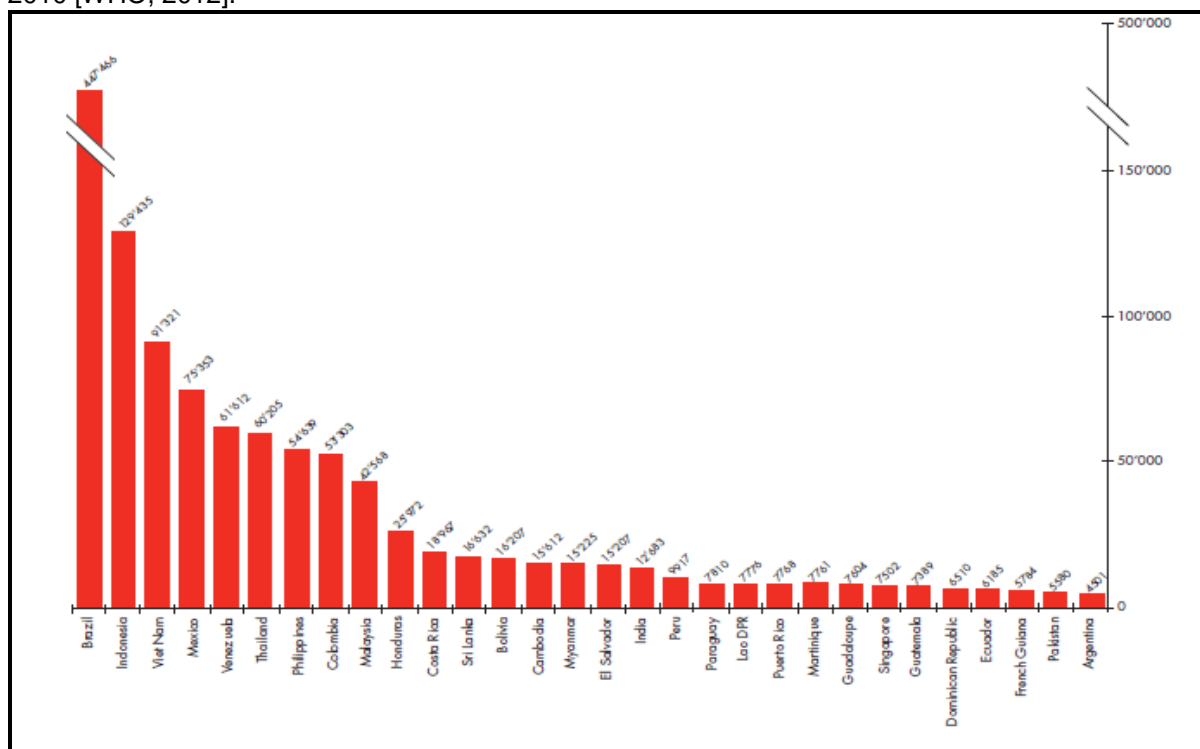
Segundo os autores, dos possíveis 96 milhões de casos de 2010, 70% (67 milhões de infecções) ocorreram nas regiões densamente populosas da Ásia, notadamente na Índia. As Américas aparecem em seguida, com 14% (13 milhões) dos casos, dos quais a metade teria ocorrido no Brasil e México [Bhatt, 2013].

Apesar de haver poucos relatos de epidemia na África, sabe-se que há subnotificação de casos em todo o continente [Holmes, 2003]. As informações deste continente advêm geralmente de estudos de soroprevalência, notadamente na África subsaariana, ou do diagnóstico feito em viajantes oriundos da região [WHO, 2009]. Sabe-se, no entanto, que o dengue circula na região pelo menos desde 1926, quando houve uma grande epidemia na África do Sul [WHO, 2009], e que o continente conta com a circulação expressiva dos quatro sorotipos desde 1980 [WHO, 2009]. Segundo Bhatt *et al.*, cerca de 16% (15 milhões) dos casos de dengue do mundo em 2010 teriam ocorrido na África [Bhatt, 2013].

De 2001 a 2007, 30 países concentraram mais de quatro milhões de casos notificados de dengue. Além de o número de casos continuar aumentando, o dengue tem se disseminado para novas áreas em forma de epidemias importantes. O risco agora se estende para a Europa uma vez que foi identificado pela primeira vez na França e Croácia em 2010 e há relatos de casos importados em outros onze países. Em 2013 surgiram casos na Florida, Estados Unidos e o Japão relatou casos em 2014 depois de mais de 70 anos. O ano de 2015 foi marcado por grandes epidemias de dengue pelo mundo [WHO, 2016].

Mais da metade desses países estão localizados nas Américas (figura 4). Todos os quatro sorotipos circulam na região e em alguns países de forma concomitante como Colômbia, República Dominicana, México e Venezuela [WHO, 2009]. De outro modo, os únicos países da América Latina onde não há relatos de transmissão autóctone são Uruguai e Chile continental [San Martin, 2010].

Figura 4- Número médio de casos de dengue nos 30 países que mais notificaram à OMS, 2004-2010 [WHO, 2012].



No Brasil, o pico das notificações se concentra particularmente no primeiro semestre de cada ano, período este considerado o mais úmido e quente. Nos meses em que a temperatura decresce, na segunda metade do ano, observa-se que a incidência sofre redução, demonstrando dependência da variação sazonal sobre a dinâmica do vetor e da doença [Viana, 2013], [San Martin, 2010]. Circulam no país todos os quatro sorotipos do vírus.

Apesar de ter sido identificado pela primeira vez em 1981, quando foram isolados os DENV-1 e DENV-4 em uma epidemia em Roraima, foi apenas em 1986, com a chegada do DENV-1 ao Rio de Janeiro, que o dengue ganhou relevância nacional a nível de saúde pública [Teixeira, 2009] com cerca de 60.000 casos notificados. No entanto, segundo estimativas sorológicas, mais de um milhão de pessoas foram infectadas. Esta diferença entre o número de casos estimado e o notificado, o que configura subnotificação, ocorreu devido à ausência de um sistema de notificação estruturado para o agravo [Figueiredo, 1991]. A força de disseminação do vírus foi tão intensa que no ano seguinte, 1987, já havia mais de um milhão de casos de dengue no Rio de Janeiro e relatos de casos em várias capitais nordestinas [Teixeira, 2009].

Em 1994 mais de 600 municípios brasileiros e 18 estados já apresentavam casos de dengue chegando a 346 casos/100.000 habitantes em 1998, o mesmo ano em que o dengue teve disseminação mundial maciça [Teixeira, 2009]. A marca de 50% dos municípios brasileiros afetados ocorreu em 1999 com o vetor sendo encontrado em 64% destes [Teixeira, 2009].

No período entre 2000 e 2007 já haviam mais de três milhões de casos respondendo por cerca de 60% dos casos de dengue nas Américas [San Martin, 2010]. Em 2007, 72% dos municípios do país já estavam infestados pelos *Aedes aegypti* [Teixeira, 2009].

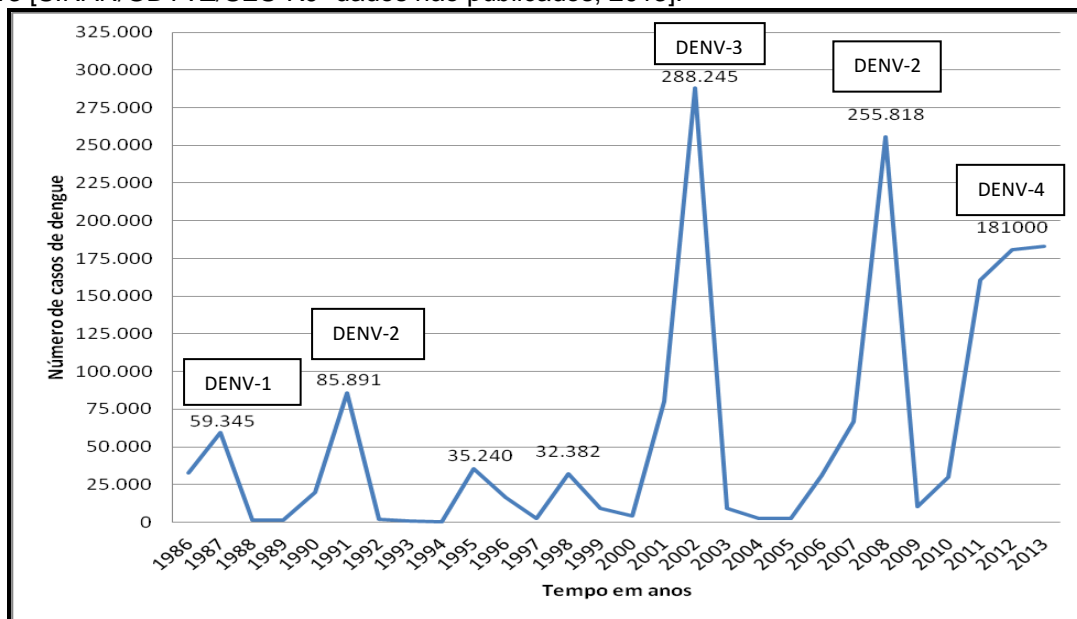
Em 2010, o Brasil notificou quase o dobro do número de casos do ano anterior, sendo cerca de 18.000 casos de dengue com complicações e 650 óbitos em um total de mais de 1,2 milhão de casos de dengue [Brathwaite Dick, 2012]. Neste ano, a epidemia apresentou uma característica peculiar que foi a circulação ativa do DENV-4, em 2008 foi reintroduzido no país [Temporão, 2011]

O DENV-4, foi isolado em Roraima em julho de 2010 após cerca de 26 anos sem circular no país, disseminou-se simultaneamente para estados do Nordeste e Sudeste. Em março de 2011, já era encontrado nos Estados do Piauí, Pernambuco, Bahia, Ceará, Rio de Janeiro e São Paulo [Nogueira, 2011], [Figueiredo, 2008], [San Martin, 2010].

Os sorotipos 2 e 3 foram identificados no Rio de Janeiro respectivamente nos anos de 1990 e 2000 [Nogueira, 1993], [Nogueira, 2005].

Quando se analisam os casos de dengue notificados no Estado do Rio de Janeiro, encontra-se uma oscilação importante da curva epidemiológica da doença ao longo dos anos (dados não publicados pela Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses de Secretaria Estadual de Saúde-GDTVZ/SES-RJ), figura 5. Observam-se quatro picos de incidência ao longo do período, que estão correlacionados à introdução de cada um dos quatro sorotipos virais e à suscetibilidade da população.

Figura 5- Curva epidemiológica de casos notificados por dengue no Rio de Janeiro de 1986 até 2013 [SINAN/GDTVZ/SES-RJ- dados não publicados, 2013].



Em 1990, com a introdução do sorotipo 2, o Estado do Rio de Janeiro experimentou sua segunda grande epidemia, sendo notificados nos anos de 1990 e 1991, 105.576 casos de dengue, 1306 casos de febre hemorrágica do dengue e 39 óbitos. Houve, nesta epidemia a identificação do DENV-1 no primeiro semestre 1990 e DENV-2 no segundo semestre de 1990 e início de 1991 [Nogueira, 1993]. A morbimortalidade associada a esta epidemia decorreu possivelmente da substituição do genótipo DENV-2 americano pelo genótipo asiático de características mais virulentas [Messina, 2014].

Em 2002, a introdução do DENV-3 foi responsável pela maior epidemia que o Estado conheceu, com cerca de 290 mil casos notificados e letalidade de 3,15% [Nogueira, 2005], [Toledo, 2006].

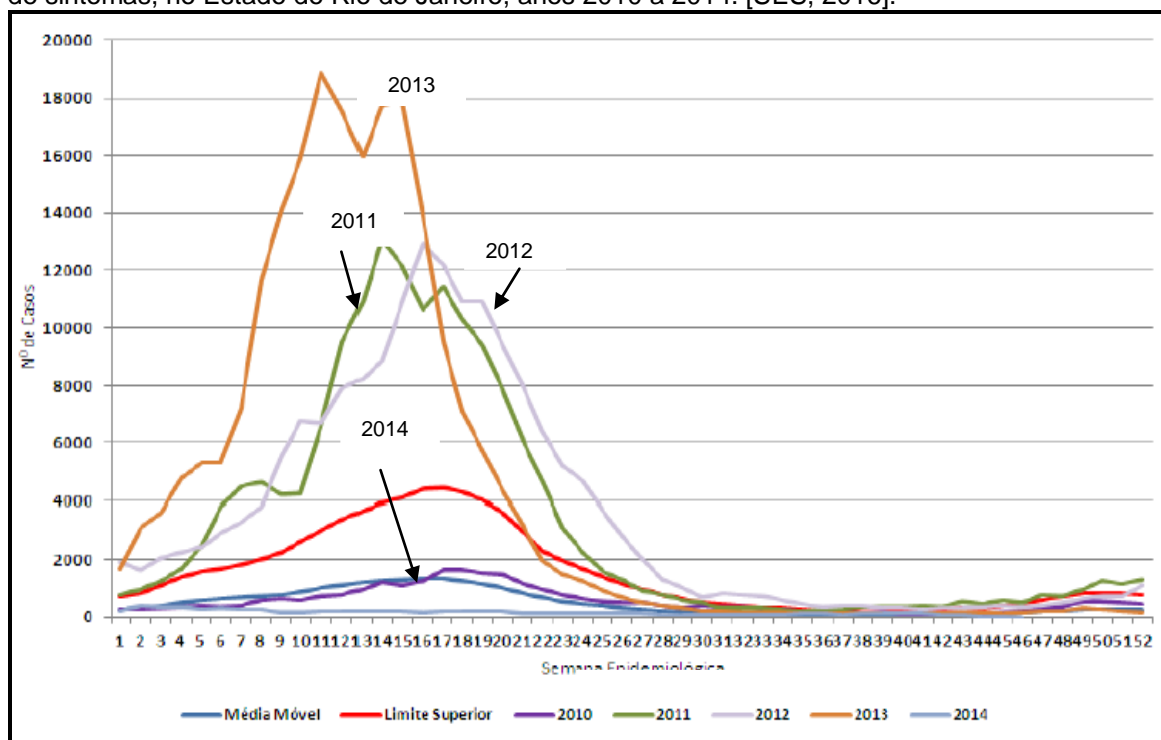
Em 2007 e 2008, com a re-introdução do DENV-2, houve nova epidemia de dengue ainda mais grave com índice de letalidade de 9,4/10.000, maior comprometimento da população pediátrica, mais de 9.000 internações hospitalares e 230 óbitos entre janeiro e abril de 2008 [Honorio, 2009], [Giraldo, 2011], [WHO, 2012]. Esta grave situação de saúde pública causou uma resposta dos órgãos não governamentais e governamentais com mobilização das forças armadas para apoio aos cuidados dos pacientes e combate aos criadouros de mosquito [WHO, 2012].

Em 2011, o Estado experimenta uma nova epidemia, agora com predomínio do sorotipo 1, mais dispersa pelo Rio de Janeiro (46% na capital) com quase 170 mil casos notificados. Neste ano e no seguinte as curvas de casos foram bastante semelhantes e tiveram o pico em torno da décima quinta semana epidemiológica (figura 6).

Os anos seguintes, de 2012 a 2014 tiveram a predominância do sorotipo 4 reintroduzido no Rio de Janeiro em 2011, que apesar de ter alcançado picos epidêmicos relevantes de 2012 e 2013, causaram poucos óbitos. Os casos de 2012 se concentraram no município do Rio de Janeiro representando 70% dos aproximadamente 180 mil casos e 37 óbitos notificados [SES, 2014].

No ano de 2014, houve redução da incidência para níveis endêmicos, possivelmente devido à redução do número de suscetíveis ao DENV-4 após três anos de elevadas incidências. Neste ano, apenas nove óbitos foram notificados em todo o Estado [SES, 2016].

Figura 6- Diagrama de controle do dengue, casos notificados por semana epidemiológica de início de sintomas, no Estado do Rio de Janeiro, anos 2010 a 2014. [SES, 2016].



Onde Y se refere ao número de casos e X a semana epidemiológica. Fonte: SINAN/GDTVZ/SES-RJ, dados atualizados em 13 de outubro de 2015 e sujeitos à revisão.

1.1.5. Caracterização clínica do dengue

A maioria das infecções pelo DENV são assintomáticas e, portanto, difíceis de identificar. Quando sintomático, o quadro clínico geralmente é autolimitado com amplo espectro de sintomatologia, variando de letargia, febre, exantema, acometimento orgânico e eventualmente hemorragia pelo aumento da permeabilidade vascular [Honorio, 2009], [Fredericks, 2014].

Não se sabe ao certo os motivos exatos pelos quais alguns pacientes evoluem para a forma grave na fase de defervescência. O sorotipo e o genótipo do DENV parecem ser determinantes principalmente quando associados à imunossupressão, interação vírus-hospedeiro, viremia prolongada, carga viral e altos títulos de antígeno NS1. Grupos populacionais específicos também apresentam maiores chances de evoluir com formas mais graves: sexo feminino, raça branca, idade inferior a quinze anos e portadores de doenças crônicas [Gubler, 1998], [Halstead, 2006], [Fox, 2011].

De uma forma geral, após um período de incubação de três a sete dias, os sintomas surgem de forma súbita podendo ser estratificada em três fases: fase febril inicial; fase crítica caracterizada pela defervescência do quadro febril, e; o período de recuperação espontânea [Simmons, 2012].

Durante a fase febril surgem os principais sinais e sintomas sugestivos de dengue como febre alta, cefaleia, vômitos, mialgia, dores articulares e exantema macular transitório e esporádico. Podem ocorrer fenômenos hemorrágicos leves como petéquias e equimoses notadamente nos sítios de punção venosa. A hepatomegalia nesta fase é comum. No aspecto laboratorial inespecífico ocorre trombocitopenia leve a moderada e leucopenia geralmente com aumento moderado do hepatograma. Esta fase febril dura geralmente três a sete dias após os quais a maioria dos doentes se recupera sem complicações [Simmons, 2012] sendo considerado dengue clássico ou dengue sem complicações.

Quando a febre desaparece, uma pequena proporção de pacientes, notadamente crianças e adultos jovens evolui para a fase crítica do dengue caracterizada pela síndrome do extravasamento plasmático [Simmons, 2012] que

pode causar choque (síndrome do choque do dengue), anasarca, insuficiência respiratória, hemorragia, comprometimento multissistêmico grave e até mesmo óbito [Fredericks, 2014].

Na fase inicial a hipovolemia manifesta-se por hipotensão postural com vasoconstrição periférica, que caso não seja prontamente revertida, evolui para a síndrome do choque do dengue. Nesta fase, em torno do quarto a sétimo dia de doença, surgem os sinais de alarme com extravasamento plasmático por aumento da permeabilidade vascular manifestado por: dor abdominal importante, hepatomegalia dolorosa, hemoconcentração com queda abrupta da contagem das plaquetas, derrame seroso, sangramento mucoso e letargia ou irritabilidade [Simmons, 2012].

Na fase de convalescença, revertem-se os fenômenos de extravasamento vascular e, pode surgir um segundo exantema maculopapular altamente pruriginoso que evolui com descamação após uma a duas semanas. Os adultos podem evoluir com fadiga severa durante várias semanas após a convalescença [Simmons, 2012].

Apresentada desta maneira, a caracterização clínica do dengue parece simples, com oportuna tomada de decisões na fase de defervescência. No entanto, as características epidemiológicas da evolução clínica do dengue diferem por região.

A OMS desde a década de 1970 vem tentando promover estratégias para o diagnóstico, tratamento e prevenção do dengue. Estes esforços renderam o guia de 1986, os manuais regionalizados de 1993 (Ásia), 1994 (Américas) e 1995 (Pacífico) [WHO, 1997].

Em 1997, houve uma atualização do manual de 1986 e uma consolidação das informações regionalizadas. Neste documento, a OMS estabeleceu as seguintes nomenclaturas: *febre do dengue (FD)*: os casos de doença febril aguda associada à cefaleia, mialgia, artralgia, exantema e leucopenia; *febre hemorrágica do dengue (FHD)*: indivíduos com febre alta, fenômenos hemorrágicos geralmente associados à hepatomegalia; *síndrome do choque do dengue (SCD)*: aqueles com FHD que evoluem com choque hipovolêmico decorrente de extravasamento plasmático; e, havia ainda um quarto grupo, o de FD com sangramento anormal

sem ser efetivamente FHD [WHO, 1997]. Além disto, o documento discriminava também aquele doente com febre hemorrágica do dengue (FHD) em graus de 1 a 4.

Além de complexa esta classificação gerou críticas por não ser útil para o manejo clínico, só sendo passível de confirmação de forma retrospectiva ao final da doença. Muitos casos graves, não apresentavam sinais de choque circulatório e, portanto, não preenchiam os critérios para classificação como FHD, principalmente em adultos [Balmaseda, 2005], [Low, 2006], [Marzochi, 1991].

