

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

JULIANA DE MELO E SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DENGUE EM PACIENTES
COM A SUSPEITA CLÍNICA DA DOENÇA ATENDIDOS EM MACEIÓ,
ALAGOAS**

Maceió
2014

JULIANA DE MELO E SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DENGUE EM PACIENTES
COM A SUSPEITA CLÍNICA DA DOENÇA ATENDIDOS EM MACEIÓ,
ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Abel Borges.

Maceió

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S586d Silva, Juliana de Melo e.
Detecção molecular do vírus dengue em pacientes com a suspeita clínica da doença atendidos em Maceió, Alagoas / Juliana de Melo e Silva. – 2014.
99 f. : il.

Orientadora: Alessandra Abel Borges.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2014.

Bibliografias: f. 86-94.
Apêndices: f. 95-97.
Anexos: f. 98-99.

1. Dengue - Diagnóstico. 2. Dengue - Diagnóstico de laboratório.
3. Vírus da dengue - Detecção. I. Título.

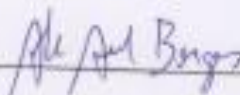
CDU: 57.083

Folha de Aprovação

Juliana de Melo e Silva

Deteção molecular do vírus dengue em pacientes com a suspeita clínica da doença
atendidos em Maceió, Alagoas

Dissertação submetida ao corpo
docente do Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Alagoas e
aprovada em 05 de setembro de 2014.

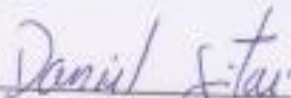


Prof.ª Dr.ª Alessandra Abel Borges (Orientador)

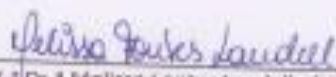
Banca Examinadora



Prof.ª Dr.ª Roberta Vieira de Moraes Bronzoni – (UFMT-Sinop)



Prof. Dr. Daniel Leite Goes Gital – (UFAL)



Prof.ª Dr.ª Melissa Fontes Landell – (UFAL)

*Aos meus pais, Marcos e Silvana,
minhas irmãs, Jacqueline e Karoline
e meu noivo Marcos.
Dedicar-lhes este, eu sei, é o pouco pelo
Muito que sempre me foi oferecido:
Muito amor incondicional, Muita dedicação,
Muito apoio, Muita cumplicidade;
e o olhar único que sempre me fez ter a certeza do
Muito que estava recebendo e do
Muito do qual seria capaz.
E ao meu sobrinho, Davi.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio, fortaleza e inspiração em todos os momentos;

À minha orientadora, profa. Dra. Alessandra Abel Borges, pela oportunidade oferecida, pela confiança depositada, e pelas valiosas lições;

Ao Programa Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelo apoio e incentivo para o desenvolvimento desta pesquisa científica;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e incentivo financeiro através da bolsa para o desenvolvimento desta pesquisa científica;

Ao PPSUS-FAPEAL pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível o desenvolvimento desta pesquisa científica;

Ao corpo clínico do Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto, do PAM Bebedouro e UNIMED por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN), pelo apoio ao estudo, em especial ao Doutor Lúcio pela colaboração;

Aos pacientes participantes do estudo, imprescindíveis para a realização do mesmo, pela confiança, cooperação e cordialidade;

Ao professor Dr. Victor Hugo Aquino, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, pelo treinamento e apoio intelectual, doação das cepas virais, do kit de Real Time e outros materiais para o diagnóstico laboratorial;

Ao professor Dr. Daniel Gitaí, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, por sempre ter aberto as portas do seu laboratório para utilização de equipamentos, pelo fornecimento de reagentes;

À professora Dra. Denise Maria Wanderlei Silva e à professora Dra. Magna Suzana, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, pela disponibilização de equipamentos;

Ao professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pelo apoio intelectual e por ter proporcionado o treinamento no seu laboratório, com a ajuda de Soraya Badra e Marília Farignoli.