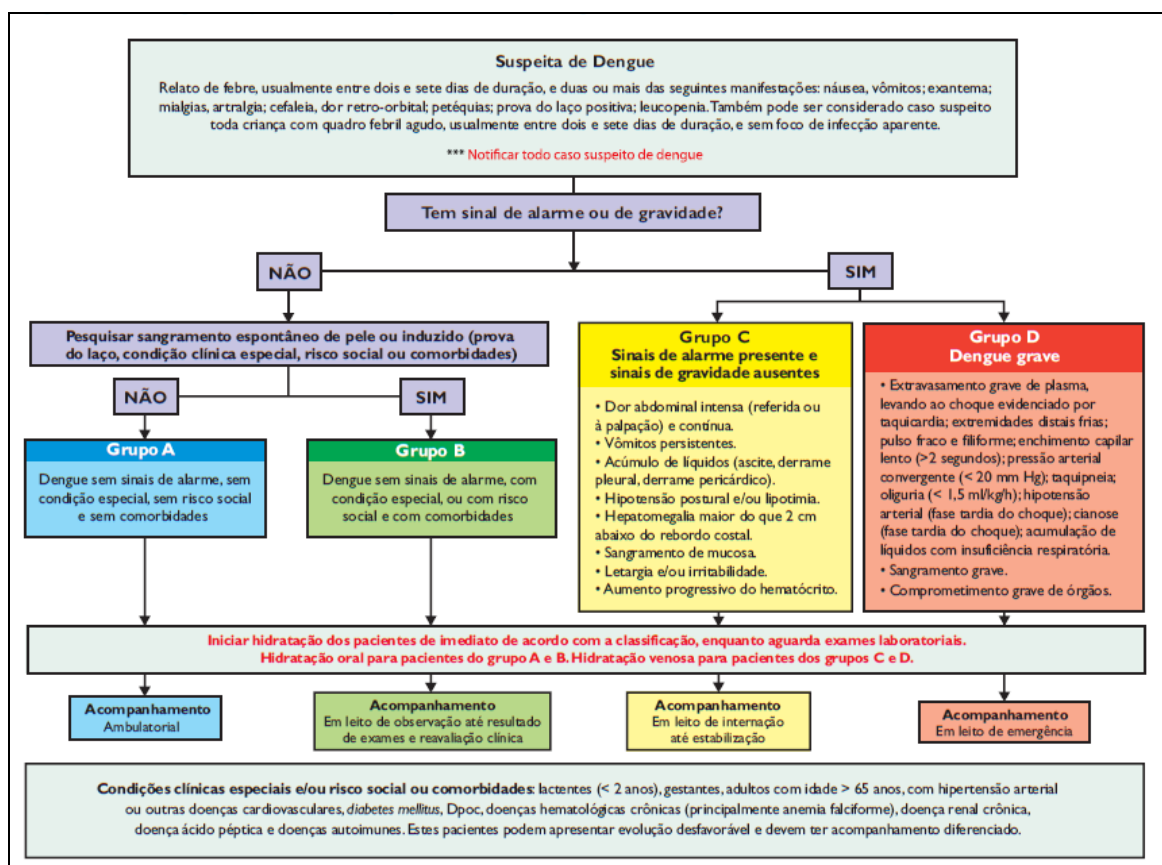
Em 2009 a definição de caso suspeito de dengue passou a ser febre associada a dois ou mais dos seguintes sintomas: náusea/vômito, exantema, dores, prova do laço positiva e leucopenia [WHO, 2009].

No entanto, apesar de ter sido ajustado, permanecem críticas aos critérios diagnósticos do dengue. Low *et al.* em um estudo longitudinal multicêntrico detectaram que os sintomas associados à doença foram menos frequentemente encontrados nos indivíduos idosos. Além disso, sintomas classicamente descritos como associados ao dengue tais como dor retro orbitária e exantema podem ser mais tardios, o que dificultaria o diagnóstico precoce [Low, 2011].

Pelos motivos expostos, o Brasil adota, desde 2002, o protocolo de condutas que valoriza a abordagem clínico-evolutiva, baseado no reconhecimento de elementos clínico-laboratoriais e de condições associadas, que possam ser indicativos de gravidade, com sistematização da assistência, que independe da discussão de classificação final de caso, para orientar a conduta terapêutica adequada a cada situação e evitar o óbito.

Continuamente atualizado, o “Fluxograma de Classificação de Risco e Manejo do Paciente com Dengue” de 2016, estratifica o paciente suspeito de dengue de acordo com os critérios clínicos da OMS de 1997 de acordo com a presença de comorbidades, sinais de alarme e/ou sinais de choque orientando a terapêutica e a necessidade de internação hospitalar, (figura 7) [WHO, 1997], [Brasil, 2011].

Figura 7- Fluxograma para classificação e manejo do dengue [Brasil, 2016].



Apesar da disponibilização desta ferramenta para orientar a condução de casos desde 2002, em 2008 a letalidade pelo dengue ainda permaneceu em níveis elevados no nordeste brasileiro, provavelmente devido à má adesão ao protocolo de estadiamento e manejo proposto pelo Ministério da Saúde [Figueiro, 2011].

Nos últimos anos tem sido avaliados preditores clínicos até o quarto dia de doença bem como a utilização de estatística multivariada para combinação de variáveis de pacientes ambulatoriais.

Em um cenário em que não foi encontrado DENV-4, Low *et al.* realizaram um estudo para diferenciar precocemente dengue, influenza e outras doenças febris agudas. Foram, arrolados ao longo de cinco anos, 2.129 pacientes sendo 250 com dengue, 228 com influenza e os demais com febre devido a outras etiologias. Identificaram artralgia, inapetência, alteração do paladar, náusea, vômito, exantema e sensibilidade cutânea como sintomas mais frequentemente

encontrados nos pacientes com dengue comparados aos demais doentes do estudo, assim como valores mais baixos de leucócitos, linfócitos e plaquetas. Este estudo revelou ainda que ao estratificar os sintomas de acordo com a faixa etária, a frequência dos sintomas associados ao dengue diminui com o avanço da idade, o que dificulta a aplicabilidade dos critérios da OMS para todas as faixas etárias adultas [Low, 2011].

Ainda segundo o referido estudo, o único teste laboratorial útil nos casos de suspeição de dengue nos idosos seria a leucometria, uma vez que nesta faixa populacional, a leucopenia (<4.500 céls/mm³) tem maior significância estatística comparada aos outros valores hematimétricos [Low, 2011].

Acredita-se que haja duas maneiras de diminuir a gravidade da doença: monitoramento constante de todos os pacientes suspeitos, cujo custo operacional é alto; ou diagnosticar dengue de forma acurada para determinar o grau de risco para a evolução desfavorável.

Assim sendo, a identificação precoce dos casos de dengue é de vital importância para a tomada de decisões e implantação de medidas de maneira oportuna.

1.1.6. Outros instrumentos para diagnóstico clínico

Na maioria dos países onde o dengue é endêmico, incluindo o Brasil, o acesso às técnicas laboratoriais para o diagnóstico é limitado, assim, o diagnóstico presuntivo da doença é baseado em critérios clínicos, algoritmos e escores [Brasil, 2011].

Díaz e colaboradores em um estudo de coorte na Colômbia avaliando 251 adultos atendidos em regime ambulatorial onde a metade apresentava dengue com confirmação laboratorial, formulou um escore clínico. O ponto de corte foi definido quando os valores obtidos fossem igual a nove ou 10 pontos avaliando: prova do laço positiva, exantema, ausência de secreção nasal, artralgia e ausência de diarreia (1 ponto cada), leucometria <4000 /mm³ (3 pontos) e plaquetas $<180,000$ /mm³ (2 pontos). A especificidade e o valor preditivo positivo

obtidos foram de 100%, com área sob a curva ROC de 81%, melhor que os 70% obtidos pelos critérios da OMS ($p < 0,001$) [Diaz, 2006].

Em um estudo caso-controle retrospectivo em 412 pacientes ambulatoriais na Guiana Francesa, Epelboin e colaboradores propuseram um escore clínico para a diferenciação etiológica de síndromes febris agudas em regiões onde coexistem casos de malária e dengue. De todos os parâmetros analisados: proteína C reativa ≥ 5 , sexo masculino, idade < 15 anos, taquicardia, anemia ou trombocitopenia. O único parâmetro elegível para estudos de validação externa fora do território guianense foi a proteína C reativa ≥ 5 (sensibilidade 99% e especificidade de 35%) [Epelboin, 2013].

Outro instrumento usado para auxiliar o diagnóstico precoce do dengue foi a árvore de decisão, onde complexos modelos matemáticos são convertidos em regras condicionais do tipo “se-então” de fácil compreensão [Lee, 2009].

A primeira tentativa de se estabelecer uma árvore de decisão que determinasse a probabilidade de um paciente desenvolver a febre hemorrágica do dengue baseada em critérios clínicos e laboratoriais foi documentada no Manual da OMS em 1997 com sensibilidade de 98%, especificidade de 60% e valor preditivo negativo de $>99\%$ [WHO, 1997]. No entanto, esta árvore necessitava de computador e softwares apropriados indisponíveis em cenários assistenciais.

Em 2008, Tanner e colaboradores [Tanner, 2008] elaboraram uma árvore de decisão onde foram avaliados 1200 pacientes residentes em Singapura e Vietnã, entre eles pacientes com os diversos espectros clínicos do dengue (*FD*, *SCD* e *FHD*) e não-dengue. Os critérios que atingiram nível de significância ($p < 0,01$) foram plaquetas $< 196.000/\text{mm}^3$, leucopenia < 4900 céls/ mm^3 , linfopenia < 580 céls/ mm^3 , temperatura axilar $> 37,4^\circ\text{C}$ e hematócrito $\leq 41,2\%$. Este estudo obteve um erro estimado após validação cruzada de 15,7% e sensibilidade e especificidade de 71,2% e 90,3% para predição de doença. Quando o instrumento foi aplicado no período inter epidêmico os valores preditivo positivo e preditivo negativo foram 51,1% e 97,7% respectivamente.

A coleta de dados clínicos de forma sistemática e padronizada permite análises estatísticas, identificação de associações entre os achados clínicos, avaliar a etiologia e prognóstico. Neste sentido, algumas ferramentas de coleta de

dados foram desenvolvidas e avaliadas com o objetivo de auxiliar o diagnóstico de condições específicas com base principalmente na anamnese, critérios clínicos e exame físico. Exemplos de instrumentos desta natureza incluem questionários usados para avaliar determinadas artropatias em idosos [Peat, 2003] e a identificação da doença do refluxo gastroesofágico [Manterola, 2002].

Para exemplificar, na avaliação de um único sintoma, a formulação de hipóteses diagnósticas e/ou o seu descarte pode requerer informações relativas ao início, intensidade, duração, frequência, qualidade, contexto, localização, fatores de alívio e de piora [Takemura, 2007].

Na impossibilidade de contemplar todas as informações clínicas relevantes para cada paciente, a ficha clínica padronizada deve ser utilizada como um instrumento complementar à entrevista clínica aberta e ao registro habitual no prontuário médico. Nesse sentido, deve conter questões sobre achados que são mais prováveis de se encontrar na população-alvo, potencialmente discriminantes para o diagnóstico ou úteis para fins de vigilância.

A parcimônia no número de variáveis coletadas e no seu detalhamento é importante para garantir a adesão dos profissionais e evitar transtornos na rotina de atendimento. É importante ressaltar que a proposição da ficha clínica padronizada remete à necessidade de registro estruturado de dados clínicos para a implementação de vigilâncias sindrômicas e a realização de pesquisas relativas ao diagnóstico diferencial.

Recentemente no Brasil, Daumas e colaboradores [Daumas, 2011], propuseram um questionário semi-estruturado para a avaliação de sinais e sintomas de pacientes com síndrome febril aguda e avaliaram a concordância entre avaliados/observados na coleta destes dados. No questionário aplicado foram avaliados 43 sintomas e 32 sinais clínicos, além de várias informações epidemiológicas.

Concordâncias altas foram observadas para a maioria dos dados clínicos avaliados e a aferição da intensidade dos sintomas mostrou-se viável. Alguns sinais físicos foram raros e sua inclusão em um questionário estruturado pode não ser justificável neste contexto. A aplicação do questionário mostrou boa confiabilidade para os sinais e sintomas mais frequentes sugerindo fortemente ser

possível coletar sintomas clínicos de anamnese detalhados com alta confiabilidade através da utilização de um formulário padronizado e do treinamento dos profissionais para o seu preenchimento.

Daumas *et al.* destacaram finalmente a necessidade de avaliação do questionário na forma sumarizada em cenários assistenciais mais amplos como unidades de emergência e/ou atenção básica [Daumas, 2011].

1.1.7. Diagnóstico laboratorial do dengue

Com grande variabilidade clínica, a viremia decorrente da infecção pelo DENV pode ser inaparente, no entanto, a confirmação laboratorial da doença é essencial a fim de subsidiar a tomada de decisões, diferenciando o dengue de outras doenças febris agudas como zika, malária e chikungunya; direcionando o tratamento minimizando assim os riscos de elevada morbi/mortalidade [WHO, 2009]. A escolha do método laboratorial dependerá do objetivo para o qual está sendo empregado. Se para manejo clínico ou vigilância epidemiológica; do porte do laboratório onde será executado; da expertise de quem o realiza; além do momento da coleta do espécime clínico [WHO, 2009].

De uma forma inespecífica a infecção aguda pelo dengue gera alterações hematológicas mensuráveis e que necessitam de monitoramento. A trombocitopenia, contagem de plaquetas abaixo de 100.000 células/ mm³, ocorre habitualmente entre o terceiro e o oitavo dia de doença. Já a hemoconcentração, aumento de 20% do hematócrito em comparação aos níveis pré-adoecimento, é sugestivo da hipovolemia em decorrência do aumento da permeabilidade vascular [WHO, 2009].

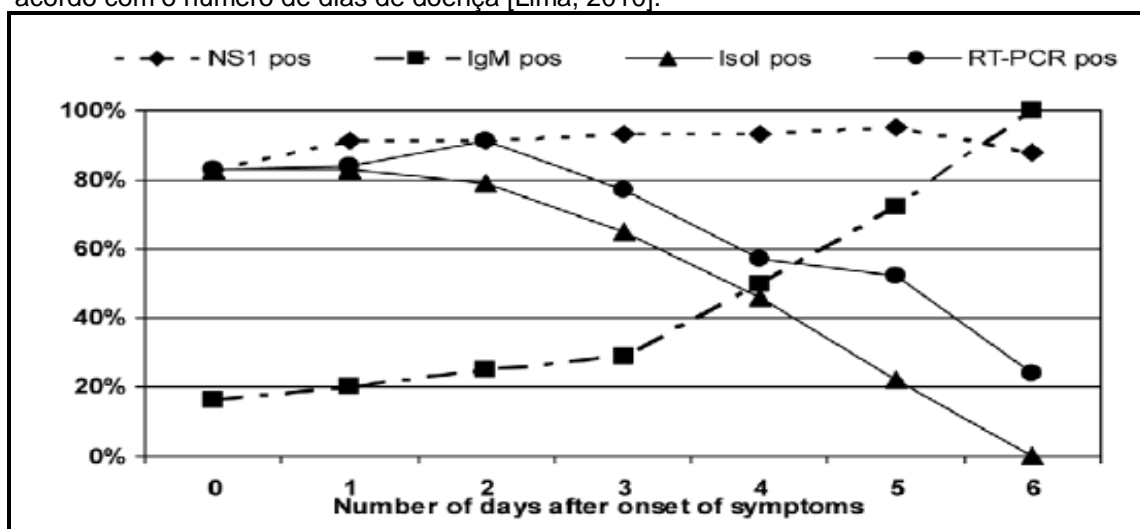
O diagnóstico laboratorial específico do dengue baseia-se em dois pilares: identificação direta do vírus ou seus componentes, e identificação indireta através de pareamento sorológico.

O isolamento viral pode ser obtido a partir de sangue ou tecidos até o quinto de doença. O procedimento de isolamento dura de uma a duas semanas e requer cultura de células, preferencialmente de *Aedes albopictus*, e posterior teste de imunofluorescência.

A identificação do RNA viral e seus sorotipos pode ser feita através do RT-PCR ou RT-PCR em Tempo Real. Ambas as técnicas envolvem extração, purificação e amplificação do RNA viral e a identificação através de sondas moleculares específicas [WHO, 2009].

Durante a fase febril, a detecção do RNA viral através do RT-PCR ou do antígeno não estrutural 1 (NS1) são os procedimentos mais usuais e são considerados suficientes para o diagnóstico da doença. Após o início da doença, o vírus e seus componentes podem ser detectados no soro, plasma e outros tecidos por quatro a cinco dias, figura 8. Sendo esta, a principal forma de diagnosticar a doença na fase aguda [WHO, 2012].

Figura 8- Comparação da sensibilidade dos testes positivos para o diagnóstico de dengue de acordo com o número de dias de doença [Lima, 2010].



Ao final da fase aguda, a sorologia é a técnica indicada para o diagnóstico de dengue [WHO, 2012]. A sorologia para a dengue baseia-se na detecção de altos títulos de IgM a partir do quarto dia de doença. A soroconversão pareada é confirmatória da doença, enquanto que a positividade em amostra única indica infecção ativa ou recente [Simmons, 2012].

Tanto para a identificação do IgM quanto do IgG, deve-se colher amostra de sangue do paciente a partir do quinto dia de doença [WHO, 2009].

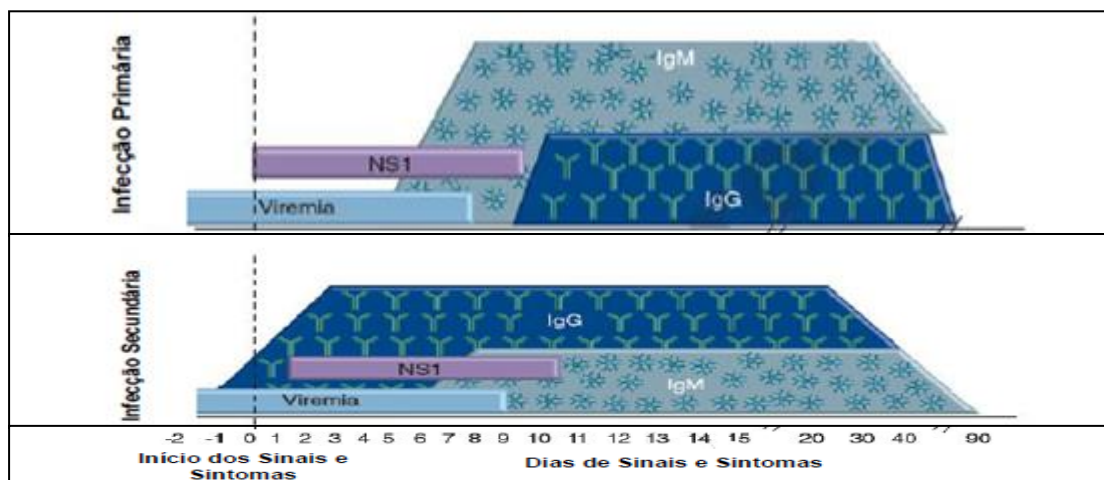
O teste ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) é o mais utilizado na confirmação de casos de dengue [Kuno, 1987]. Nele, os anticorpos IgM presentes no soro do paciente são capturados em uma microplaca, usando anticorpos IgM

anti-humanos específicos, seguido da adição de antígenos dengue específicos (DENV 1-4). A positividade do teste é demonstrada por uma alteração de coloração captada por um espectrofotômetro [WHO, 2009].

O ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA) pode classificar o tipo de infecção para a dengue (primária ou secundária) de acordo com os títulos observados no teste [Lima, 2014]. No entanto, a possibilidade de reação cruzada com outros Flavivírus como o Zika vírus, malária e até mesmo com bactérias, tem sido um fator preocupante no que tange à acurácia dos métodos laboratoriais específicos [Bhatti, 2015] [Domingo, 2015].

No entanto, em locais nos quais o dengue é endêmico, como no Brasil, a variabilidade dos parâmetros laboratoriais podem ocasionar dúvidas na análise de casos de dengue secundária (figura 9). Nas infecções primárias, nota-se uma resposta IgM intensa, mais específica e precoce. Nos casos secundários, a amplitude da resposta IgM é mais baixa e tardia havendo, porém resposta IgG mais acentuada e precoce, aproximando-se do período em que se pode detectar a viremia [WHO, 2012].

Figura 9- Cinética antígeno e anticorpo nas infecções por dengue [Lima, 2014].



Adaptado de Lima, 2014 [Lima, 2014].

O teste de imunocromatografia é realizado para a detecção qualitativa do NS1 no soro humano, técnica esta que requer expertise mínima para realizar o exame cujo sangue pode ser obtido de uma punção digital [Fry, 2011], [Dietz,

1990]. Toda a realização do exame, desde a punção até a emissão do laudo ocorre em menos de uma hora [Gan, 2014].

A proposta de um teste barato, sensível, específico, rápido e de fácil execução como o teste imunocromatográfico [Gan, 2014] foi rapidamente adotada pela Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro. Durante os anos de 2011 e 2012 o teste imunocromatográfico por captura de NS1 e detecção de IgM e IgG (teste Bioeasy[®] DUO) foi disponibilizado para a rede pública no Estado do Rio de Janeiro, sendo realizados, segundo a Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental, cerca de quatorze mil testes rápidos (NS1, IgM e IgG).

A validação do teste Bioeasy[®] é, portanto, importante em outras áreas geográficas com circulação de outros sorotipos do DENV e onde há elevada frequência de casos secundários de dengue como no Rio de Janeiro.

1.2. Atendimento ao caso suspeito de dengue nas Unidades de Pronto Atendimento (UPA 24H)

Baseadas na Política Nacional de Urgência e Emergência do Ministério da Saúde e instaladas no Rio de Janeiro a partir de 2007, há atualmente no estado 52 Unidades de Pronto Atendimento (UPA 24H). As UPA 24H foram concebidas como serviço pré-hospitalar específico de pronto-atendimento que funciona em horário integral para atender tanto a pequenas e médias emergências quanto a pacientes graves, até que sejam removidos para o hospital de referência.

No contexto regional, acredita-se que as UPA 24H sejam o local mais representativo do atendimento emergencial na rede pública do Rio de Janeiro, contexto este ideal para a aplicação do questionário estruturado, permitindo uma captação mais precoce.

O papel do enfermeiro durante a epidemia de dengue é citado em manual específico do Ministério da Saúde [Brasil, 2008] descreve a importância do registro detalhado dos dados clínicos do doente a fim de planejar e executar os serviços de assistência.

O Ministério da Saúde adota desde 2008 a Classificação de Risco do paciente onde o enfermeiro é o primeiro profissional de saúde a abordar o doente, sendo ele o responsável pela classificação clínica do paciente com suspeita de dengue [Brasil, 2008]. Acredita-se que o enfermeiro deva ser envolvido diretamente na aplicação do questionário estruturado. Sendo, portanto, importante incluir esse profissional na avaliação da confiabilidade de um instrumento diagnóstico. No entanto não há, até o presente momento, nenhum estudo avaliando a confiabilidade inter-entrevistador (médico-enfermeiro) na suspeição de dengue.

1.3. Preceitos epidemiológicos

A principal razão para a existência de um teste de rastreamento é identificar a doença de forma precoce a fim de otimizar a intervenção evitando, portanto, a progressão da mesma [Streiner, 2003]. Assim sendo, os testes diagnósticos e de rastreamento prescindem de atributos epidemiológicos.

Reprodutibilidade ou confiabilidade avalia se o que o teste afere é reprodutível, sem levar em conta o que está sendo medido, ou seja, a habilidade de diferenciar determinada condição entre sujeitos, pacientes ou participantes [Streiner, 2015], [Guyat, 2015]. A confiabilidade aumenta na medida em que a variabilidade entre sujeitos aumenta. Para quantificar a reprodutibilidade do método usamos o coeficiente de correlação intraclassa para variáveis contínuas e confiabilidade inter-observador, intra-observador e o teste-reteste [Guyat, 2015].

Os ensaios clínicos podem ser classificados de acordo com o objetivo a ser alcançado.

Segundo Schwartz e Lellouch, os ensaios clínicos exploratórios podem ser diferenciados através dos efeitos esperados. Os ensaios explanatórios ou de eficácia teriam como objetivo entender os efeitos de dois tratamentos alternativos, quando administrados sob condições ideais. Já os ensaios pragmáticos ou de efetividade seriam conduzidos em condições menos rígidas, mais próximas àquelas encontradas na prática, com o objetivo de estabelecer uma base científica adequada para tomada de decisão [Schwartz, 1967].

Assim, segundo Coutinho e colaboradores, os ensaios de eficácia estão voltados para a questão do conhecimento dos mecanismos de ação onde os participantes tendem a formar um grupo mais homogêneo de indivíduos, seguindo esquemas terapêuticos rígidos com foco na eficácia do método [Coutinho, 2003].

Já nos ensaios pragmáticos ou de efetividade, o objetivo é analisar os problemas de decisão incorporando uma população mais heterogênea de pacientes [Coutinho, 2003]. Os regimes de tratamento seriam mais flexíveis, acomodando assim as necessidades individuais dos pacientes, aproximando o estudo das características dos pacientes e do modo como a intervenção se dará na prática, ou seja, a efetividade da intervenção [Coutinho, 2003], [Kim, 2013]. Sendo assim, segundo Streiner e Norman os critérios de arrolamento dos pacientes seriam menos rígidos, possibilitando a generalização futura dos resultados, sem que, no entanto houvesse perda da qualidade da análise uma vez que a população deveria ser bem caracterizada [Streiner e Norman, 2009a]. Para fins de análise, entra o conceito de “*intention to treat*” onde todos os pacientes arrolados inicialmente são quantificados, mesmo que tenham saído ou sido excluídos durante o estudo [Streiner e Norman, 2009].

Em 2008 o grupo Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) publicou orientações e um check-list específicos para estudos pragmáticos (figura 10) [Zwarenstein, 2008].

Portanto, segundo Kim, os estudos pragmáticos ou de efetividade devem ter as seguintes características: a seleção dos pacientes deve obedecer à rotina assistencial; a intervenção deve ser executada pela equipe de rotina com treinamento adequado; os controles devem ser aqueles da prática rotineira ao invés de placebos e as medidas de desfecho devem ser guiadas pela apresentação clínica do doente e incorporadas de forma ampliada para a melhoria na qualidade de vida relacionada à saúde [Kim, 2013].

Figura 10- Extensão do CONSORT para estudos pragmáticos (adaptado de Zwarenstein, 2008) [Zwarenstein, 2008].

Seção do CONSORT	Item	Extensão para estudos pragmáticos
Introdução		
Antecedentes	2	Descrever o problema de saúde ou do serviço de saúde o qual a intervenção está sendo proposta e outras intervenções comumente direcionadas ao problema
Método		
Participantes	3	O critério de elegibilidade deve estar explícito para descrever o participante típico e/ou onde aplicável; o profissional específico (enfermeiros, por exemplo); instituições (hospitais, por exemplo), comunidades (ou localidades, cidades) e o ambiente de cuidado (público ou privado, por exemplo)
Intervenções	4	Descrever os recursos extras (ou recursos removidos) no ambiente de cuidado para implementar a intervenção. Indicar quais esforços foram empenhados para padronizar a intervenção ou se a intervenção e a administração do mesmo variou entre participantes, cuidadores ou locais de estudo foi permitida
Desfechos	6	Descrever o cuidado padrão em detalhes semelhantes ao da intervenção
Tamanho da amostra	7	Explicar a intenção do desfecho alvo e, quando relevante, se a extensão do seguimento é importante para aqueles que usarão os resultados do estudo
Mascaramento	11	Se não houver mascaramento, descrever o motivo
Resultados		
Fluxo dos pacientes	13	O número de pacientes ou unidades arroladas para participar do estudo, o número de unidades elegíveis, e os motivos de exclusão dos participantes
Discussão		
Generalização	21	Descrever aspectos importantes do ambiente em que os resultados foram obtidos. Discutir as possíveis diferenças onde características locais como tradições; organização do serviço público; equipe assistencial ou recursos possam variar daqueles obtidos no estudo

1.3.1. Medidas de acurácia diagnóstica

A acurácia de um teste diagnóstico leva em conta como ele pode identificar corretamente as pessoas com uma determinada doença e excluir as pessoas que não têm a doença.

Essa acurácia pode ser estimada por meio de comparação dos resultados de um teste com os resultados de um teste de referência. Os participantes de um estudo de teste diagnóstico devem submeter-se tanto ao teste índice quanto ao teste padrão, para que em seguida, os resultados dos testes sejam comparados. As medidas de acurácia foram sumarizadas na figura 11.

A sensibilidade do teste é a capacidade do teste detectar a doença quando a mesma está presente. Já a especificidade é a proporção de indivíduos sadios que foram corretamente identificados pelo teste [Streiner e Norman, 2009b].

Figura 11- Matriz de cálculo baseada na tabela de contingência para testes diagnósticos [Fischer, 2003].

		Padrão de referência		Totais
		Doente	Não doente	
Teste diagnóstico	Positivo	a	b	a+b
	Negativo	c	d	c+d
		a+c	b+d	a+b+c+d

Sensibilidade:	$a / (a+c)$
Especificidade:	$d / (b+d)$
Valor preditivo positivo:	$a / (a+b)$
Valor preditivo negativo:	$d / (c+d)$
Prevalência:	$(a+c) / (a+b+c+d)$
Odds ratio diagnóstica:	$(axd) / (bxc)$
Razão de verossimilhança positiva: (variáveis dicotômicas)	Sensibilidade / (1-especificidade)
Razão de verossimilhança negativa: (variáveis dicotômicas)	(1-sensibilidade) / especificidade

A razão de verossimilhança “*likelihood ratio (LLR)*” é outro parâmetro próprio do teste e nos indica quais são as chances de um teste positivo ter sido obtido de um indivíduo acometido [Norman and Streiner, 2003]. Conceitualmente seria a razão de duas probabilidades: a probabilidade que um teste positivo seja de um paciente doente dividido pela probabilidade de obter o mesmo resultado positivo em pacientes sãos [Fischer, 2003]. Quando a razão de verossimilhança for igual a “um” significa que o resultado do teste tem chances iguais de ocorrer em pacientes sãos e doentes, enquanto que valores acima de dez sugerem que o teste apresenta potencial para influenciar a conduta clínica [Fischer, 2003]. A vantagem teórica da razão de verossimilhança é que ela não é sensível à variação da prevalência [Fischer, 2003].

A especificidade, sensibilidade e as razões de verossimilhança positiva e negativa são atributos do teste e não variam desde que o mesmo seja empregado em populações semelhantes. No entanto, se for aplicado em situações onde

houver diferentes testes de referência, os parâmetros deverão ser recalculados [Streiner, 2003], [Bossuyt, 2015].

As medidas de interesse quando um teste é empregado em grandes grupos populacionais são: o valor preditivo positivo (VPP), que é a probabilidade de um teste ser positivo em um paciente verdadeiramente doente; e o valor preditivo negativo (VPN), que é a probabilidade de um teste ser negativo em um paciente são. Este risco não pode ser calculado diretamente a partir de sensibilidade e especificidade obtidos no teste preliminar, uma vez que está relacionado com a prevalência real da doença na população total. Tanto o VPP quanto o VPN variam de acordo com a prevalência da doença [Streiner e Norman, 2009].

Quando a prevalência da doença é alta, o VPP é alto e o VPN é baixo, portanto, o teste será mais bem empregado para confirmar (“*rule in*”) a doença e não para descartar, “*rule out*”, já que haverá muitos falsos negativos [Streiner, 2003].

Quando aplicado em situações de rastreamento, onde geralmente a prevalência da doença a ser pesquisada é baixa (pesquisa de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana em doadores de sangue, por exemplo) o VPP é baixo (muitos falsos positivos) e o VPN alto. Neste caso, o teste é usado para descartar (“*rule out*”) a condição, uma vez que o custo da perda de um caso positivo é alto [Streiner e Norman, 2009], [Streiner, 2003]. Para fins confirmatórios, são então realizados testes diagnósticos em série: o primeiro teste com alta sensibilidade, mesmo assumindo alto potencial de falsos positivos, com outro teste posterior com alta especificidade [Streiner, 2003].

A *odds ratio* (razão de chances) diagnóstica é outra metodologia empregada para comparar testes e não sofre influência da prevalência da doença. Pode ser obtida pelo quociente das razões de verossimilhança positiva e negativa e valores acima de 20 indicam que o teste potencialmente pode auxiliar o diagnóstico [Fischer, 2003].

1.3.2. Medidas de reprodutibilidade

Os estudos de variabilidade levam em conta: a concordância intraobservador, ou a intensidade a qual o observador concorda com sua própria classificação previamente realizada, e, a concordância interobservador, concordância entre observadores de um mesmo fenômeno [Cicchetti, 1982].

O ideal seria que analisássemos apenas a proporção de resultados corretos, ou seja, os verdadeiros positivos e negativos. No entanto, ainda assim poderíamos estar cometendo um erro uma vez que alguns resultados verdadeiros poderiam ocorrer devido ao acaso, o que influenciaria nos resultados da acurácia [Streiner, 2003]. Para que este problema seja corrigido usa-se o índice de Kappa (κ) de Cohen, obtido pela fórmula [Cohen, 1968]:

$$\kappa = \frac{\text{concordância observada} - \text{concordância obtida pelo acaso}}{\text{concordância possível} - \text{concordância obtida pelo acaso}}$$

De acordo com a interpretação de Landis e Koch para o índice de Kappa, concordância pobre seria aquela onde o $\kappa < 0.0$; discreta se $0.0 \leq \kappa < 0.2$; regular se $0.2 \leq \kappa < 0.4$, moderado se $0.4 \leq \kappa < 0.6$, substancial se $0.6 \leq \kappa < 0.8$; quase perfeita se $0.8 \leq \kappa < 1.0$ e perfeita se $\kappa = 1$ [Landis, 1977]. De acordo com Cicchetti *et al.*, valores de κ negativos, obtidos quando a concordância ao acaso for superior à concordância observada, podem ocorrer devido à inexperiência ou à falta de treinamento do observador [Cicchetti, 2008].

1.3.3. Emprego de parâmetros epidemiológicos para o diagnóstico do dengue

O amplo espectro clínico da doença em muitas vezes complica o diagnóstico acurado da mesma, principalmente na fase febril, onde o quadro deve ser diferenciado de outros causados por até cerca de 12 agentes infecciosos diferentes [Simmons, 2012].

Esta necessidade de diferenciação causa dois problemas potenciais: 1- diagnóstico de outra doença febril aguda quando o caso se trata de dengue, acarretando em subdiagnóstico, como nas regiões de malária; e 2- superdiagnóstico de dengue onde outras doenças febris agudas serão clinicamente diagnosticadas como dengue, como nos períodos de surto epidêmico no Rio de Janeiro.

A extensão do subdiagnóstico pode ser estimada de acordo com a capacidade de diagnosticar dengue. Em estudo realizado em um cenário onde predominou DENV-1, o teste rápido NS1 e a pesquisa de IgM/IgG apresentaram sensibilidade de 62% e 72,5%, respectivamente. Porém, quando usados em combinação, por terem janelas de detecção complementares, a sensibilidade aumentou para 93% [Fry, 2011]. Porém, a especificidade não pode ser obtida devido ao pequeno tamanho amostral.

Nas infecções primárias, a sensibilidade do NS1 chega a ser maior que 90% e a antigenemia pode durar vários dias após a resolução do quadro febril [Tricou, 2010], [Chaterji, 2011]. No entanto, na infecção secundária, a sensibilidade do teste cai para 60 a 80% [Guzman, 2010].

Apesar da boa sensibilidade, os critérios de diagnóstico clínico da OMS para dengue vêm apresentando baixa especificidade. Em estudo prospectivo realizado em Cingapura os critérios da OMS de 1997 e de 2009 apresentaram sensibilidade variando de 95–98,3% e 96–100% respectivamente. Já a especificidade variou de 26-35% e 19–23% [Gan, 2014].

Analisando com maior detalhe as populações dos estudos, é possível afirmar que os principais motivos para a heterogeneidade nos resultados estão relacionados a variações no tempo de febre no momento da coleta e nas proporções de infecções primárias e secundárias. Em todos os estudos que realizaram estas comparações, a sensibilidade tanto do NS1 quanto do PCR foi maior nos primeiros três dias de febre e nas infecções primárias do que nas secundárias [Tricou, 2010], [Chaterji, 2011], [Guzman, 2010], [Gan, 2014].

Com o objetivo de contribuir para o diagnóstico precoce e acurado de dengue, são apresentados neste trabalho os resultados de três estudos: 1) Acurácia de dados clínicos e laboratoriais para o diagnóstico de dengue; 2)

Acurácia de um teste imunocromatográfico e de um teste ELISA com e sem dissociação térmica para o diagnóstico de dengue; 3) Concordância interobservadores quanto a sinais e sintomas de pacientes com uma doença febril aguda.

2. JUSTIFICATIVA

O dengue constitui um importante problema de saúde pública no Brasil e em muitos países tropicais. A vigilância ativa desta doença a partir de um sistema de informação de saúde bem estruturado é uma das estratégias prioritárias para o seu controle [WHO, 2009].

Um desfecho clínico favorável requer diagnóstico eficiente e precoce dos casos guiado por um diagnóstico diferencial acurado, confirmação laboratorial rápida e pronta resposta nos casos graves [WHO, 2012]. No entanto, os critérios postulados pela OMS apresentam sensibilidade e especificidade baixas [Dietz, 1990], [Vasconcelos, 1998], [Lima, 1999]. Apesar do desenvolvimento de métodos rápidos de diagnóstico laboratorial [Dietz, 1990], [Bossuyt, 2003], [Zainah, 2009], a sua disponibilidade ainda é restrita e a maioria dos diagnósticos em áreas endêmicas é baseada em critérios clínico-epidemiológicos inespecíficos.

Definui-se como o cenário mais apropriado para o desenvolvimento desta tese por representar de forma fidedigna o cenário assistencial da cidade e do estado do Rio de Janeiro durante as epidemias de dengue.

Esta tese se insere na linha de pesquisa em Validação Diagnóstica do Laboratório de Epidemiologia Clínica, vinculada desde 2004 ao Programa de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) e dá prosseguimento às investigações anteriores sobre acurácia diagnóstica de critérios clínicos e laboratoriais.

Considerando as limitações dos estudos brasileiros anteriores, busca ampliar o espectro de pacientes investigados em âmbito de saúde pública para melhor subsidiar a decisão diagnóstica e solicitação do exame NS1 disponível na rede pública, além de aperfeiçoar a qualidade das informações disponíveis.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar a acurácia de algoritmo diagnóstico clínico-laboratorial para as infecções por dengue obtidos através de um instrumento padronizado em cenário amplo em termos de saúde pública e espectro clínico de pacientes durante a epidemia de DENV-4 ocorrida no Rio de Janeiro em 2013.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Avaliar a acurácia diagnóstica dos critérios clínicos para o diagnóstico de dengue durante a epidemia de DENV-4 ocorrida no Rio de Janeiro em 2013.

3.2.2. Avaliar a acurácia diagnóstica do teste NS1 Bioeasy[®] imunocromatográfico e do Platelia[™] ELISA NS1 com e sem dissociação térmica para o diagnóstico de DENV-4.

3.2.3. Avaliar a concordância interobservador quanto aos sinais e sintomas de pacientes com suspeita de dengue durante a epidemia de DENV-4.

4. MANUSCRITO 1 – “ Accuracy of clinical criteria and an immunochromatographic strip test for dengue diagnosis in a DENV-4 epidemic”

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes aos seguintes objetivos específicos:

- Objetivo Específico 1: Avaliar a acurácia diagnóstica dos critérios clínicos para o diagnóstico de dengue durante a epidemia de DENV-4 ocorrida no Rio de Janeiro em 2013.
- Objetivo Específico 2: Avaliar a acurácia diagnóstica do teste NS1 Bioeasy[®] imunocromatográfico para o diagnóstico de DENV-4.

Situação do Manuscrito: Artigo publicado na revista *BMC Infectious Diseases*

Medicina I Qualis Capes 2012: A2

Referência: Sibelle Nogueira Buonora, Sonia Regina Lambert Passos, Cleber Nascimento do Carmo, Fernanda de Moraes Quintela, Diana Neves de Oliveira, Flavia Barreto dos Santos, Yara Hahr Hökerberg, Rita Maria Ribeiro Nogueira and Regina Paiva Daumas. Accuracy of clinical criteria and an immunochromatographic strip test for dengue diagnosis in a DENV-4 epidemic. *BMC Infect Dis.* 2016 Jan 29;16(1):37. doi: 10.1186/s12879-016-1368-7.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Accuracy of clinical criteria and an immunochromatographic strip test for dengue diagnosis in a DENV-4 epidemic

Sibelle Nogueira Buonora^{1*}, Sonia Regina Lambert Passos¹, Cleber Nascimento do Carmo², Fernanda Moisés Quintela¹, Diana Neves Rodrigues de Oliveira¹, Flavia Barreto dos Santos⁴, Yara Hahr Marques Hökerberg¹, Rita Maria Ribeiro Nogueira⁴ and Regina Paiva Dumas³

Abstract

Background: Early diagnosis of dengue infection is important for decision-making and timely implementation of therapeutic measures. Although rapid NS1 assays have been used for dengue diagnosis since 2008, their performance in DENV-4 cases has not yet been fully assessed.

Methods: We evaluated the accuracy of NS1 Bioeasy™ immunochromatographic strip test and of three clinical criteria for dengue diagnosis. Patients presenting at an emergency care center within 72 h of an acute febrile illness during the 2013 DENV-4 epidemic in Rio de Janeiro were consecutively enrolled for clinical and laboratory evaluation. We classified patients as suspected dengue or not according to three clinical criteria: WHO 2009, WHO 1997, and INI-FIOCRUZ. Dengue diagnosis was defined by RNA detection using RT-PCR and the negative cases were negative for all dengue serotypes and also Platelia™ NS1 ELISA. We obtained accuracy indices for NS1 Bioeasy™ alone and in combination with the clinical criteria.

Results: RT-PCR for DENV-4 was positive in 148 out of 325 patients. Positive likelihood ratio, sensitivity, and specificity of NS1 Bioeasy™ with WHO 2009, WHO 1997, and INI-FIOCRUZ criteria were 22.6 (95 % CI 7.2–70.6), 40.6 % (95 % CI 32.3–49.3), and 98.2 % (95 % CI 94.9–99.6); 18.3 (95 % CI 6.8–49.2), 44.2 (95 % CI 35.8–52.9), 97.6 (95 % CI 94.0–99.3); 26.2 (95 % CI 6.5–106.5), 29.7 (95 % CI 22.4–37.8), 98.9 (95 % CI 96.0–99.9), respectively. WHO 1997 clinical criteria presented high sensitivity to rule out disease, but extremely low specificity. INI-FIOCRUZ had moderate sensitivity and specificity, and could target a group to a more specific test.

Conclusions: Although the large rates of false negative results using NS1 Bioeasy™ rapid test advise against its use for triaging (rule out) purposes in DENV-4 epidemics, it could be used as a confirmatory tool in a bedside algorithm.

Keywords: Dengue, Accuracy, Sensitivity, Specificity, Diagnosis, Point-of-care systems, NS1

Background

Dengue is an acute viral febrile disease mainly transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito. Dengue virus has four serotypes (DENV 1-4) defined by phylogenetic and antigenic characteristics. The immunity resulting from infection is serotype-specific and does not protect the individual against other serotypes [1].

A recent study estimated that about 390 million cases of dengue occurred in 2010, which is more than three times the World Health Organization (WHO) estimates for that same period [2]. However, only 96 million were symptomatic. Brazil has the highest dengue reporting rates worldwide and between 2000 and 2007, over three million cases were reported in the country, corresponding to approximately 60 % of cases in the Americas [3].

In Brazil, dengue outbreaks have occurred yearly since 1986 and during epidemic seasons the entire health care system is overwhelmed by a three to four-fold increase in patient visits. In the state of Rio de Janeiro, epidemics

* Correspondence: sibellebuonora@gmail.com

¹Laboratory of Clinical Epidemiology, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Buonora et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

occurred in 1986 [4], 1990 [5], 2000 [6], and 2008 [7] by DENV-1, DENV-2, DENV-3, and by the reemergence of DENV-2, respectively, usually followed by dissemination to other regions of the country. DENV-4 was first identified in this Brazilian state in 2011 [8] and accounted for 218,000 reported cases in the 2013 epidemic.

Early diagnosis is critical because some patients may progress from a mild to a severe disease in a short period of time [9, 10]. Repeated monitoring of platelet count and hematocrit is recommended, as an abrupt decrease in platelet count is a warning sign and a significant hematocrit increase is an indirect sign of plasma leakage [7]. In 1997, WHO proposed as a dengue clinical case a patient that presented with fever and two or more of the following: headache, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, rash, hemorrhagic manifestations, and leukopenia [11]. However, due to the low specificity (36 %) of these criteria [12], a new set was proposed in 2009 that grouped myalgia and arthralgia in body aches, included nausea and vomiting, and added some warning signs and symptoms [1]. The 80 % sensitivity and 57 % specificity of the newly proposed WHO criteria [12], supports the importance of laboratory confirmation.

A previous study carried out at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation (INI-FIOCRUZ) in Rio de Janeiro analyzed clinical and hematological data in ambulatory febrile patients and derived another diagnostic set of clinical criteria for dengue diagnosis [13]. In this study population the prediction rule, based on the presence of conjunctival hyperemia and leukocyte count, shown 81 % sensitivity and 71 % specificity [13].

Dengue laboratory diagnosis can be performed directly, by identifying the virus or its components, or indirectly, through serological tests detecting antibodies produced against the virus. The sensitivity of each method relies on disease duration at the moment of the clinical specimen collection [14]. The indirect methods are the more commonly used but have limited usefulness in the acute dengue diagnosis. IgM peaks occur around the third to fourth day of disease onset, and therefore a second clinical specimen collection is needed around day 14 to confirm the IgM rise and conclusively diagnose the disease [15]. However, in scenarios where the prevalence of secondary dengue is high, such as in Rio de Janeiro State, the duration and magnitude of the IgM response is reduced possibly impairing the accuracy of this serologic parameter [16]. Furthermore, pairing IgM are usually not point-of-care techniques, limiting their usefulness in epidemic scenarios.

During the febrile phase, detection of viral RNA or non-structural protein-1 (NS1) are the main methods for the disease diagnosis. However, detection of viral RNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) is

relatively complex and expensive, and is therefore not feasible in a number of health care settings, particularly in epidemic situations. For this reason, the identification of NS1 has been suggested as an alternative because it is present in the virus membrane, is highly stable and is secreted in the human serum during the early phase of dengue infection [15]. The sensitivity of the NS1 ELISA is reported to be greater than 90 % in primary infections and varies from 60 to 80 % in secondary infections [17, 18].

The rapid detection of dengue NS1 by immunochromatographic methods represents a potential breakthrough for laboratory case confirmation at early stages of disease in settings with limited infrastructure because they require minimal laboratory expertise and provide results within 15 to 30 min of specimen reception [4, 15, 19]. This laboratory technique, first described in 2000 and widely used since 2008, has now been tested in all dengue scenarios, especially in DENV-1 and DENV-3 scenarios [12, 15]. However, DENV-4 samples are still underrepresented [15, 18, 20, 21].

Ferraz, et al. [22], when evaluating mainly Brazilian DENV-1 samples by three different immunochromatographic assays, identified the NS1 Bioeasy™ as the one with higher sensitivity (63 %) despite the high specificity presented by all three (100 %). Another Brazilian study evaluating accuracy parameters of 4 immunochromatographic tests in a panel of acute DENV-1 to DENV-3 concluded that NS1 Bioeasy™ presented an overall 68 % specificity and a 90 % sensitivity which could reach 95 % in a DENV-1 setting [23].

A simple and accurate test to diagnose acute dengue cases in outpatient healthcare settings is still required. Considering this issue, we evaluated the diagnostic accuracy of three clinical dengue diagnostic criteria (WHO 1997, WHO 2009, INI-FIOCRUZ) and NS1 Bioeasy™ immunochromatographic test in an urgent care center during a DENV-4 epidemic in the city of Rio de Janeiro, Brazil.

Methods

Ethical statement

This prospective cross-sectional diagnostic accuracy study is reported according to the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Study (STARD) Guideline [24] and was approved by the Research Ethics Committee of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases-FIOCRUZ, CAAE 0066.0.009.000-11, on March 23, 2012.

Enrollment, data, and specimen collection

We conducted the study in the city of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, from March to April 2013, during an ongoing dengue epidemic. Adult patients (age >18 years) attending a public urgent care center (Unidade de Pronto Atendimento-UPA 24H) within 72 h of onset of an acute

febrile illness without an evident focus of infection were eligible for the study.

A trained nurse obtained informed consent and prospectively enrolled the patients during business hours 5 days a week. An infectious disease physician collected data on demographic characteristics, symptoms and physical signs using a summarized version of a previously published and tested semi-structured questionnaire [25]. The tourniquet test was not performed and only spontaneous hemorrhagic manifestations were recorded.

We evaluated all patients according to WHO 1997, WHO 2009, and INI-FIOCRUZ clinical criteria defined elsewhere [1, 11, 13, 26].

Blood samples were collected for complete blood count and specific dengue tests including NS1 Bioeasy™, RT-PCR, Panbio® dengue IgM capture ELISA and dengue IgG ELISA, and Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA. Acute dengue-4 cases were confirmed by RT-PCR. Serum samples were sent to the Flavivirus Laboratory, a regional reference laboratory for dengue and yellow fever at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) where they were frozen at -70 °C until using for dengue specific laboratorial tests.

Index tests

NS1 strip test

All febrile cases were tested by the NS1 Bioeasy™ immunochromatographic strip test (Bioeasy™, Standard Diagnostics INC, Korea). This rapid test was chosen because it has already been used in the state of Rio de Janeiro and in other Brazilian states during dengue outbreaks. However, its performance had not been previously assessed. According to the manufacturer's instruction, the test can be stored at room temperature and can adequately detect the NS1 within 15 min using three drops of whole blood, plasma or serum.

In the immunochromatographic strip test, the NS1 antigen present in the sample will complex with the gold colloidal particles coated with anti-NS1 antibodies. After migration, the complexes will be captured by anti-NS1 antibodies at the test line where a line will appear. The presence of two lines in the cassette's window means a positive result, whereas the absence of the second line means a negative result with an adequate control line, which ensures the test is working properly.

Clinical criteria

Patients were classified as suspected dengue cases according to three sets of clinical criteria described as follows:

WHO 1997: fever with two or more of the following: headache, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, rash, hemorrhagic manifestations, and leukopenia [11]; *WHO 2009*: fever with two or more of the following: nausea/vomiting, rash, pain, leukopenia, and any of the following

warning signs: abdominal pain, persistent vomiting, edema, mucosal bleeding, lethargy, hepatomegaly or hemoconcentration associated with a sudden drop in platelet count [1]; and *INI-FIOCRUZ*: presence of conjunctival redness with leukocytes less than 7500/mm³ or less than 3760 leukocytes/mm³ independently of other signs or symptoms [13].

Hemoconcentration in a single sample was defined by a hematocrit >53 % in males or 48 % in females [27]. Leukopenia was defined as a total leucocyte count ≤4500 cells/mm³ [27].

Reference tests

Dengue viral RNA

In order to identify dengue viral RNA and specifically dengue 4 serotype, we performed RT-PCR according to the protocol described by Lanciotti et al. [28]. This highly specific protocol suggested by WHO [1] was considered the "gold standard" method for dengue-4 case confirmation in this study. Briefly, consensus primers (D1-5'-TCAA TATGCTGAAACGCGGAGAAACCG-3') and D2 (5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3') were annealed to any of the four dengue serotypes to amplify a 511-bp product in a reverse transcriptase-polymerase reaction. After a second round of amplification (nested PCR) with type-specific primers (TS1 [5'-CGTCTCAGT GATCCGGGGG-3'], TS2 [5'-CGCCACAAGGGCCAT GAACAG-3'], TS3 [5'-TAACATCATCATGAGACAGA GC-3'] and TS4 [5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAG A-3']), DNA products specific for each dengue virus serotype were generated.

NS1 antigen detection by ELISA

The Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, France) was used for NS1 antigen capture according to the instructions by the manufacturer.

Immunologic markers

We performed the Panbio® dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Minas Gerais, Brasil) and Dengue Virus IgG DxSelect™ ELISA (Focus Diagnostics, California, USA) according to the manufacturers' instructions for the qualitative detection of anti-DENV IgM and anti-DENV IgG antibodies, respectively.

Case definition

Since we aimed to describe only dengue 4 cases, a dengue (D4) case was defined as a patient confirmed with DENV-4 by RT-PCR. Furthermore, acute DENV-4 cases were classified as primary or secondary infections according to the absence or presence of anti-dengue IgG.

A non dengue (ND) case was defined as a patient with negative results for all dengue biomarkers (viral genome from any serotype, anti-dengue IgM and NS1).

Patients with negative RT-PCR and Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA and/or dengue IgM positive results were considered indeterminate [29]. Indeterminate cases and patients with dengue infection by serotypes other than DENV-4 were excluded.

Laboratory personnel performing one test were blinded to the results of other tests.

Data processing and analysis

All clinical and laboratory data were collected and recorded in a database using the EpiData® 3.1 software [30]. Exploratory analysis was performed using the SPSS® v 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois). MedCalc® 14.8.1 program was used to calculate 95 % confidence intervals (CI) for sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and likelihood ratios of NS1 Bioeasy™ and dengue clinical criteria.

A sample size of 137 positive dengue patients was determined as necessary to estimate, with 95 % confidence level, a sensitivity of 85 % with an absolute error of 6 %.

Considering a prevalence of 40 % among febrile patients, 342 febrile subjects should be evaluated.

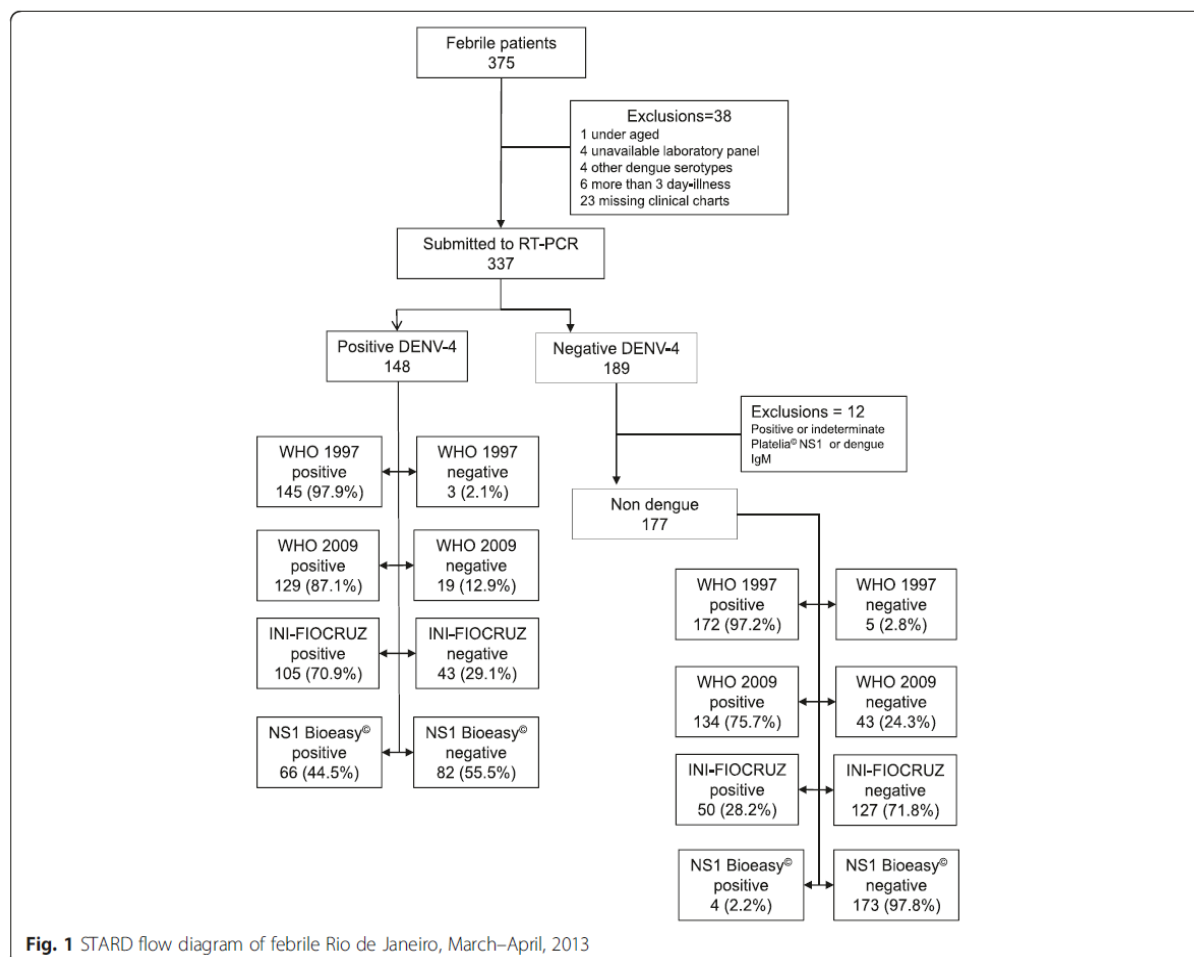
Role of funding source

The Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) funded this study (PROEP 402068/2012, REBRATS 401366/2013-8 and Grant level 2 CNPq 311414/2013-3); however, the funder was not involved in the design, sample handling, analysis, data interpretation, conclusions or decision to publish.

Results

In this study, we evaluated a total of 375 acutely febrile patients. Of those, 38 (10.1 %) were excluded, for reasons shown in Fig. 1. For this reason, 12 patients in the RT-PCR negative group were excluded for presenting positive or indeterminate results for specific dengue IgM or Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (Fig. 1).

From the 325 patients included in the study, 148 (45.5 %) had confirmed DENV-4 infection. No significant differences in age and gender distributions were observed



between D4 and ND groups. The hematocrits were similar in both groups, but the platelet and leukocyte counts were lower among D4 patients (Table 1). The median time from onset of symptoms and medical care was 2 days in both groups.

The secondary infections, defined by anti-dengue IgG detection in the D4 group, were characterized in 124/148 (83.7 %) patients, and the NS1 strip test sensitivity was lower (42 %) in secondary (52/124) than in primary dengue cases (62.5 %; 15/24), $p = 0.05$.

We also tested the agreement between the NS1 Bioeasy™ test and the Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA. The overall agreement, positive and negative concordances between the tests were 84.1, 83.5 and 84.7 %, respectively.

Clinical and laboratory features of eligible patients are shown in Table 2. No sign or symptom alone was able to predict dengue, although leukopenia and thrombocytopenia were more frequent in D4 cases. Leukocyte counts below 4500/mm³ were almost eight times more likely to be present in D4 cases. In our study population, we did not find warning signs such as nuchal rigidity, altered consciousness, and ascites.

Using the WHO 1997 diagnostic criteria, a total of 145 (97.8 %) D4 and 172 (97.2 %) ND were clinically classified as dengue suspected cases, with a sensitivity of 97.8 % and specificity of 2.8 %. The WHO 2009 criteria clinically classified as dengue 129 (87.1 %) D4 and 134 (75.7 %) ND with 87.1 % sensitivity and 24.3 % specificity. The INI-FIOCRUZ clinical prediction rule classified as dengue suspected 105 (70.9 %) D4 patients but also 50 (28.2 %) ND, with a sensitivity of 70.9 % and specificity of 71.8 % (Table 3).

The NS1 Bioeasy™ immunochromatographic strip test alone was more accurate than the clinical criteria (OR = 34.4) and showed high specificity (97.8 %). However, the test sensitivity was lower (44.5 %). The test incorrectly classified as ND more than half of dengue patients (55.2 %). With these results almost a third of the patients with a negative NS1 Bioeasy™ test in our setting were in fact confirmed dengue cases (PPV = 68.3 %).

Combining the NS1 test with any clinical criteria did not improve the sensitivity or alter the high false negative rates, which remained similar to those obtained by the test alone. But all the evaluated clinical criteria could

be complemented by this test resulting in an almost perfect specificity in a clinical setting.

Discussion

This is the first study we are aware of that assesses the combined accuracy of dengue clinical criteria and a NS1 point-of-care immunoassay for early diagnosis in outpatients during a DENV-4 epidemic. The WHO 1997 criteria was better to rule out the disease. When the INI-FIOCRUZ clinical criteria was positive, then the NS1 rapid test should be done. Patients with a positive strip test should be treated as dengue cases; however, negative results should be monitored for dengue or other acute febrile illnesses. As the clinical diagnosis lacks specificity, a definitive dengue case may need laboratory confirmation.

According to Lima, et al. [17], RT-PCR used in the present research showed 90 % sensitivity and more than 95 % specificity on the second day after the onset of disease, the same median time obtained in our sample. It is reasonable to consider this as a good diagnostic tool to confirm dengue fever. However, considering false negative results, we excluded 12 patients with negative RT-PCR and a positive or indeterminate IgM or Platelia™ NS1 results in which we could not identify the serotype.

At the time the study population was evaluated, there were no reports of any other Flavivirus circulating simultaneously in the city of Rio de Janeiro that could interfere in dengue laboratory results. We believe that we obtained a true non-dengue set of patients.

We also evaluated the ability of hematological parameters and individual signs and symptoms to discriminate dengue from non-dengue. We found that leukopenia was more frequent in D4 than in ND, although the overlapping range between the two groups prevented an adequate discrimination between them. The relevance of leukopenia as a discriminant feature of dengue infection has been previously documented, although the cutoff values may vary [13, 31–34].

The platelet counts were lower in the D4 group, although true thrombocytopenia was infrequent in both groups. Similar to findings in other studies [22, 35], there was no significant difference in hematocrit between groups. This may be because both hemoconcentration and platelet drop are usually not seen in the first days of disease [34].

Table 1 Epidemiological characteristics of 325 febrile patients, Rio de Janeiro, March–April, 2013

	Median (IQR)		<i>p</i> -value
	Dengue 4 (N = 148)	Non dengue (N = 177)	
Age in years	36.6 (23.1–50.1)	36.5 (23.0–50.0)	0.99
Hematocrit (%)	42.6 (40.3–45.0)	42.2 (40.0–44.0)	0.45
Leukocyte counts (cells/mm ³)	4251 (3400–4667)	7518 (5467–7900)	<0.05
Platelet counts (cells/mm ³)	217,812 (187,667–236,667)	256,4945 (221,000–284,667)	<0.05

IQR interquartile range

Table 2 Clinical and laboratory features of 325 febrile patients, Rio de Janeiro, March–April, 2013

	Dengue 4 (N = 148)		Non dengue (N = 177)		OR (95 % CI)
	N	%	N	%	
Clinical					
Exanthema	28	18.9	21	11.8	1.7 (0.9–3.2)
Conjunctival hyperemia	75	50.6	72	40.6	1.5 (1–2.3)
Lethargy ^a	142	95.9	168	94.9	1.3 (0.4–3.6)
Joint pain	110	74.3	128	72.3	1.1 (0.7–1.8)
Pain	143	96.6	171	96.6	1.0 (0.3–3.4)
Retro-orbital pain	105	70.9	124	70.0	1.0 (0.6–1.7)
Nausea/vomiting	99	66.9	120	67.7	1.0 (0.6–1.5)
Edema ^a	3	2.0	4	2.2	0.9 (0.2–4.0)
Liver enlargement ^a	4	2.7	6	3.3	0.8 (0.2–2.9)
Persistent vomiting ^a	35	23.6	48	27.1	0.8 (0.5–1.4)
Myalgia	134	90.5	161	90.9	0.9 (0.4–1.9)
Abdominal tenderness ^a	47	31.7	68	38.4	0.7 (0.5–1.2)
Bleeding ^a	12	8.1	25	14.1	0.5 (0.3–1.1)
Headache	133	89.8	169	95.4	0.4 (0.2–1.0)
Laboratory					
Leukopenia	95	64.1	33	18.6	7.8 (4.7–13.0) ^b
Thrombocytopenia	17	11.4	8	4.5	2.7 (1.1–6.5) ^b
Anti-dengue IgG	123	83.1	161	90.9	0.5 (0.3–1.0)

OR odds ratio, CI confidence interval

^awarning signs; Leukopenia = leucocyte count <4,500cells/mm³; thrombocytopenia = platelet count <150,000 cells/mm³^bsignificant odds ratio

Repeated monitoring of the platelet count and hematocrit is recommended, as an abrupt fall in platelet count is proposed as a warning sign, and a significant hematocrit increase is an indirect sign of plasma leakage [10, 34].

Gan, et al. [36] studied 256 adults in Singapore and reported 87.1 % sensitivity and 26 % specificity for the WHO 2009 criteria, similar to the present research. However, the 20 % sensitivity using the WHO 1997 criteria was far different from those obtained in our study.

Due to its lower sensitivity (70.9 %), the INI-FIOCRUZ clinical criteria does not seem very promising as an exclusive screening alternative. However, it was much more

specific than both WHO criteria and showed the best clinical performance for classifying suspected dengue cases. It could be proposed (and tested in a different population) as a screening tool to further confirm using more expensive and time consuming specific laboratory tests.

Among the signs and symptoms in the three sets of clinical criteria, none was significantly more frequent among D4 patients. However, conjunctival hyperemia, a sign used in the INI-FIOCRUZ criteria, had a performance similar to classic signs, such as exanthema. Although not sufficiently accurate to be used as a discriminant feature alone, this was an important finding

Table 3 Accuracy parameters for DENV-4 in 325 febrile patients, Rio de Janeiro, March–April, 2013

	Sensitivity % (95 % CI)	Specificity % (95 % CI)	LR+ (95 % CI)	LR- (95 % CI)	PPV (95 % CI)	NPV (95 % CI)	OR (95 % CI)
WHO 1997	97.8 (93.8–99.6)	2.8 (1.0–6.9)	1.0 (1.0–1.1)	0.7 (0.2–3.0)	45.6 (39.9–51.5)	62.5 (24.5–91.5)	1.4 (0.3–6.0)
WHO 2009	87.1 (80.3–92.1)	24.3 (18.1–31.6)	1.1 (1.0–1.3)	0.5 (0.3–0.9)	48.8 (42.4–55.2)	69.5 (56.1–80.8)	2.2 (1.2–4.0)
INI-FIOCRUZ	70.9 (63.2–78.6)	71.8 (64.5–78.4)	2.5 (2.0–3.3)	0.4 (0.3–0.5)	67.6 (59.5–74.9)	75.3 (68.0–81.7)	6.4 (3.9–10.4)
NS1	44.5 (36.4–53.3)	97.8 (94.2–99.4)	19.5 (7.3–52.2)	0.6 (0.5–0.7)	94.1 (85.6–98.4)	68.3 (62.1–74.0)	34.4 (12.1–97.9)
WHO 1997 and NS1	44.2 (35.8–52.9)	97.6 (94.0–99.3)	18.3 (6.8–49.2)	0.6 (0.5–0.7)	93.9 (85.0–98.3)	67.8 (61.4–73.7)	32.1 (11.3–91.4)
WHO 2009 and NS1	40.6 (32.3–49.3)	98.2 (94.9–99.6)	22.6 (7.2–70.6)	0.6 (0.5–0.7)	94.9 (85.9–98.9)	66.7 (60.4–72.5)	37.3 (11.3–122.9)
INI-FIOCRUZ and NS1	29.7 (22.4–37.8)	98.9 (96.0–99.9)	26.2 (6.5–106.5)	0.7 (0.6–0.8)	95.6 (84.9–99.5)	63.2 (57.2–68.9)	36.9 (8.7–155.5)

LR+ positive likelihood ratio, LR- negative likelihood ratio, PPV positive predictive value, NPV negative predictive value, OR odds ratio, CI confidence interval

because this clinical sign is not included in the WHO criteria. At least three other studies have reported similar results, both in febrile outpatients in early disease stages [13, 35, 37].

As described by Leo, et al. [38] and Paranavitane, et al. [39] our study targeted early dengue disease in outpatient setting, therefore we could not assess warning signs such as nuchal rigidity, altered consciousness, and ascites, abrupt platelet count fall or hemoconcentration, that occur later during the disease.

The WHO 2009 dengue criteria improved rates of correct identification of severe dengue cases, aiding therapeutics and avoiding unnecessary deaths [30]. However, it did not prove to be much more accurate (sensitive) for screening or clinically diagnosing dengue 4 than the WHO 1997 version. INI-FIOCRUZ criteria showed the best-balanced performance and could enhance specificity being used previously to the NS1 rapid test in selecting a group of patients for this more specific test.

The NS1 Bioeasy™ showed excellent specificity (97.8 %) in the study population, which agrees with previous reported results in different countries [15, 40]. However, we found a substantially lower sensitivity (44.5 %) of Bioeasy™ NS1 immunoassay in our DENV-4 patients compared to the 61.3 and 90 % sensitivity described respectively by Ferraz, et al. [22], and Silva, et al. [23] in DENV-1 and DENV-3 scenarios. Lower sensitivity to DENV-4 compared to the other serotypes has also been documented by Pal, et al. [15], varying from 42 to 58 % depending on the test used.

Differing performances according to serotype were also recently described in a meta-analysis evaluating two NS1 ELISA tests for early dengue detection [18]. The study concluded that Platelia™ NS1 and NS1 Panbio® tests showed lower pooled sensitivity for DENV-4 (58 and 37 %, respectively) [18]. The interpretation given by some authors includes the NS1 gene polymorphism associated with immunological epitopes, a low NS1 concentration in DENV-4 cases [20, 41], or low overall viremia [21]. Nevertheless, this latter hypothesis was not confirmed by Allonso, et al. [20] in a recent Brazilian study.

As reported in other studies on NS1 detection using conventional ELISA or rapid tests, we observed lower NS1 Bioeasy™ sensitivity in secondary (42 %) compared to primary (62.5 %) dengue cases [9, 12, 15, 20]. As most of the cases (83.7 %) were secondary infections, this might have contributed to the poor performance of the test in our population. This low performance probably occurred due to a rapid clearance in secondary cases [15] and/or as a result of antigen-antibody complexes that disrupt the test targets impeding the ability of the test to detect free NS1 antigen [42, 43]. Efforts to dissociate immune complexes by acid or heat treatment can probably enhance the assays sensitivities [44].

The high PPV (94.1 %) obtained in this 45.5 % dengue prevalence scenario, similar to that obtained by Pal, et al. [15], indicates that individuals testing positive on NS1 do not require another confirmatory test. The performance on specificity qualifies this test, as a confirmatory one, to streamline the decision to treat the correctly identified dengue patients in the clinical setting. It should be used just after the onset of symptoms in order to avoid complications and deaths and to organize the flow of care at the facility. This rapid test might also be useful for virologic surveillance purposes to select serum samples for RNA detection by PCR.

However, although highly specific, the NS1 rapid test yields high false negative rates (55.5 %) among confirmed DENV-4 patients, and its low sensitivity argues against its incorporation as a screening diagnostic tool in clinical practice. Recently, the Rio de Janeiro State Health Department decided not to include the test for dengue screening in outpatient settings. Its use has been restricted to evaluate critically ill hospitalized patients.

Our study has some limitations: a small sample of primary dengue patients and the absence of the tourniquet test, a WHO sign criteria, considered a painful and lengthy procedure with poor patient compliance. We were also not able to reevaluate the patients in the convalescent period due to the pragmatic diagnostic study outline and the dynamics of the Rio de Janeiro city's health care system. Although the gold standard for dengue diagnosis would be pairing specific dengue IgM in acute and convalescent period, as proposed by WHO [11], recent studies have also exclusively used PCR as the reference test to evaluate early phase dengue [45], to evaluate clinical algorithms [46] or ELISA and NS1 tests [15].

Conclusions

The development of more sensitive point-of-care tests for dengue diagnosis to act as a screening tool remains a challenge, especially for endemic countries, where the prevalence of secondary cases is high. In summary, we proposed a clinical-laboratory algorithm which combines the INI-FIOCRUZ and the WHO 1997 clinical criteria, in order to select ambulatory suspected early dengue cases (within 3 days of onset of disease) eligible for NS1 strip testing. The patients that test positive should be immediately treated for dengue, and the patients that test negative would still require subsequent diagnostic investigation. We recommend external validation in different settings.

Abbreviations

CI: confidence interval; CNPq: Brazilian National Council of Scientific and Technological Development; D4: dengue 4; DENV-1: dengue virus serotype 1; DENV-2: dengue virus serotype 2; DENV-3: dengue virus serotype 3; DENV-4: dengue virus serotype 4; DNA: deoxyribonucleic acid; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FIOCRUZ: Oswaldo Cruz Foundation;

IgG: immunoglobulin G; IgM: immunoglobulin M; INI-FIOCRUZ: Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation; IQR: interquartile range; LR+: positive likelihood ratio; LR-: negative likelihood ratio; ND: non-dengue; NPV: negative predictive value; NS1: nonstructural protein-1; OR: odds ratio; PPV: positive predictive value; RNA: ribonucleic acid; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction; STARD: Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Study; UPA 24H: Unidade de Pronto Atendimento; WHO: World Health Organization.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SNB, SRLP and RPD conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. DNRO and FMQ participated in its design, data collection and recording. YMHM participated in the study design, data analysis and interpretation and helped to draft the manuscript. RMRN and FBS carried out the immunoassays, rapid immunochromatographic test, viral characterization and writing the manuscript. CNC participated in the design of the study and performed the statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr Maria Angélica Borges dos Santos for her helpful discussions reviewing this manuscript, Dr Monique da Rocha Queiroz Lima for executing all the specific laboratory assays, Allan and Kate Crean for the careful English editing.

Author details

¹Laboratory of Clinical Epidemiology, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

²National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

³Germano SINVAL Faria Teaching Primary Care Center, National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 19 August 2015 Accepted: 22 January 2016

Published online: 29 January 2016

References

- World Health Organization. Dengue: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 2009. http://www.who.int/neglected_diseases/en/. Accessed in 15 Jan 2015.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7.
- San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckenoghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(1):128–35.
- Dietz VJ, Gubler DJ, Rigau-Perez JG, Pinheiro F, Schatzmayr HG, Bailey R, et al. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. *Am J Epidemiol*. 1990;131(4):693–701.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(2):253.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(9):1376–81.
- Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S7–18.
- Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):255–6.
- Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(1), e360.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 1997. http://www.who.int/neglected_diseases/en/. Accessed in 15 Nov 2014.
- Chaterji S, Allen Jr JC, Chow A, Leo YS, Ooi EE. Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):224–8.
- Daumas RP, Passos SR, Oliveira RV, Nogueira RM, Georg I, Marzochi KB, et al. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: a diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2013;13:77.
- Lima MRQ, Nogueira RM, Santos FB. Dengue diagnosis: commercially available kits and laboratory support. In: *Clinical insights: dengue: transmission, diagnosis & surveillance*. 1st ed. London: Future Medicine Ltd; 2014. p. 27–47.
- Pal S, Dauner AL, Mitra I, Forshey BM, Garcia P, Morrison AC, et al. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. *PLoS One*. 2014;9(11), e113411.
- Domingo C, Alves MJ, de Ory F, Teichmann A, Schmitz H, Muller R, et al. International external quality control assessment for the serological diagnosis of dengue infections. *BMC Infect Dis*. 2015;15:167.
- Lima MR, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7), e738.
- da Costa VG, Marques-Silva AC, Moreli ML. A meta-analysis of the diagnostic accuracy of two commercial NS1 antigen ELISA tests for early dengue virus detection. *PLoS One*. 2014;9(4), e94655.
- Fry SR, Meyer M, Semple MG, Simmons CP, Sekaran SD, Huang JX, et al. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6), e1199.
- Allonso D, Meneses MD, Fernandes CA, Ferreira DF, Mohana-Borges R. Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2014;9(11), e113634.
- Sea VR, Cruz AC, Gurgel RQ, Nunes BT, Silva EV, Dolabella SS, et al. Underreporting of Dengue-4 in Brazil due to low sensitivity of the NS1 Ag test in routine control programs. *PLoS One*. 2013;8(5), e64056.
- Ferraz FO, Bomfim MR, Totola AH, Avila TV, Cisalpino D, Pessanha JE, et al. Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. *J Clin Virol*. 2013;58(1):41–6.
- Silva FG, Silva SJS, Rocco IM, Silveira VR, Suzuki A, Katz G, et al. Evaluation of commercial kits for detecting the antigen NS1-dengue- São Paulo. *Bepa*. 2011;8(9):14–26.
- Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy. The STARD initiative. *Am J Clin Pathol*. 2003;119(1):18–22.
- Daumas RP, Brasil P, Bressan CS, Oliveira RV, Carvalho BB, Carneiro DV, et al. Interobserver agreement on signs and symptoms of patients with acute febrile illness. *Infection*. 2011;39(2):135–40.
- Gutierrez G, Gresh L, Perez MA, Elizondo D, Aviles W, Kuan G, et al. Evaluation of the diagnostic utility of the traditional and revised WHO dengue case definitions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8), e2385.
- Failace R. Hemograma: manual de interpretação. 5th ed. Artmed: Porto Alegre; 2009.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(3):545–51.
- Setiati TE, Mairuhu AT, Koraka P, Supriatna M, Mac Gillavry MR, Brandjes DP, et al. Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. *BMC Infect Dis*. 2007;7:22.
- Lauritsen JM, Bruus M. EpiData 3ed. A comprehensive tool for validated entry and documentation of data. Odense, Denmark: The EpiData Association; 2003.
- Gregory CJ, Lorenzi OD, Colon L, Garcia AS, Santiago LM, Rivera RC, et al. Utility of the tourniquet test and the white blood cell count to differentiate dengue among acute febrile illnesses in the emergency room. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(12), e1400.
- Macedo GA, Gonin ML, Pone SM, Cruz OG, Nobre FF, Brasil P. Sensitivity and specificity of the World Health Organization dengue classification schemes for severe dengue assessment in children in Rio de Janeiro. *PLoS One*. 2014;9(4), e96314.

33. Horstick O, Jaenisch T, Martinez E, Kroeger A, See LL, Farrar J, et al. Comparing the usefulness of the 1997 and 2009 WHO dengue case classification: a systematic literature review. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(3):621–34.
34. Huang SY, Lee IK, Wang L, Liu JW, Hung SC, Chen CC, et al. Use of simple clinical and laboratory predictors to differentiate influenza from dengue and other febrile illnesses in the emergency room. *BMC Infect Dis.* 2014;14:623.
35. Low JG, Ooi EE, Tolfvenstam T, Leo YS, Hibberd ML, Ng LC, et al. Early Dengue infection and outcome study (EDEN) - study design and preliminary findings. *Ann Acad Med Singapore.* 2006;35(11):783–9.
36. Gan VC, Lye DC, Thein TL, Dimatatac F, Tan AS, Leo YS. Implications of discordance in world health organization 1997 and 2009 dengue classifications in adult dengue. *PLoS One.* 2013;8(4), e60946.
37. Conroy AL, Gelvez M, Hawkes M, Rajwans N, Liles WC, Villar-Centeno LA, et al. Host biomarkers distinguish dengue from leptospirosis in Colombia: a case-control study. *BMC Infect Dis.* 2014;14:35.
38. Leo YS, Gan VC, Ng EL, Hao Y, Ng LC, Pok KY, et al. Utility of warning signs in guiding admission and predicting severe disease in adult dengue. *BMC Infect Dis.* 2013;13:498.
39. Paranavitane SA, Gomes L, Kamaladasa A, Adikari TN, Wickramasinghe N, Jeewandara C, et al. Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. *BMC Infect Dis.* 2014;14:570.
40. Tan LK, Lye DC, Pok KY, Mok SQ, Chua RC, et al. Diagnosing dengue at the point-of-care: utility of a rapid combined diagnostic kit in Singapore. *PLoS One.* 2014;9(3), e90037.
41. Colombo TE, Vedovello D, Araki CS, Cogo-Moreira H, dos Santos IN, Reis AF, et al. Dengue-4 false negative results by Panbio® Dengue Early ELISA assay in Brazil. *J Clin Virol.* 2013;58(4):710–2.
42. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Suppl):S30–8.
43. Blacksell SD. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: recent evaluations and future needs? *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:151967.
44. Lima MR, Nogueira RM, Filippis AM, Nunes PC, Sousa CS, Silva MH, et al. A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. *J Virol Methods.* 2014;204:105–8.
45. Nujum ZT, Thomas A, Vijayakumar K, Nair RR, Pillai MR, Indu PS, et al. Comparative performance of the probable case definitions of dengue by WHO (2009) and the WHO-SEAR expert group (2011). *Pathog Glob Health.* 2014;108(2):103–10.
46. Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, Patil J, Salunke A, Parashar D, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. *Arch Virol.* 2015;160(1):323–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5- MANUSCRITO 2 – “Interobserver agreement of signs and symptoms during a dengue epidemic in Rio de Janeiro.”

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo específico:

- Objetivo Específico 3: Avaliar a concordância interobservador quanto aos sinais e sintomas de pacientes com suspeita de dengue durante a epidemia de DENV-4 ocorrida no Rio de Janeiro em 2013.

Situação do Manuscrito: Envio ao revisor de língua inglesa em data próxima.

Períódico pretendido: Translational Research, The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.

Medicina I Qualis Capes 2012: A2

Autoria: Sibelle Nogueira Buonora, Sonia Regina Lambert Passos, Regina Paiva Daumas, Levy Vilas Boas Fukuoka; Diana Neves Rodrigues de Oliveira; Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira

Título: Interobserver agreement of signs and symptoms during a dengue epidemic in Rio de Janeiro.

Keywords: reproducibility of results; nurse clinicians; history-taking methods; dengue; fever; variability; signs and symptoms.

ABSTRACT

Patients infected with dengue have a wide spectrum of clinical manifestations. In Brazil primary care practitioners formulate dengue diagnosis based solely on clinical criteria. Medical-history taking agreement is prerequisite for validity and data collection instruments have been developed to aid the specific clinical diagnosis based solely in medical-history taking, physical examination and clinical criteria. Since nurses play an important role in the triage and care of all dengue patients, we compared and evaluated the interobserver agreement among nurses and physician for clinical signs and symptoms.

We performed a cross-sectional diagnostic accuracy study during the 2013 Rio de Janeiro dengue outbreak at an outpatient unit including 346 (44% dengue-4) adult patients with a fever history for the last 72 hours without evident infectious source. A standardized questionnaire was used and the interobserver agreement was estimated by the Kappa statistics.

We assessed 27 signs and symptoms. Four almost perfect agreement signs (patient noticed red eyes, cough, diarrhea and vomiting) were found and one symptom (earache) and six discrepancies: examiner noted red eyes, lethargy, exanthema, dyspnea, bleeding and myalgia. Evaluating the 1997 and 2009 World Health Organization dengue clinical criteria we found a moderate Kappa index (0.49; 0.18-0.79), for the eldest criteria and a more stable substantial index (0.78; 0.69-0.87) for the 2009 criteria.

The signs and symptoms that presented almost perfect to substantial agreement: coryza, sore throat and cough except dyspnea. In the present study the Kappa index of patient's perception of red eyes varied from substantial to almost perfect and exanthema's Kappa index varied from regular to substantial,

but the health professional's red eye perception remained among the discrete and regular limits.

When applied during a dengue outbreak by healthcare workers with different backgrounds (nurses and senior physicians), the agreement among the majority of the signs and symptoms used to evaluate acute febrile illnesses was substantial, suggesting its applicability after extensive training. The accuracy of these signs and symptoms among other professionals other than physicians, could be investigated in settings with other acute febrile illnesses such as Zika and Chikungunya by using this tool.

INTRODUCTION

Dengue, an acute systemic mosquito-borne flaviviral disease is the most rapidly spreading viral disease in the world [WHO, 2009]. It is endemic in many tropical and subtropical areas and has established itself globally in both endemic and epidemic transmission cycles [Bhatt, 2013]. Patients infected with dengue have a wide spectrum of clinical manifestation ranging from silent infections with no symptoms to a mild flu-like syndrome, dengue fever, or severe dengue disease including dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome [Zhang, 2014], [WHO, 2009]. Recent estimates account that globally there are 390 million dengue infections per year of which 96 million present some kind of symptom [Bhatt, 2013].

In the majority of the countries where dengue is endemic, including Brazil, the access to laboratory facilities during the outbreaks is limited. Primary care practitioners formulate dengue diagnosis based solely on clinical criteria [Brasil, 2011]. Although these clinical criteria do not allow the early identification of potentially severe cases, they can indicate the need of laboratory tests to promptly begin specific treatment, in order to establish adequate, effective and timely care avoiding severe cases and high mortality rates [Low, 2011].

The medical-history taking agreement defined by the examiner's ability to measure the parameter in a reproducible and consistent manner is prerequisite for validity [Streiner, 1995]. Quite common in rheumatologic subsets [Peat, 2003], [Chiari, 2011], [Gossec, 2013], data collection instruments have been developed

and evaluated to aid the specific clinical diagnosis based solely in medical-history taking, physical examination and clinical criteria. However, in acute febrile diseases the methodology has been explored in pediatric febrile cases [Abdulkadir, 2014], but in dengue the issue has been less addressed [Juarez, 2005], [Jayaratne, 2012], [Lee, 2012]. In 2011, Daumas *et al.*, validated a semi-structured questionnaire and its procedure manual standardizing the clinical approach to acute febrile illnesses (AFI) including dengue cases. The authors found substantial agreement for the majority of the signs and symptoms suggesting that the standardized instrument may be helpful in evaluating AFI [Daumas, 2011].

Nurses play an important role in the triage and care of all dengue patients [Barniol, 2011]. At Rio de Janeiro State the Early Response Units (Unidade de Pronto-Atendimento - UPA 24H) are the most adequate scenario to evaluate a structured instrument for early identification of a suspected dengue case. In these units the nurse is responsible for all primary evaluations including suspected dengue patients. We therefore believe that nurses should be part of the questionnaire's validity.

In this study we compared and evaluated the interobserver agreement for clinical signs and symptoms which also comprise the World Health Organization (WHO) dengue diagnostic algorithm; specially comparing the interobserver agreement for signs and symptoms among nurses and physician.

METHODS

We performed a cross-sectional diagnostic accuracy study during April and May 2013 dengue outbreak at an outpatient unit (UPA 24H) in the city of Rio de Janeiro according to the Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy (STARD) guidelines [Bossuyt, 2015].

Patient eligibility and selection criteria

We included patients aged above 18 years old of both genders that presented to the clinic spontaneously with fever or a history of fever for the last 72

hours without any evident infectious source. We excluded all pediatric patients and those with an evident source of infection. At the outpatient unit, the patients were treated despite the research.

The calculated minimum sample size was of 320 dengue suspected patients as necessary to estimate, with 95% confidence level, a sensitivity of 85% with an absolute error of 6%. The observations were performed independently by physicians and nurses and were masked for each other's results.

Questionnaire

We tested a summarized version of the previously validated semi-structured sign and symptom acute febrile illness standardized questionnaire [Daumas, 2011]. There was a procedure manual and the research team was extensively trained about the question formulation and the form tabulation methods.

The questionnaire comprised 17 dichotomous (present/absent) questions about the comorbidities, habits and routines; other 45 dichotomous questions were performed concerning symptoms presented from the beginning of the disease until the medical consultation (attachment 1).

Data collection, processing and analysis

Each patient was assessed by two researchers which comprised one of the two trained nurses and an intern (sixth year medical student) or a senior infectious disease physician. The trained nurse obtained the informed consent and prospectively enrolled the patients during business hours five days a week. After the first questionnaire application, the patients waited approximately 10 minutes for the second application by the intern or the physician in a separate room at the outpatient unit.

Dengue diagnostics

Serum samples of all eligible patients were obtained and sent to the Flavivirus Laboratory, a regional reference laboratory for dengue and yellow fever at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) where they were frozen at -70 °C until dengue specific laboratorial tests as of Panbio[®] dengue IgM Capture ELISA,

Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA and reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR), were performed.

Statistical analysis

Data were collected in a specific form and entered in the Epi Data® 3.1 software [Lauritsen, 2004]. Statistical analyses were performed in MedCalc®, SPSS® v16 and WinPepi softwares [MedCalc, 2015], [Abramson, 2011].

The descriptive analysis was performed using simple frequency where the mean prevalence was the mean among the nurse's and the physician's positive observations.

The interobserver agreement among the observers was estimated by the Kappa statistics, which corrects for chance agreement [Cohen, 1968]. All signs and symptoms were dichotomous and simple Kappa (k) values were calculated considering 95% confidence intervals and a null hypothesis of $k < 80\%$, 5% alpha and 10% beta errors. Kappa values were interpreted according to Landis and Koch proposals of poor agreement if $k < 0.0$; discrete if $0.0 \leq k < 0.2$; regular if $0.2 \leq k < 0.4$, moderate if $0.4 \leq k < 0.6$, substantial if $0.6 \leq k < 0.8$; almost perfect if $0.8 \leq k < 1.0$ and perfect if $k = 1$ [Landis, 1977]. We also obtained the corrected Kappa for bias and prevalence using Prevalence-Adjusted Bias-Adjusted Kappa (PABAK), proportions of positive (P_{pos}) and negative agreement (P_{neg}) [Cicchetti, 1990].

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases - FIOCRUZ, CAAE 0066.0.009.000-11, on March 23, 2012. All patients agreed and signed an informed consent.

RESULTS

The study enrolled 374 patients. Twenty-eight were excluded previously to the data analysis: 26 patients did not have a paired evaluation and 2 were sick for more than 72 hours. This study assessed 346 patients, of these 56% were female, 3 were pregnant. The median age was 34 years (18-83). The median time elapsed between the reported fever onset and the medical visit was 2 days.

Most of the patients, 89%, were evaluated by a nurse-infectious disease physician pair and the remaining 11% by the nurse-intern pair.

We obtained 180 dengue confirmed cases. The majority, 152 cases, were identified by RT-PCR, where serotype 4 was predominant (148 cases- 82.3%) with serotype 1 and 3 occurring in 2 cases each. In 28 patients (15.5%) the serotype was not identified and the diagnosis was based on Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA or IgM positivity.

We also analyzed the signs and symptoms interobserver agreement among dengue and non-dengue patients, but since there was low agreement variability in the results compared to the entire study population they were not presented. The interobserver agreement of signs and symptoms are exposed in tables 1 and 2.

Table 1: Mean prevalence, simple kappa, PABAK, proportions of positive and negative agreements of the signs assessed in the 346 interobserver agreement population, Rio de Janeiro, 2013.

Sign	MP (%)	Kappa (95% CI)	PABAK	P_{pos} (%)	P_{neg} (%)
Measured fever at home	49	0.71 (0.63 - 0.78)	0.71	85.3	95.4
Patient noticed red eyes	46	0.80 (0.71 - 0.88)	0.80	89.0	90.5
Cough	40	0.84 (0.78 - 0.90)	0.85	90.4	93.7
Examiner noticed red eyes	36	0.28 (0.17 - 0.39)	0.29	52.7	71.3
Diarrhea	34	0.88 (0.83 - 0.94)	0.90	92.4	96.0
Coryza	32	0.74 (0.66 - 0.82)	0.77	82.5	91.4
Hoarseness	30	0.67 (0.58 - 0.76)	0.72	77.2	89.8
Vomiting	26	0.90 (0.84 - 0.95)	0.92	92.3	97.2
Bleeding	15	0.51 (0.38 - 0.63)	0.74	57.7	92.4
Exanthema	10	0.52 (0.36 - 0.64)	0.82	55.9	95.0

MP= mean prevalence; CI= confidence interval; PABAK= Prevalence-Adjusted Bias-Adjusted Kappa; P_{pos} = positive proportions; P_{neg} = negative proportions; OR= odds ratio

We assessed 13 clinical signs, however faints, jaundice and seizures were not evaluated since their frequency was below 5%. The remaining 10 signs

presented a wide range of Kappa indexes. Almost perfect values were obtained in cough, diarrhea and vomiting. Patient's perception of red eyes varied from substantial to almost perfect, but the researcher's perception of red eyes obtained Kappa remaining among the discrete and regular limits. Regular Kappa index occurred in exanthema and bleeding, but their lower 95% confidence interval (95% CI) limits reached discrete levels. The most common reported bleeding events were epistaxis, gum bleeding and hemoptysis.

Table 2: Mean prevalence, simple kappa, PABAK, proportions of positive and negative agreements of the symptoms assessed in the 346 interobserver agreement population, Rio de Janeiro, 2013.

Symptom	MP (%)	Kappa (95% CI)	PABAK	P_{pos} (%)	P_{neg} (%)
Lethargy	96	0.29 (0.05 - 0.54)	0.90	97.4	32.0
Headache	94	0.66 (0.49 - 0.83)	0.92	98.0	68.3
Myalgia	92	0.40 (0.22 - 0.57)	0.82	95.2	44.4
Chills	88	0.63 (0.49 - 0.74)	0.84	95.4	67.5
Anorexia	83	0.61 (0.49 - 0.72)	0.78	93.5	67.3
Lumbar pain	81	0.66 (0.56 - 0.76)	0.79	93.6	72.4
Taste changes	75	0.66 (0.57 - 0.76)	0.75	91.6	74.7
Arthralgia	73	0.76 (0.68 - 0.84)	0.81	93.6	82.6
Dizziness	69	0.70 (0.62 - 0.78)	0.74	90.8	79.2
Photophobia	64	0.78 (0.71 - 0.85)	0.80	92.2	86.1
Nausea	63	0.69 (0.61 - 0.77)	0.71	88.5	80.3
Retro-orbital pain	72	0.76 (0.68 - 0.84)	0.81	93.4	82.4
Abdominal pain	45	0.77 (0.69 - 0.84)	0.77	87.4	89.5
Dyspnea	43	0.46 (0.37 - 0.55)	0.45	67.9	76.2
Sore throat	24	0.70 (0.61 - 0.79)	0.78	76.8	92.7
Earache	16	0.83 (0.75 - 0.91)	0.91	86.0	97.2

Itching	16	0.79 (0.70 - 0.88)	0.89	82.2	96.7
---------	----	-----------------------	------	------	------

MP= mean prevalence; CI= confidence interval; PABAK= Prevalence-Adjusted Bias-Adjusted Kappa; P_{pos} = positive proportions; P_{neg} = negative proportions; OR= odds ratio

Earache was the only symptom that reached almost perfect Kappa. Abdominal pain, arthralgia, photophobia, nausea, retro-orbital pain, sore throat, dizziness and itching reached Kappa index and its respective confidence interval (95% CI) in the substantial category. Substantial Kappa index with moderate inferior limit by the 95% CI were: anorexia, taste changes, chills, headache and lumbar pain. Moderate varying to regular Kappa indexes occurred in dyspnea and myalgia. The latter presented even worse kappa values in non-dengue patients. Lethargy presented regular Kappa with its lower 95% CI in the discrete category.

When analyzing other agreement rates, low P_{pos} occurred in bleeding, earache, exanthema, itching and sore throat and the examiner's perception of red eyes. Low P_{neg} values were mostly observed in the symptoms group namely anorexia, chills, dizziness, headache, lethargy, lumbar pain, myalgia and taste changes.

When combining the signs and symptoms that fulfill the 1997 and 2009 WHO dengue clinical criteria we found a moderate varying from discrete to substantial Kappa index (0.49; 0.18-0.79), for the eldest criteria and a more stable 2009 WHO dengue criteria with a substantial varying to almost perfect kappa index (0.78; 0.69-0.87).

The 2009 WHO clinical criteria is composed by a group of symptoms called aches and pains [WHO, 2009]. Among these, arthralgia and retro-orbital pain presented better reproducibility with Kappa index varying from substantial to almost perfect. Headache was substantial but its lower 95% CI reached moderate levels. Myalgia was the worst of all the symptoms that compose the aches and pains criteria since Kappa was regular with its lower 95% CI range in the discrete category. However, when we group the entire aches and pains components, all 346 patients fulfilled this criterion independently if they had dengue or not.

DISCUSSION

In our study among 27 signs and symptoms we found six interobserver discrepancies identified by regular and moderate Kappa indexes - examiner noted red eyes, lethargy, exanthema, dyspnea, bleeding and myalgia. These results enlightens that a well-trained nurse can use the standardized questionnaire to evaluate suspected dengue cases. In contrast, when evaluating HIV patients Holzemer et al. identified that nurses' ratings showed a consistent underestimation of frequency and intensity of the signs and symptoms experienced by patients with HIV disease [Holzemer, 1999].

Leo *et al.* excluded lethargy from their dengue cohort analysis arguing to the patient's difficulty in differentiating lethargy from tiredness [Leo, 2013]. Thein et al. also excluded the symptom to improve the specificity in severe dengue cases [Thein, 2013]. The moderate agreement of exanthema (kappa= 0.52; 0.36-0.64) found in our study opposed to other published studies [Daumas, 2011], [Passos, 2008] possibly occurred due to the early (2 days) disease assessment in our study.

Daumas *et al.* evaluated the interobserver agreement of AFI signs and symptoms comparing patient evaluations made at the same time among interns and physicians and found high agreement indexes [Daumas, 2011]. Our study, on the other hand, formulated interobserver agreement indexes among nurses and physicians that evaluated the patient individually at different moments and we found only four almost perfect agreement signs (patient noticed red eyes, cough, diarrhea and vomiting) and one symptom (earache). This probably occurred since symptoms are subjective experiences while signs are detectable by the patient or another person; heterogeneous pairs concerning professional background (nurse vs physician); and also because the history-taking in this study occurred twice in different moments each [UCSF, 1994].

The low reliability of bleeding signs in our study could be partially explained due to the prevalence of upper respiratory tract bleeding that could be confounded with periodontal diseases such as periodontitis not attributed to low platelet values. This low precision diagnostic criteria (bleeding) if associated to melena and

hematemesis becomes worrisome since Zhang *et al.*, for example, recommends that all patients with bleeding events should be monitored considering a 14-fold increased risk for disease progression [Zhang, 2014].

Signs and symptoms cited by Huang *et al.* suggesting other febrile illnesses as found in influenza presented almost perfect to substantial agreement: coryza, sore throat and cough except dyspnea [Huang,2014].

The WHO 2009 dengue clinical criteria has aches and pains as screening criteria for dengue diagnosis [WHO, 2009]. In our study, the WHO 2009 agreement was substantial, probably because it included arthralgia or orbital pain, since headache, lumbar pain and myalgia presented lower kappa indexes. We did not find a study that evaluated the agreement of this important dengue clinical criteria. The high sensitivity and very low specificity of the WHO 1997 and 2009 clinical criteria have already been addressed by our group [Buonora, 2016].

The Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation (INI-Fiocruz) clinical criteria comprises the patient's red eye identification and history of rash and reached a 71.3% sensitivity and a 71.5% specificity when evaluating early dengue cases [Daumas, 2013], [Buonora, 2016]. Conroy *et al.*, considered that conjunctival injection was more common in patients with dengue compared to those with leptospirosis, despite not statistically significant [Conroy, 2014]. In the present study the Kappa index of patient's perception of red eyes varied from substantial to almost perfect and exanthema's Kappa index varied from regular to substantial, but the health professional's red eye perception remained among the discrete and regular limits.

This study has advantages since it was prospectively executed restricting our study to one dengue outbreak we could evaluate the early clinical presentations of mainly dengue serotype-4, we were able to demonstrate the applicability of a structured questionnaire evaluate acute dengue cases in a multiprofessional manner to. However, there are some limitations: we did not evaluate physical (warning signs) and laboratory exams of WHO 1997 and 2009 dengue clinical criteria [WHO, 1997], [WHO, 2009]. However, due to the early phase of the disease assessment, until 72 hours, the probability of encountering warning signs was low [Leo, 2013]. Generalizability of clinical presentation to

settings with other co-circulations is not possible because we only evaluated dengue serotype-4. Since we aimed to study acute dengue signs and symptoms we did not assess severe dengue cases in the study population due to lack of follow up.

When applied during a dengue outbreak by healthcare workers with different backgrounds (nurses and senior physicians), the agreement among the majority of the signs and symptoms used to evaluate AFI was substantial, suggesting its applicability after extensive training. The accuracy of these signs and symptoms among other professionals other than physicians, could be investigated in settings with other acute febrile illnesses such as Zika and Chikungunya by using this tool.

REFERENCES

- Abdulkadir MB, Johnson WB, Ibraheem RM. Validity and accuracy of maternal tactile assessment for fever in under-five children in north central Nigeria: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2014 Oct 10;4(10):e005776.
- Abramson, J.H. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* 2011, 8:1
- Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martinez E, et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis*. 2011;11:106.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):504-7.
- Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*. 2015 Oct 28;351:h5527.
- Brasil. Dengue: Diagnóstico e manejo clínico. Adulto e criança. 4 ed. Saude Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
- Buonora SN, Passos SR, do Carmo CN, Quintela FM, de Oliveira DN, dos Santos FB, et al. Accuracy of clinical criteria and an immunochromatographic strip test for dengue diagnosis in a DENV-4 epidemic. *BMC Infect Dis*. 2016 Jan 29;16(1):37.
- Chiari A, Sardim CC, Natour J. Translation, cultural adaptation and reproducibility of the Cochin Hand Functional Scale questionnaire for Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(5):731-6.

Cicchetti DV, Feinstein AR. High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes. *J Clin Epidemiol*. 1990;43(6):551-8.

Cohen J. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull* 1968;70(4):213-20.

Conroy AL, Gelvez M, Hawkes M, Rajwans N, Liles WC, Villar-Centeno LA, et al. Host biomarkers distinguish dengue from leptospirosis in Colombia: a case-control study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:35.

Daumas RP, Brasil P, Bressan CS, Oliveira RV, Carvalho BB, Carneiro DV, et al. Interobserver agreement on signs and symptoms of patients with acute febrile illness. *Infection*. 2011 Apr;39(2):135-40.

Daumas RP, Passos SR, Oliveira RV, Nogueira RM, Georg I, Marzochi KB, et al. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: a diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2013 Feb 8;13:77.

Gossec L, Fautrel B, Flipon É, Lecoq d'André F, Marguerie L, Nataf Het al. Safety of biologics: elaboration and validation of a questionnaire assessing patients' self-care safety skills: the BioSecure questionnaire. An initiative of the French Rheumatology Society Therapeutic Education section. *Joint Bone Spine*. 2013 Oct;80(5):471-6.

Holzemer WL, Henry SB, Nokes KM, Corless IB, Brown MA, Powell-Cope GM, et al. Validation of the Sign and Symptom Check-List for Persons with HIV Disease (SSC-HIV). *J Adv Nurs*. 1999 Nov;30(5):1041-9.

Huang SY, Lee IK, Wang L, Liu JW, Hung SC, Chen CC, et al. Use of simple clinical and laboratory predictors to differentiate influenza from dengue and other febrile illnesses in the emergency room. *BMC Infect Dis*. 2014;14:623.

Jayaratne SD, Atukorale V, Gomes L, Chang T, Wijesinghe T, Fernando S, et al. Evaluation of the WHO revised criteria for classification of clinical disease severity in acute adult dengue infection. *BMC Res Notes*. 2012 Nov 20;5:645.

Juarez, J, Soto P, Bernuy G, Alejo E, Valdivia M, Cosser J, et al. Evaluación de la definición de caso probable de dengue clásico durante el brote de dengue en Lima, 2005. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22(3), 2005: 205-211.

Landis JR and G.G. Koch. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.

Lauritsen JM, Bruus M. EpiData 3ed. Odense, Denmark: The EpiData Association; 2003 p. A comprehensive tool for validated entry and documentation of data.

Lee VJ, Chow A, Zheng X, Carrasco LR, Cook AR, Lye DC, Ng LC, Leo YS. Simple clinical and laboratory predictors of Chikungunya versus dengue infections in adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):e1786

Leo YS, Gan VC, Ng EL, Hao Y, Ng LC, Pok KY, et al. Utility of warning signs in guiding admission and predicting severe disease in adult dengue. *BMC Infect Dis*. 2013;13:498.

Low JG, Ong A, Tan LK, Chaterji S, Chow A, Lim WY, et al. The early clinical features of dengue in adults: challenges for early clinical diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):e1191.

Low JG, Ooi EE, Tolfvenstam T, Leo YS, Hibberd ML, Ng LC, et al. Early Dengue infection and outcome study (EDEN) - study design and preliminary findings. *Ann Acad Med Singapore*. 2006 Nov;35(11):783-9.

MedCalc Statistical Software version 15.8 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2015).

Passos SR, Bedoya SJ, Hökerberg YH, Maia SC, Georg I, Nogueira RM, et al. Clinical and laboratory signs as dengue markers during an outbreak in Rio de Janeiro. *Infection*. 2008 Dec;36(6):570-4.

Peat G, Wood L, Wilkie R, Thomas E; KNE-SCI Study Group. How reliable is structured clinical history-taking in older adults with knee problems? Inter- and intraobserver variability of the KNE-SCI. *J Clin Epidemiol*. 2003 Nov;56(11):1030-7.

Streiner DL, Norman GR. Health measurement scales: A practical guide to their development and use. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 1995.

Thein TL, Gan VC, Lye DC, Yung CF, Leo YS. Utilities and limitations of the World Health Organization 2009 warning signs for adult dengue severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2023.

UCSF. University of California San Francisco School of Nursing Symptom Management Faculty Group. A model for symptom management. *Image: Journal of Nursing Scholarship*. 1994; 26, 272-276.

World Health Organization. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control Geneva: WHO; 1997. http://www.who.int/neglected_diseases/en/. Accessed in 15 Nov 2014.

WHO. Dengue: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva; 2009 http://www.who.int/neglected_diseases/en/. Accessed in 15 Jan 2015

Wichmann O, Stark K, Shu PY, Niedrig M, Frank C, Huang JH, et al. Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMC Infect Dis*. 2006;6:120.

Zhang H, Li Z, Lai S, Clements AC, Wang L, Yin W, et al. Evaluation of the performance of a dengue outbreak detection tool for China. *PLoS One*. 2014 Aug 29;9(8):e106144.

FUNDING: CNPq de edital PROEP Pesquisa Clínica 402068/2012-2 and REBRATS 06/2013 (Rede Brasileira de Avaliação de Tecnologias em Saúde) 401366/2013-8. SRLP receives a CNPq productivity scholarship.

Attachment 1



Acute Febrile Syndrome Query- UPA		
Code	Gender 1 () M 2 () F	Enrollment date ____/____/____
Birth date ____/____/____	Observer 1 () Physician 3 () Nurse 2 2 () Nurse 1 4 () Intern	
Comorbidities		
Pregnant 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Diabetes Mellitus 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	COPD 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored
Asthma 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Rhinitis 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Smoker 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored
Hypertension 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Sickle cell disease 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Alcohol abuse 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored
Other disease? 1 () Yes 2 () No	Which?	Drug abuse 1 () Yes Which? 2 () No
Uses chronic medication? 1 () Yes 2 () No	Which?	
Immunosuppressive disease? 1 () Yes 2 () No	Which?	Immunosuppressive drugs? 1 () Yes 2 () No
Clinical information		
Main complaint		
Fever 1 () Yes 2 () No	Measured? 1 () Yes 2 () No	Date fever began ____/____/____
Noticed red eyes? 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Chills 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Headache 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored
Photophobia 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Retro orbital pain 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored	Oropharyngeal pain 1 () Yes 2 () No 3 () Ignored

Hoarseness 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Taste changes 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Earache 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Coryza 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Prostration 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Mialgia 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Lombalgia 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Arthralgia 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Anorexia 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Nauseas 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Vomits 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Abdominal pain 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Dyspnea 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Cough 1() Yes 2() No	Non-productive 1() Yes 2() No	Productive cough 1() Yes 2() No
Diarrhea 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Liquid 1() Yes 2() No	Pasty 1() Yes 2() No	Number
Hemorrhage 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Conjunctival 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Epistaxis 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Gum bleeding 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Petechial 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Methrorragy 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Hematuria 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Bloody vomit 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Melena 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Hemoptoic 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Dizziness 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Faints 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Exanthema 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Jaundice 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Itching 1() Yes 2() No 3 () Ignored	
Convulsion 1() Yes 2() No 3 () Ignored	Did you notice the patient's red eyes? 1() Yes 2() No 3 () Ignored		

6. MANUSCRITO 3 – “Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute Dengue-4”

Os resultados apresentados neste manuscrito se referem ao seguinte objetivo específico:

- Objetivo Específico 2: Avaliar a acurácia diagnóstica do teste NS1 Bioeasy[®] imunocromatográfico e do ELISA NS1 com e sem dissociação térmica para o diagnóstico de DENV-4

Situação do Manuscrito: submetido como comunicação breve

Periódico submetido: Journal of Virological Methods

Medicina I Qualis Capes 2012: B1

Autoria: Sibelle Nogueira Buonora, Flavia Barreto dos Santos, Regina Paiva Daumas, Sonia Regina Lambert Passos, Manoela Heringer da Silva, Monique Rocha de Lima

Manuscript details

Manuscript number	VIRMET_2016_74
Title	Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute Dengue 4 cases
Article type	Short Communication
Abstract	<p>Dengue is an acute febrile illness considered the major arboviral disease in terms of morbidity, mortality, economic impact and dissemination worldwide. Brazil accounts for the highest notification rate, with circulation of all four dengue serotypes. NS1 Ag is a dengue highly conserved specific soluble glycoprotein essential for viral replication and viability that can be detected 0 to 18 days from the onset of fever (peak first 3 days). It induces a strong humoral response and is known as a complement-fixing antigen. Lower NS1 test sensitivity occurs in secondary dengue infections probably due to immune complex formation impairing antigen detection by ELISA. We compared the sensitivity of NS1 ELISA in heat dissociated and non-dissociated samples from 155 PCR confirmed acute DENV-4 cases from 362 prospectively enrolled patients. Secondary infections accounted for 83.3% of cases. NS1 ELISA was positive in 42.5% and indeterminate in 10.3% of DENV-4 cases. After heat dissociation, 24 negative and 16 indeterminate samples turned positive, increasing the overall test sensitivity to</p>

57.4%. Although it is time consuming and requires the use of specific laboratory equipment, NS1 ELISA combined with heat dissociation could be a slightly better alternative for triage in suspected dengue cases.

Keywords	Dengue diagnosis; NS1 Elisa; Accuracy; Immune-complex dissociation; DENV-4
Corresponding Author	Sibelle Buonora
Corresponding Author's Institution	Fiocruz
Order of Authors	Sibelle Buonora, Flavia Santos, Regina Daumas, Sonia Passos, Manoela Silva, Monique de Lima
Suggested reviewers	Rivaldo Cunha

Submission files included in this PDF

File Type	File Name
Cover Letter	Cover letter J Virol Meth v2.docx
Manuscript File	Submission 021116 .doc

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

45Dengue is an acute febrile illness considered the major worldwide arboviral disease, in
46terms of morbidity, mortality, economic impact and dissemination [WHO, 2009].
47Dengue occurs in all non-polar continents [Simmons, 2012] and is an important public
48health concern in tropical and subtropical regions mainly in Asia and Americas [Gubler,
491998] [Schatzmayr, 2000]. Estimates account for 390 million dengue infections per year
50of which 96 million present clinical manifestations [Bhatt, 2013]. The disease is
51endemic in 100 countries and approximately 40% of the world population is at risk of
52dengue infection [WHO, 2009]. By the end of the 20th century, Brazil became the
53country with the highest notification rate, accounting for 98.5% of the American
54continent's reported cases and the highest fatality rate in the sub region [WHO, 2009].
55Since 2008, all four dengue serotypes (DENV-1 to DENV-4) can be found in the
56country [Messina, 2014].

57

58NS1 Ag is a dengue highly conserved specific soluble glycoprotein essential for viral
59replication and viability that can be detected in dengue patients from day 1 up to 18
60days after fever onset [Xu, 2006] with a peak sensitivity in the first 3 days of fever onset
61[Duong, 2011]. It induces a strong humoral response and is known as a complement-
62fixing antigen [Lima et al, 2014].

63

64Previous studies have evaluated the usefulness and the accuracy NS1 tests [Lima, 2010]
65[Lima, 2011][da Costa, 2014] [Pal, 2014] [Sea, 2013]. According to da Costa et al. the
66main factors influencing the diagnostic accuracy are the type of infection (primary
67versus secondary), viral serotype, geographical origins of samples, and the timing of
68sample collection [da Costa, 2014].

69

70Low NS1 test sensitivity in secondary dengue infections may be attributed to high levels
71of IgG in anamnestic response with immune complex formation impairing antigen
72detection by ELISA [Koraka, 2003] [Lima, 2014]. Some studies have also noticed lower
73NS1 sensitivity in DENV-4 compared to other serotypes, in both primary and secondary
74dengue [Pal, 2014] [da Costa, 2014]. Furthermore, immune complexes dissociation
75techniques have proven to be important for the early diagnosis of several viruses,
76including DENV. A study conducted in Rio de Janeiro with DENV-4 cases analyzed
77acid treatment/neutralization and heat dissociation, with a better performance for the
78latter [Lima, 2014]. In the present study, we compared the sensitivity of NS1 ELISA in
79heat dissociated and non-dissociated samples from acute DENV-4 patients.

80

81This study is part of a prospective cross-sectional pragmatic diagnostic study of clinical
82and diagnostic algorithms for dengue diagnosis conducted at Rio de Janeiro, Brazil
83during the 2013 dengue epidemic season (March and April). We used the Standards for
84Reporting of Diagnostic Accuracy Study (STARD) Guideline [Bossuyt, 2003] and the
85Research Ethics Committee of the National Institute of Infectious Diseases Evandro
86Chagas – Fiocruz approved the study. All patients signed an informed consent form.
87Eligible adult patients who presented to a public outpatient unit (Unidade de Pronto
88Atendimento-UPA 24H) within 72 hours of a febrile illness without an evident source
89of infection were interviewed and examined by the investigators.

90

91Blood samples were collected and sera stored at -70 °C until the tests. The index test
92(Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA), specific IgG and confirmatory RT-PCR were all

93performed at the Flavivirus Regional Reference Laboratory, IOC, FIOCRUZ. The
94Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France)
95was performed in all samples according to the manufacturer's instructions and described
96elsewhere [Lima, 2010]. The same samples were further submitted to the heat
97dissociation method when 50µL of the serum was added to 100 µL of RNA/DNAse free
98water and heated in a boiling water bath for five minutes, as described previously
99[Lima, 2014]. The Dengue Virus IgG DxSelect™ ELISA (Focus Diagnostics, California,
100USA) was performed according to the manufacturer's instructions in all samples to
101diagnose secondary dengue cases. The viral RNA detection by RT-PCR was performed
102according to the technique described elsewhere [Lanciotti, 1992]. Laboratory personnel
103were blinded to other laboratory data such as Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA, IgG
104and RT-PCR when executing a specific test. DENV infections by other serotypes were
105excluded. Exploratory analysis was performed using SPSS® v 17.0 (SPSS Inc., Chicago,
106Illinois). The MedCalc® 14.8.1 program was used to calculate 95% confidence intervals
107(CI) for the Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA sensitivity.

108

109A total of 372 ambulatory patients were enrolled, with 10 exclusions (six presenting
110symptoms for more than 3 days and four due to infections to other DENV serotypes.
111The remaining 362 patients had their clinical profile previously described [Buonora,
1122016]. Briefly, 55.6% were female, the median age was 33 years old (ranging from 18
113to 83) and the median time from the onset of illness was two days.

114The RT-PCR identified DENV-4 in 42.8% (155/362) of the cases. From those, 16.7%
115(26/155) were classified as primary infection cases and 83.3% (129/155), as secondary
116ones.

117

118The NS1 ELISA performance as described by the manufacturer's protocol in DENV-4
 119cases (n=155) resulted in 42.5% (66/155) of positive cases, 47.0% (73/155) negative
 120and 10.3% (16/155) indeterminate (Table 1). After the heat dissociation process, all 66
 121DENV-4 positive cases remained positive; 24 negative all 16 indeterminate cases
 122became positive. As previously described by Lima et al [Lima, 2014], 5 indeterminate
 123cases in the non-dissociated NS1 primary infection group also turned positive after heat
 124dissociation. These results could jeopardize the theory of IgG immune complex
 125formation; however the increase in sensitivity in those cases might occur due to an
 126increased detection of monomeric NS1 forms [Falconar, 1990].

127

128Table 1- NS1 performance in early DENV-4 patients according to type of infection and method
 129used in 155 DENV-4 patients, Rio de Janeiro, March and April 2013.

Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA	Results	Type of infection		Total N=155
		Primary N=26	Secondary N=129	
Non-dissociated	Positive	17 (65.4)*	49 (38.0)	66 (42.6)
	Negative	4 (15.3)	69 (53.5)	73 (47.1)
	Indeterminate	5 (19.2)	11 (8.5)	16 (10.3)
Heat dissociated	Positive	22 (84.6)	68 (52.8)	90 (58.0)
	Negative	4 (15.4)	61 (47.2)	65 (42.0)

130 * The numbers in parenthesis are percentages

131

132In our study, the overall sensitivity of the NS1 test in DENV-4 cases was 47.5%, quite
 133similar to the 46.6% obtained by Lima [Lima, 2014], but lower than the 58% sensitivity
 134obtained in da Costa's meta-analysis [da Costa, 2014], table 2. As previously
 135demonstrated, DENV-4 may show lower overall viremia and NS1 levels making it a
 136weaker target, lower NS1 secretion and polymorphism associated to immune epitopes

137quite frequent in South American samples such as ours [Pal, 2014] [da Costa, 2014].
 138Even attenuating the influence of secondary infections by heat dissociation, the
 139sensitivities obtained were still low. The differences in the sensitivities in primary and
 140secondary infections (80.9% vs 41.5%) were also found in da Costa's meta-analysis
 141(94.6% vs 66%) [da Costa, 2014].

142

143Table 2- Sensitivity of Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA in acute DENV-4 cases, Rio de Janeiro,
 144March and April 2013.

	Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA		Sensitivity (95% CI)	p-value
Overall sensitivity	Non-dissociated		47.5 (38.9 – 56.1)	p<0.001
	Heat dissociated		57.4 (49.2 – 65.3)	
infection Type of	Primary	Non-dissociated	80.9 (58.1 – 94.6)	p<0.001
		Heat dissociated	84.6 (65.1 – 95.6)	
	Secondary	Non-dissociated	41.5 (32.5 – 51.0)	p<0.001
		Heat dissociated	51.9 (43.0 – 60.8)	

145

146

147We demonstrated significant sensitivity increases after dissociation in both types of
 148DENV-4 infections in agreement with other studies that used unspecific dengue
 149serotype acid dissociated NS1 samples [Lapphra, 2008] [Koraka, 2003].

150

151This study has advantages since it was prospectively executed, the samples were
 152clinically and laboratorially well characterized, and collected during a single outbreak in
 153one outpatient unit increasing the chance of genotypic similarity. We were able to
 154demonstrate the advantages of incorporating heat dissociation to the Platelia™ Dengue
 155NS1 Ag-ELISA kit in order to increase its sensitivity, mostly in settings where

156 circulating DENV-4 can be an issue. The study limitation was the lack of heterogeneity
157 of viral strains that impairs the generalization of the results in other epidemic settings.

158

159 Although time expending and the requirement of specific laboratory equipment the NS1
160 ELISA combined to heat dissociation could be a slightly better alternative for accurate
161 dengue diagnosis.

162

163 **Acknowledgements**

164 This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
165 Tecnológico- CNPq through CNPq/PROEP 402068/2012-2 grant and CNPq/REBRATS
166 401366/2013 grant. SRLP is funded through CNPq 311414 / 2013-3 grant. The sponsors
167 were not involved in the design, sample collection and handling, analysis, data
168 interpretation or conclusions.

169

- 170 1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The
171 global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr
172 25;496(7446):504-7.
- 173 2. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al.
174 Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy.
175 The STARD initiative. *Am J Clin Pathol*. 2003 Jan;119(1):18-22.
- 176 3. Buonora SN, Passos SR, do Carmo CN, Quintela FM, de Oliveira DN, dos
177 Santos FB, et al. Accuracy of clinical criteria and an

- 178 immunochromatographic strip test for dengue diagnosis in a DENV-4
179 epidemic. *BMC Infect Dis.* 2016 Jan 29;16(1):37.
- 180 4. da Costa VG, Marques-Silva AC, Moreli ML. A meta-analysis of the diagnostic
181 accuracy of two commercial NS1 antigen ELISA tests for early dengue virus
182 detection. *PLoS One.* 2014 Apr 11;9(4):e94655.
- 183 5. Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeung N, et al. Clinical
184 and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture
185 assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl
186 Trop Dis.* 2011 Jul;5(7):e1244.
- 187 6. Falconar AK, Young PR. Immunoaffinity purification of native dimer forms of
188 the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *J Virol Methods.* 1990
189 Dec;30(3):323-32.
- 190 7. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current
191 status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore.* 1998
192 Mar;27(2):227-34.
- 193 8. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J,
194 et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in
195 patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol.* 2003
196 Sep;41(9):4154-9.
- 197 9. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection
198 and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse
199 transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992
200 Mar;30(3):545-51.

- 201 10. Laphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S,
202 Piriyakarnsakul W, Chakorn T, et al. Evaluation of an NS1 antigen detection
203 for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness.
204 *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Apr;60(4):387-91.
- 205 11. Lima MR, Nogueira RM, Bispo de Filippis AM, dos Santos FB. Comparison of
206 two generations of the Panbio dengue NS1 capture enzyme-linked
207 immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Jun;18(6):1031-3.
- 208 12. Lima MR, Nogueira RM, Filippis AM, Nunes PC, Sousa CS, Silva MH, et al. A
209 simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection
210 sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with
211 DENV type-4. *J Virol Methods.* 2014 Aug;204:105-8.
- 212 13. Lima MR, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three
213 commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute
214 diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):e738.
- 215 14. Lima MRQ, Santos FB, Nogueira RMR. Dengue diagnosis: commercially
216 available kits and laboratory support. *Clinical Insights: Dengue:
217 Transmission, Diagnosis & Surveillance.* 1ed. London: Future Medicine
218 Ltd., 2014, p. 27-47.
- 219 15. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et.al. Global
220 spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends
221 Microbiol.* 2014 Mar;22(3):138-46.
- 222 16. Pal S, Dauner AL, Mitra I, Forshey BM, Garcia P, Morrison AC, et.al.
223 Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical
224 samples. *PLoS One.* 2014 Nov 20;9(11):e113411.

- 225 17. Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. Mem Inst Oswaldo
226 Cruz. 2000;95 Suppl 1:179-81.
- 227 18. Sea VR, Cruz AC, Gurgel RQ, Nunes BT, Silva EV, Dolabella SS, al.
228 Underreporting of Dengue-4 in Brazil due to low sensitivity of the NS1 Ag
229 test in routine control programs. PLoS One. 2013 May 23;8(5):e64056.
- 230 19. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. N Engl J Med. 2012 Apr
231 12;366(15):1423-32.
- 232 20. WHO. Dengue: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva; 2009
233 http://www.who.int/neglected_diseases/en/. Accessed in 15 Jan 2015
- 234 21. Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, et al. Serotype 1-specific
235 monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of
236 circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and
237 serotyping of dengue virus infections. J Clin Microbiol. 2006
238 Aug;44(8):2872-8.
- 239
- 240
- 241
- 242

7. CONCLUSÕES

- Apresentamos maior acurácia no algoritmo clínico-laboratorial que combinou o critério clínico INI-FIOCRUZ com o da OMS 1997, a fim de selecionar suspeitos de dengue 4, com até 3 dias de início da doença, elegíveis para um teste NS1 rápido. Assim, os pacientes testados positivos ao NS1 rápido deveriam ser imediatamente tratados para dengue e os pacientes que testaram negativos requerem investigação subsequente.
- Apesar da alta especificidade, a baixa sensibilidade obtida no teste NS1 imunocromatográfico avaliado sugere uma lacuna importante no diagnóstico rápido de dengue 4, principalmente em áreas onde a prevalência de dengue secundária é alta.
- A concordância controlada para o acaso da sintomatologia que compõe o algoritmo clínico-laboratorial foi substancial, quando contrastado entre profissionais de formação distinta, médicos e enfermeiros, sugerindo a sua aplicabilidade após treinamento.
- O teste NS1 ELISA apresentou sensibilidade um pouco maior em dengue 4 agudo quando utilizada uma técnica de dissociação térmica comparado à técnica tradicional, tanto para dengue primário quanto secundário.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elaboração de um trabalho de campo com perfil de “ensaio pragmático” é uma tarefa difícil. Todo o processo de organização de um trabalho de campo seguindo as normas das Boas Práticas em Pesquisa Clínica como brochuras do pesquisador, livros de registro, Procedimentos Operacionais Padrão, etiquetas, precisaram ser pensados para um local puramente assistencial sem nenhuma familiaridade com Pesquisa Clínica.

Apesar de termos realizado um estudo piloto em uma Unidade de Pronto Atendimento 24H (UPA 24H) na epidemia de 2012, a intenção de abranger duas UPA com atendimento padronizado nos moldes de um ensaio científico foi recoberta de limitações. A começar pelo envolvimento de profissionais preocupados com a assistência em situação de epidemia, onde o número de atendimentos na unidade quadruplica e não é possível assegurar a acurácia da coleta e registro da anamnese e exame físico para que possam ser utilizados em um ensaio.

As atenções se voltaram então para uma UPA 24H apenas, a unidade da Tijuca, que apresentou algumas vantagens: recebe pacientes de várias partes da cidade e também de municípios vizinhos devido à facilidade de meios de transporte e do fluxo diário de trabalhadores para aquele bairro; proximidade relativa à Fiocruz, facilitando o fluxo de amostras para o Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Após a equipe ter sido treinada, a coleta foi iniciada no pico da epidemia de 2013 e suspensa quando o número de suspeitos já não ultrapassavam os três casos por dia. A impressão da equipe de campo era que todos os pacientes que entravam na UPA 24H estavam com dengue face à exuberância clínica dos sinais e sintomas. De fato, todos aqueles que apresentavam febre foram convidados a participar da pesquisa e preencheram o critério clínico para diagnóstico de dengue pela Organização Mundial da Saúde, porém com especificidade muito baixa. Não conseguimos descartar os “não dengue”. Seguindo a diretriz do Ministério da Saúde e da Secretaria Estadual de Saúde, todos os casos suspeitos de dengue deveriam ser monitorados clínica e laboratorialmente preferencialmente a cada dois dias, provocando uma sobrecarga proibitiva do sistema assistencial em tempos de epidemia.

A avaliação da confiabilidade interobservador destacou ainda mais o papel do enfermeiro na abordagem ao paciente suspeito de dengue. Antes, sua atuação estava restrita à classificação de risco e manejo terapêutico do doente. Confiabilidades substanciais e quase perfeitas nos sinais e sintomas dos pacientes arrolados no estudo possivelmente auxiliarão a organização de sistemas assistenciais em situações epidêmicas de baixo poder aquisitivo deixando os poucos profissionais médicos para os cuidados dos pacientes graves.

Durante toda a coleta, as amostras congeladas foram levadas para o laboratório de referência pelo menos duas vezes por semana. As análises laboratoriais específicas, executadas no IOC ocorreram no segundo semestre de 2013 e primeiro semestre do ano seguinte. Com apoio financeiro do Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a expertise da equipe técnica, todas as amostras foram testadas para RNA viral, Bioeasy[®] imunocromatográfico, IgM, IgG e Platelia[®] Elisa NS1 com e sem dissociação térmica. Assim, foi possível não só sabermos o sorotipo circulante naquela epidemia como também analisar a variabilidade de resultados e a acurácia dos testes nas mais diversas situações: dengue primária, secundária, dissociação térmica, técnica habitual.

A análise dos dados laboratoriais revelou um grande paradigma: a falta de um padrão de referência. Isto porque apesar da coleta ter ocorrido em momento oportuno para a recuperação do RNA viral, em algumas amostras o resultado foi negativo com Platelia[®] Elisa NS1 positivo, exposto na figura do artigo três. Qual o tratamento a ser dado nesta situação? E a baixa sensibilidade do Bioeasy[®] imunocromatográfico? Como diagnosticar rapidamente a doença a fim de auxiliar a terapêutica dos casos confirmados? Como diagnosticar dengue de forma acurada em cenários onde outros Flavivírus como o Zika circulam?

Os resultados preliminares de baixa sensibilidade da técnica Bioeasy[®] imunocromatográfico empregada nas unidades públicas de saúde instrumentalizou os gestores públicos a suspender a recomendação do uso do teste nas unidades de emergência, uma vez que mais da metade dos pacientes suspeitos de dengue são liberados para casa com a falsa impressão que não têm dengue e não recebem a orientação de hiper-hidratação. Considero que esta seja a maior resposta que a pesquisa acadêmica pode dar à assistência, o retorno do resultado para auxiliar o manejo.

Talvez a combinação de critérios clínicos como o do INI-Fiocruz, associado a um teste imunocromatográfico cuja amostra tenha sofrido dissociação térmica, seja uma possibilidade para diagnosticar dengue na fase aguda de forma acurada e precoce a tempo a fim de influenciar na terapêutica a ser instituída nos pacientes.

9. REFERÊNCIAS

Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, et al. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:1059-62.

Bhatti AB, Ali F, Satti SA. Cross-Reactivity of Rapid Salmonella Typhi IgM Immunoassay in Dengue Fever Without Co-Existing Infection. *Cureus*. 2015 Dec 4;7(12):e396.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504-7.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* 2015;351:h5527.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy. The STARD initiative. *Am J Clin Pathol* 2003;119:18-22.

Brasil MS. Dengue: manual de enfermagem - adulto e criança. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2008.

Brasil. Dengue: Diagnóstico e manejo clínico. Adulto e criança. 5 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.

Brathwaite Dick O, San Martin JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 2012;87:584-93.

Chaterji S, Allen JC, Jr., Chow A, Leo YS, Ooi EE. Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. *Am J Trop Med Hyg* 2011;84:224-8.

Cicchetti DV, Lord C, Koenig K, Klin A, Volkmar FR. Reliability of the ADI-R: multiple examiners evaluate a single case. *J Autism Dev Disord* 2008;38:764-70.

Cicchetti DV, Sharma Y, Cotlier E. Assessment of observer variability in the classification of human cataracts. *Yale J Biol Med* 1982;55:81-8.

Cohen J. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull* 1968;70:213-20.

Coutinho EdS, Huf G, Bloch KV. [Pragmatic clinical trials: an option in the construction of health-related evidence]. *Cad Saude Publica* 2003;19:1189-93.

Daumas RP, Brasil P, Bressan CS, et al. Interobserver agreement on signs and symptoms of patients with acute febrile illness. *Infection* 2011;39:135-40.

Diaz FA, Martinez RA, Villar LA. [Clinical criteria to diagnose dengue in its early stages]. *Biomedica* 2006;26:22-30.

Dietz VJ, Gubler DJ, Rigau-Perez JG, et al. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. *Am J Epidemiol* 1990;131:693-701.

Domingo C, Alves MJ, de Ory F, Teichmann A, Schmitz H, Müller R, et al. International external quality control assessment for the serological diagnosis of dengue infections. *BMC Infect Dis*. 2015 Apr 1;15:167.

Epelboin L, Boule C, Ouar-Epelboin S, et al. Discriminating malaria from dengue fever in endemic areas: clinical and biological criteria, prognostic score and utility of the C-reactive protein: a retrospective matched-pair study in French Guiana. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2420.

Figueiredo LTM, Cavalcante SMB, Simões MC. Encuesta serológica sobre el dengue entre escolares de Rio de Janeiro. Brasil, 1986 y 1987. *Bol Oficina Sanit Panam* 1991:525-33.

Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008;14:667-9.

Figueiro AC, Hartz ZM, Brito CA, et al. [Death from dengue fever as a sentinel event for evaluation of quality of healthcare: a case study in two municipalities in Northeast Brazil, 2008]. *Cad Saude Publica* 2011;27:2373-85.

Fischer JE, Bachmann LM, Jaeschke R. A readers' guide to the interpretation of diagnostic test properties: clinical example of sepsis. *Intensive Care Med* 2003;29:1043-51.

Fox A, Le NM, Simmons CP, et al. Immunological and viral determinants of dengue severity in hospitalized adults in Ha Noi, Viet Nam. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e967.

Fredericks AC, Fernandez-Sesma A. The burden of dengue and chikungunya worldwide: implications for the southern United States and California. *Ann Glob Health* 2014;80:466-75.

Fry SR, Meyer M, Semple MG, et al. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1199.

Gan VC, Tan LK, Lye DC, et al. Diagnosing dengue at the point-of-care: utility of a rapid combined diagnostic kit in Singapore. *PLoS One* 2014;9:e90037.

Gibbons RV, Streit M, Babina T, Fried JR. Dengue and US military operations from the Spanish-American War through today. *Emerg Infect Dis* 2012;18:623-30.

Giraldo D, Sant'Anna C, Perisse AR, et al. Characteristics of children hospitalized with dengue fever in an outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011;105:601-3.

Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health* 2011;39:3-11.

Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2002;10:100-3.

Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore* 1998;27:227-34.

Guyatt G, Meade MO, Rennie D, Cook DJ. *Users' Guides to the Medical Literature: A Manual for Evidence-Based Clinical Practice*. 3rd ed: JAMA; 2015.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:S7-16.

Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 2006;20:407-15.

Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e360.

Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003;3:19-28.

Honorio NA, Nogueira RM, Codeco CT, et al. Spatial evaluation and modeling of Dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e545.

Idrees S, Ashfaq UA. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genet Vaccines Ther* 2012;10:6.

Janeiro Rd. Relatório Epidemiológico da Dengue. In. 30/10/2012 ed: Secretaria de Estado de Saúde; 2012:8.

Kim SY. Efficacy versus Effectiveness. *Korean J Fam Med* 2013;34:227.

Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:153-9.

Kuno G. Emergence of the severe syndrome and mortality associated with dengue and dengue-like illness: historical records (1890 to 1950) and their compatibility with current hypotheses on the shift of disease manifestation. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:186-201, Table of Contents.

Landis JR, G.G. K. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.

Lee VJ, Lye DC, Sun Y, Leo YS. Decision tree algorithm in deciding hospitalization for adult patients with dengue haemorrhagic fever in Singapore. *Trop Med Int Health* 2009;14:1154-9.

Lima MR, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e738.

Lima MRQ, Nogueira R.M., Santos, F.B. Dengue diagnosis: commercially available kits and laboratory support. In: *Clinical Insights*; 2014:27-47.

Lima VL, Figueiredo LT, Correa FH, et al. [Dengue fever: a post-epidemic sero-epidemiological survey in an urban area setting at a northwestern county of Sao Paulo State, Brazil]. *Rev Saude Publica* 1999;33:566-74.

Lourenco-de-Oliveira R. Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: yellow fever in 1908 and dengue in 2008 - editorial. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:627-8.

Low JG, Ong A, Tan LK, et al. The early clinical features of dengue in adults: challenges for early clinical diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1191.

Low JG, Ooi EE, Tolfvenstam T, et al. Early Dengue infection and outcome study (EDEN) - study design and preliminary findings. *Ann Acad Med Singapore* 2006;35:783-9.

Manterola C, Munoz S, Grande L, Bustos L. Initial validation of a questionnaire for detecting gastroesophageal reflux disease in epidemiological settings. *J Clin Epidemiol* 2002;55:1041-5.

Marzochi KB. [Dengue-clinical classification]. *Cad Saude Publica* 1991;7:409-15.

Messina JP, Brady OJ, Scott TW, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* 2014;22:138-46.

Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:255-6.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect* 1993;111:163-70.

Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1376-81.

Norman GR, Streiner DL. *PDQ Statistics*. 3rd ed. Shelton, CT, EUA.: PMPH; 2003.

Peat G, Wood L, Wilkie R, Thomas E. How reliable is structured clinical history-taking in older adults with knee problems? Inter- and intraobserver variability of the KNE-SCI. *J Clin Epidemiol* 2003;56:1030-7.

Premaratna R, Pathmeswaran A, Amarasekara ND, Motha MB, Perera KV, de Silva HJ. A clinical guide for early detection of dengue fever and timing of investigations to detect patients likely to develop complications. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:127-31.

- Reiter P. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *J Am Mosq Control Assoc* 1998;14:83-94.
- Rigau-Perez JG. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:272-4.
- Rush B. An Account of the Bilious Remitting Fever, As it Appeared in Philadelphia in the Summer and Autumn of the Year of 1780. *Am J Med* 1951;11:546-50.
- Sabin AB. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev* 1950;14:225-32.
- San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:128-35.
- SES. Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Anual. Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro; 2016.
- Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95 Suppl 1:179-81.
- Schwartz D, Lellouch J. Explanatory and pragmatic attitudes in therapeutical trials. *J Chronic Dis* 1967;20:637-48.
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* 2012;366:1423-32.
- Smart WR. On Dengue or Dandy Fever. *Br Med J* 1877;1:382-3.
- Streiner DL, Norman GR a. "Precision" and "accuracy": two terms that are neither. *J Clin Epidemiol.* 2006 Apr;59(4):327-30
- Streiner DL, Norman GR b. Diagnostic testing. *Community Oncology* 2009;6:428-30.
- Streiner DL, Norman GR. Efficacy and efectiveness trials. *Commun Oncol* 2009;6:472-4.
- Streiner DL. Diagnosing tests: using and misusing diagnostic and screening tests. *J Pers Assess* 2003;81:209-19.
- Streiner DL, Norman GR, Cairney J. *Health Measurement Scales: a practical guide for their development and use.* Oxford: Oxford University Press 2015.
- Takemura Y, Atsumi R, Tsuda T. Identifying medical interview behaviors that best elicit information from patients in clinical practice. *Tohoku J Exp Med* 2007;213:121-7.
- Tanner L, Schreiber M, Low JG, et al. Decision tree algorithms predict the diagnosis and outcome of dengue fever in the early phase of illness. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e196.
- Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ. Global traffic and disease vector dispersal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6242-7.

Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 2009;25 Suppl 1:S7-18.

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

Toledo AL, Escosteguy CC, Medronho Rde A, Andrade FC. [Reliability of the final dengue diagnosis in the epidemic occurring in Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2002]. *Cad Saude Publica* 2006;22:933-40.

Tricou V, Vu HT, Quynh NV, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis* 2010;10:142.

Vasconcelos PF, Lima JW, da Rosa AP, et al. [Dengue epidemic in Fortaleza, Ceara: randomized seroepidemiologic survey]. *Rev Saude Publica* 1998;32:447-54.

Viana DV, Ignotti E. The occurrence of dengue and weather changes in Brazil: a systematic review. *Rev Bras Epidemiol* 2013;16:240-56.

Wang E, Ni H, Xu R, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 2000;74:3227-34.

WHO. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control Geneva: WHO; 1997.

WHO. Dengue: diagnosis, treatment, prevention and control. In: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva; 2009.

WHO. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. In: Organization WH, ed. Geneva, Switzerland; 2012.

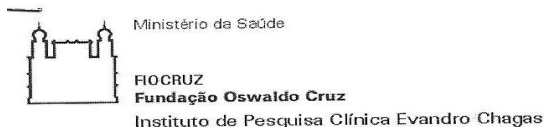
WHO. Dengue and severe dengue- fact sheet. March 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/#>. Acessado em 05/04/2016.

Zainah S, Wahab AH, Mariam M, et al. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. *J Virol Methods* 2009;155:157-60.

Zwarenstein M, Treweek S, Gagnier JJ, et al. Improving the reporting of pragmatic trials: an extension of the CONSORT statement. *BMJ* 2008;337:a2390.

ANEXOS

Anexo 10.1- Parecer de aprovação CEP / INI



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 016/2012

CAAE 0066.0.009.000-11

1. Identificação:

Título do Projeto: "Ensaio diagnóstico pragmático de algoritmo clínico-laboratorial para dengue em unidades de pronto atendimento no Rio de Janeiro".

Pesquisador Responsável: Sonia Regina Lambert Passos.

Doutoranda: Sibelle Nogueira Buonora.

Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 21/12/2011.

2. Sumário:

Visa a avaliar a acurácia de algoritmo diagnóstico clínico-laboratorial para o dengue obtidos com o uso de instrumento padronizado em setting amplo em termos de saúde pública e espectro clínico de pacientes. Tem como objetivos específicos: **1)** Comparar a acurácia diagnóstica do escore de critérios clínico-laboratoriais propostos para o diagnóstico de dengue com os critérios preconizados na vigilância epidemiológica pelo MS - Brasil em uma ampla amostra de pacientes atendidos com síndrome febril aguda em unidades de saúde no estado do Rio de Janeiro; **2)** Avaliar a confiabilidade interobservador de escore clínico padronizado para o diagnóstico de dengue. O estudo será do tipo ensaio pragmático diagnóstico onde serão comparados dois grupos em UPA distintas. No primeiro grupo será aplicado de forma randomizada o questionário resumido previamente validado de Síndrome Febril Aguda e os sujeitos do estudo terão a pesquisa laboratorial realizada segundo orientação do Ministério da Saúde. No segundo grupo, em outras UPA, os pacientes serão avaliados como suspeitos de dengue segundo os critérios de vigilância do Ministério da Saúde, sem aplicação de questionário e também realizarão a pesquisa laboratorial recomendada pelo Ministério da Saúde. Serão incluídos pacientes de ambos os sexos que procuram a UPA 24 horas por demanda espontânea com idade superior a 18 anos, apresentando febre ou história de febre por até 7 dias sem evidência de foco infeccioso. Para o estudo de validação das regras espera-se arrolar no mínimo 214 pacientes em cada grupo (dengue e não dengue). Para o estudo de confiabilidade da regra o tamanho amostral mínimo necessário é de 320 observações (suspeitos de dengue). O estudo será inédito por permitir avaliação do algoritmo elaborado e publicado (Daumas, 2011) em situação de "vida real" em unidades de pronto atendimento que lidam diretamente com o público e que registram grande número de atendimentos. O estudo será realizado em cinco UPA administradas pela Secretaria de Estado de Saúde cujo volume de atendimento de dengue foi representativo na epidemia 2010-2011. Em cada UPA serão estudados 120 pacientes arrolados de forma randomizado.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Fazem parte integrante deste estudo: 1) Questionário Estruturado; 2) Manual para preenchimento do questionário de dengue (Daumas, 2011); 3) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido elaborado em linguagem acessível ao sujeito de

"Ensaio diagnóstico pragmático de algoritmo clínico-laboratorial para dengue em unidades de pronto atendimento no Rio de Janeiro".

pesquisa; 4) Carta de Anuência do Coordenador Geral das UPAs. Esta proposta conta com recursos da própria unidade da Secretaria Estadual de saúde do Rio de Janeiro e financiamento bolsa Jovem Cientista do Nosso Estado da FAPERJ da orientadora pertencente ao Laboratório de Epidemiologia Clínica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - FIOCRUZ.

4. Diligências:

Sim. Foram satisfeitas.

Parecer: APROVADO.

Data: 23 de março de 2012.

Assinatura do Coordenador:



Dr.ª Léa Camilla Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPBC / FIOCRUZ

Anexo 10.2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo: **Ensaio diagnóstico pragmático de algoritmo clínico-laboratorial para Dengue em unidades de pronto atendimento no Rio de Janeiro**

Pesquisadoras responsáveis: **Dra.Sibelle Nogueira Buonora e**

Profa. Sonia Regina Lambert Passos

Secretaria Estado da Saúde e Instituto de Pesquisa Evandro Chagas

Informações ao Paciente e Consentimento Livre Esclarecido

[uma cópia deverá ser entregue ao paciente]

Nós gostaríamos de oferecer a você a possibilidade de participar de um estudo controlado que vai avaliar se os seus sintomas são sugestivos ou não de dengue. Nós pensamos que alguns sintomas que as pessoas apresentam possam sugerir dengue inclusive alguns ou todos os sintomas que você está apresentando, mas ainda não está totalmente definido quais são.

Se você concordar, nós faremos algumas perguntas de um questionário e você será normalmente avaliado por um médico. Todos os sintomas apresentados por você e as alterações do seu exame serão registrados num formulário próprio.

Como todo doente com suspeita de dengue, você terá o seu sangue coletado para avaliar se há alguma alteração que também possa sugerir dengue (grave ou não grave). Serão realizados um hemograma completo, teste rápido para Dengue e uma terceira amostra de sangue será enviada para a Fundação Oswaldo Cruz para pesquisar qual tipo de vírus da dengue (Dengue 1, 2, 3 ou 4) que está causando a sua doença. Para fazer estes exames, serão colhidos 20 ml de sangue, o equivalente a duas colheres de sopa de sangue para pesquisar alterações sugestivas de dengue.

O procedimento de coleta de sangue é bastante simples e seguro, usamos sempre material estéril e descartável, mas raramente ocorrem complicações como hematomas (mancha roxa devido ao extravasamento de pequena quantidade de sangue no local da punção) e pequenos sangramentos no local da coleta.

Você receberá os resultados dos exames de hemograma e teste rápido de dengue do laboratório conforme todos os demais doentes avaliados na UPA 24H, logo que ficarem prontos. A pesquisa do tipo do vírus é mais demorada, mas este resultado não irá alterar o seu tratamento. Quando o resultado ficar pronto, caso haja interesse, entraremos em contato para fornecê-lo.

De acordo com os resultados dos exames de sangue e caso o seu estado de saúde piore ou não se modifique, o médico poderá pedir para você retornar outras vezes para uma nova consulta, responder a algumas perguntas e fazer novos exames de sangue.

Você não tem que concordar em participar do estudo. Se você não quiser, o seu tratamento, orientações médicas, nem a realização dos seus exames serão afetados. Se você concordar em participar do estudo e mudar de idéia mais tarde, você pode se retirar sem que haja interferência no seu cuidado.

Toda a informação coletada durante o estudo será confidencial. Esta informação pode ser consultada por um membro autorizado do grupo de pesquisa ou por um representante das autoridades de saúde. Isto será feito confidencialmente e somente na presença de um médico. Toda a informação coletada terá somente as suas iniciais e o número de prontuário.

Você pode contatar 2590-6260 se você tiver perguntas sobre o estudo, sobre os seus direitos como um membro da pesquisa, ou se você sofrer qualquer tipo de prejuízo durante o estudo. Antes que você possa participar neste estudo, você precisa concordar com este formulário para confirmar o seguinte:

1. Eu concordo em participar deste estudo clínico sobre dengue.
2. Eu fui informado pelo investigador da natureza, dos objetivos, e da duração do estudo, assim como seus possíveis benefícios e perigos potenciais, incluindo todo o desconforto que pode ocorrer em mim.
3. Eu estou livre para me retirar deste estudo clínico em qualquer momento, sem justificar minha decisão. Isto não afetará em nenhuma maneira a qualidade do meu cuidado médico
4. Eu estou ciente que eu serei prontamente informado de toda informação nova que surja durante o estudo que possa alterar minha decisão para continuar.
5. Eu aceito que os resultados do estudo serão comunicados à autoridade competente e ao grupo de pesquisa.
6. Eu confirmo que eu recebi uma cópia das Informações ao Paciente e do Consentimento Livre Esclarecido que se relaciona a este estudo.

Nome do paciente ou representante legal (legível):

Assinatura: _____

Data: _____

Nome do investigador (legível):

Assinatura: _____

Data: _____

Importante: Uma cópia deverá ser entregue ao paciente

Anexo 10.3- Questionário de Síndrome Febril Aguda



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Questionário para avaliação de Síndrome Febril Aguda-Dengue em UPA

Código	BAM	Data do atendimento ____/____/____	
Iniciais:	Data de Nascimento ____/____/____	Sexo 1 () M 2 () F	Observador 1 () Sibelle 2 () Outro
Comorbidades			
Gestante 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Diabetes Mellitus 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	DPOC 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Asma 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Rinite 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Tabagismo 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Hipertensão arterial 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Anemia falciforme 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Alcoolismo 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Uso de medicamentos 1() Sim 2() Não	Qual?	Drogas ilícitas 1() Sim 2() Não Qual?	
Doença imunossupressora 1() Sim 2() Não	Qual?	Droga Imunossupressora 1() Sim 2() Não	
Dados Clínicos			
Queixa Principal			
Febre 1() Sim 2() Não	Mediu? 1() Sim 2() Não	Data do surgimento da febre ____/____/____	
Data do desaparecimento da febre ____/____/____	Calafrios 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Cefaleia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Fotofobia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Dor retro orbitária 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Dor na orofaringe 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Rouquidão 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Alteração do paladar 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Dor de ouvido 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Coriza 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Prostração 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Mialgia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Lombalgia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Artralgia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Anorexia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Náuseas 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Vômitos 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Dor abdominal 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Dispnéia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Tosse 1() Sim 2() Não	1() Sim 2() Não	Tosse produtiva 1() Sim 2() Não
Diarréia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Líquidas 1() Sim 2() Não	Pastosas 1() Sim 2() Não	Número de evacuações
Hemorragias 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Conjuntival 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Epístaxe 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Gengivorragia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Petéquias 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Metrorragia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Hematúria 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Hematêmese 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Melena 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Hemoptóicos 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Tonteira 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Desmaio 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Exantema 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Icterícia 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	Prurido 1() Sim 2() Não 3 () Não sei	
Convulsões 1() Sim 2() Não 3 () Não sei			

Exame físico		
Peso	PA sentado	PA em pé
Temperatura axilar	Prova do laço 1() Positiva 2() Negativa 3 () Não realizada	Frequência cardíaca
Frequência respiratória	Pulso filiforme 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Enchimento capilar lentificado 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Extremidades frias 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Dispnéia 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Desidratação 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Palidez cutâneo-mucosa 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Edemas 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Rubor facial 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Congestão ocular ou hiperemia conjuntival 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Icterícia 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Enantema 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Hiperemia de orofaringe 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Adenomegalias 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Exantema 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Macular 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Maculo-papular 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Vesiculoso 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Hemorragias 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Petéquias 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Púrpura 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Gengivorragia 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Hemoptóicos 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Irritação peritoneal 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Hepatomegalia 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Esplenomegalia 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Ascite 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Dor à percussão lombar 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Convulsões 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Alteração do nível de consciência 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado
Rigidez de nuca 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Sopro cardíaco 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado	Ausulta pulmonar alterada 1() Presente 2() Ausente 3 () Não avaliado

Exames laboratoriais		
Registro	Hematócrito	Plaquetas
Leucometria	NS1 1() Positiva 2() Negativa 3 () Não avaliado	IgM 1() Positiva 2() Negativa 3 () Não avaliado
IgG 1() Positiva 2() Negativa 3 () Não avaliado	TGO	TGP
Confirma dengue 1() Sim 2() Não	Outra doença 1() Sim 2() Não	

Anexo 10.4- Manual de preenchimento do Questionário de Síndrome Febril Aguda

Manual para preenchimento do questionário de dengue

História da doença atual

Marque os sinais/sintomas:

- S-sim / N-Não/NS- não sei/ NR- não realizado (verificado)

Sintomas

1. Febre

Você verificou a sua temperatura com o termômetro? (S / N)

2. Calafrios

"Você tem calafrios?" Você precisa se agasalhar para sentir-se melhor? Ou "Você sente frio e fica arrepiado?" (S / N / NS)

3. Cefaléia

"Você tem dor de cabeça?" Se tem, precisa tomar remédio? Aliviou? (S / N / NS)

4. Fotofobia

"A luz te incomoda?" Você evita a luz? (S / N / NS)

5. Dor retroorbitária

"Você sente dor nos olhos ou arredor deles?" (Mostre a região ao paciente) (S / N / NS)

6. Dor na orofaringe:

"A sua garganta arde quando você está comendo, bebendo água ou engolindo saliva?" Melhora com remédio? (S / N / NS)

7. Rouquidão

"Você percebeu alguma diferença na sua voz? Sua voz está rouca?" (S / N / NS)

8. Alteração do paladar

"A comida ou bebida tem gosto diferente?" (S / N / NS)

9. Dor de ouvido

"Você está com dor de ouvido?" Melhora com remédio? (S / N / NS)

10. Coriza

"O seu nariz está escorrendo?" (S / N / NS)

11. Congestão nasal

"O seu nariz está entupido?" (S / N / NS)

12. Exaustão

"Você se sente cansado / exausto?" (S / N / NS)

13. Mialgia

"O seu corpo dói? Melhora com remédio? (S / N / NS)

14. Dor lombar:

"Você tem dor nas costas?" (Mostre ao paciente a região a qual você está se referindo) (S / N / NS)

15. Artralgia

"Suas juntas doem?" (Exemplifique mostrando algumas articulações) (S / N / NS)

16. Anorexia

"Você perdeu a fome?" (S / N / NS)

17. Náuseas

"Você se sente enjoado?" (S / N / NS)

18. Vômitos

"Você vomitou?" (S / N / NS)

19. Dor abdominal

"A sua barriga dói?" (S / N / NS)

20. Colúria

"Que cor está a sua urina? Está parecida com 'Coca-Cola'?" (S / N / NS)

21. Diarréia

"Você tem diarréia?" (S / N / NS)

22. Dispnea

Pergunte ao paciente sobre dificuldades respiratórias correlacionando com atividades físicas. "Você está respirando cansado?" (S / N / NS)

23. Tosse (presença e características)

"Você tem tossido?" De acordo com a resposta assinala:

23.1 Tosse seca (S / N / NS)

23.2 Tosse produtiva "A sua tosse tem catarro?" (S / N / NS)

24. Hemorragia (S / N / NS)

"Você tem algum sangramento anormal?"

Pergunte sobre sítios específicos de sangramento. Se a resposta for afirmativa prossiga com as perguntas a seguir e marque SIM para hemorragia.

24.1. Epistaxe "O seu nariz sangrou?" (S / N / NS)

24.2. Hemorragia gengival "Você teve hemorragia gengival desde o início desta doença? Foi espontâneo ou quando escovou os dentes? É um problema antigo (crônico) ou apareceu durante esta doença? (Não considere se o padrão for idêntico ao anterior a doença atual) (S / N / NS)

24.3. Metrorragia "Você teve sangramento vaginal fora do período menstrual? O volume foi menor, igual ou maior do que o fluxo menstrual habitual?" (S / N / NS)

24.4. Hematúria "A sua urina ficou vermelha? Você urinou sangue?" (S / N / NS)

24.5. Hematêmese "Você vomitou sangue? Você tem tido vômitos enegrecidos ou vomitou tipo borra de café?" (S / N / NS)

24.6. Melena "Qual é a cor das suas fezes? As suas fezes estão escuras, amolecidas e muito fedorentas?" (S / N / NS)

24.7. Episódios hemoptóicos/Hemoptise "Você tem tossido sangue vivo? Isso aconteceu quantas vezes durante esta doença?" (S / N / NS)

25. Tonteira

"Você se sentiu tonto(a)

26. Desmaios

"Você desmaiou?" (S / N / NS)

27. Exantema

"Você percebeu a presença de manchas róseas ou avermelhadas na sua pele? Elas são isoladas ou espalhadas pelo corpo e se aglomerando em manchas grandes?" (S / N / NS)

28. Prurido

"Você tem tido coceira no corpo todo ou em alguma parte do seu corpo?" (S / N / NS)

Exame físico

Caso algum item não tenha sido verificado justifique ao final do questionário.

Meça e registre a temperatura axilar, frequências respiratória e cardíaca e pressão arterial sentado e deitado.

1. Hipotensão (S / N / NR)

A PA sistólica é menor que 90 mm Hg?

2. Enchimento capilar lentificado (S / N / NR)

O enchimento capilar é ≥ 2 seg?

3. Pulso fraco/filiforme (S / N / NR)

Cheque o pulso radial. Está fraco?

4. Extremidades frias (S / N / NR)

5. Dispnea (respiração laboriosa) (S / N / NR)

6. Desidratação

Avalie a mucosa quanto ao aspecto e umidade. O turgor é checado pinçando a pele. (S / N / NR)

7. Palidez cutâneo-mucosa

Avalie a cor da lingual, conjuntivas e a palma das mãos. (S / N / NR)

8. Edemas

Para acessar intensidade, comprima a area edematosa com o polegar ou ponta do dedo e pesquise endentação. (S / N / NR)

9. Congestão ocular/ hiperemia conjuntival

Avalie a cor e vasos da conjuntiva. Olhos vermelhos e/ou vasos oculares visíveis? (S / N / NR)

10. Icterícia (S / N / NR)

11. Exantema (S / N / NR)

Macular	S / N / NR
Maculopapular	S / N / NR
Vesicular	S / N / NR

12. Enantema (S / N / NR)

Presença de manchas vermelhas na mucosa da orofaringe.

13. Hiperemia de orofaringe (S / N / NR)

14. Adenomegalia (S / N / NR)

15. Petéquias

Manchas puntiformes vermelhas ou arroxeadas na pele ou mucosa que não desaparecem a digitopressão. (S / N / NR)

16. Púrpura

Máculas eritematosas ou arroxeadas indicando sangramento submucoso que não desaparecem a digitopressão. (S / N / NR)

17. Hemorragia gengival (S / N / NR)

18. Hepatomegalia (S / N / NR)

Sim se a hepatimetria exceder 12cm.

19. Esplenomegalia (S / N / NR)

Palpe o abdome com o paciente em decúbito dorsal e decúbito lateral.

20. Punho percussão lombar (S / N / NR) (unilateral)

O paciente tem punho percussão lombar? Não considere se a dor for bilateral ou simétrica.

21. Rigidez de nuca (S / N / NR)

Com o paciente em decúbito dorsal, fletir a cabeça. Há resistência e dor?

22. Sopros cardíaco (S / N / NR)

23. Ausculta pulmonar alterada (S / N / NR)