À Ana Rachel pelo apoio ao estudo e ajuda nos experimentos e ao Rafael Vital, pela sua ajuda nos esclarecimentos de dúvidas, pelo aprendizado e pelo acompanhamento e auxílio nas reações de real time;

À Janille Botelho Alves Tenório, Patrícia Alves Barros, Ana Amancio Santos da Silva e Mariana Pelissari Dias Ribeiro pela ajuda nas coletas sanguíneas, obtenção de amostras e de dados clínicos;

À Adriana Soares, Alberto Alberilla, Nilton e Raquel Russo do Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, pelo treinamento e pelo fornecimento dos vírus para a realização do trabalho;

À Mykaella e Thalita Sales, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pela disposição em sempre me ajudar quando era preciso e esclarecimentos de dúvidas e pela disposição em auxiliar;

À Dra. Vanessa Danielle Menjon Muller pelo treinamento em Ribeirão Preto, e pela ajuda durante os experimentos em Maceió, conhecimento, paciência e ajuda inestimável;

À Eloiza Lira pela amizade, paciência, conhecimento e ajuda inestimável durante os experimentos;

Aos meus colegas do LAPEVI, Danilo Machado, Flávio Martins, Karine Menezes, Jordana Pimentel, pelos conhecimentos compartilhados e ajuda inestimável;

Ao Jhonatan, secretário da Pós-graduação, pelos esclarecimentos de dúvidas;

Aos professores do PPGCS por todo o aprendizado;

Aos meus colegas de turma, por permitirem-me viajar junto nessa surpreendente jornada que é a vida acadêmica e, sobretudo, pela amizade;

A todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha jornada até aqui, muito obrigada!

Quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

RESUMO

A dengue é a doença mais importante transmitida por artrópodes, no mundo. Os vírus dengue (DENV) são vírus de RNA de fita simples com polaridade positiva que pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Existem quatro sorotipos clássicos do vírus dengue sorologicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). A infecção pelo DENV causa um espectro de doenças que inclui desde infecção assintomática ou doença febril leve à dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Testes laboratoriais específicos utilizados no diagnóstico de dengue podem ser realizados através da detecção da presença de anticorpos, do isolamento viral, da detecção do genoma do vírus através da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), da detecção de antígeno NS1, e da imuno-histoquímica. No Estado de Alagoas, o diagnóstico é realizado apenas por sorologia e isolamento viral. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a detecção molecular de DENV em amostras de soro de indivíduos com a suspeita clínica da doença atendidos em Maceió/AL, através dos métodos de *One-step* RT-PCR em tempo real, multiplex semi-*nested*-PCR e *nested* PCR. Amostras de soros de 55 pacientes foram coletados e testados para a detecção da região RNC5' e de partes dos genes do C, prM e NS5 no genoma viral. Do total de amostras, em 15 (27,27%) foi detectado genoma DENV em pelo menos um dos testes utilizados. Destas, 13 (86,67%) foram positivas pelo *One-step* RT-PCR em tempo real. O sorotipo viral pôde ser determinado em 9 amostras (60%), das quais 8 (88,9%) apresentaram DENV-4 e 1 apresentou (11,1%), DENV-3. A maioria das amostras séricas incluídas no estudo foi coletada dentro do período de viremia e foram de pacientes que apresentaram sintomas sugestivos de dengue. Estes dados sugerem que outros membros do gênero *Flavivirus* podem estar causando infecções em Maceió, porém recebendo diagnóstico clínico equivocado de dengue. No entanto, mais estudos de triagem molecular e sorológica para outros arbovírus são necessários para comprovar esta hipótese.

Palavras-chave: Dengue; RT-PCR; Detecção; Diagnóstico laboratorial.

ABSTRACT

Dengue is the most important arthropod-borne viral disease in the world. The dengue virus (DENV) are single-stranded RNA viruses with positive polarity that belong to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. There are four classic serotypes of dengue virus serologically distinct (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). The DENV infection causes a spectrum of illness ranging from asymptomatic infection or mild febrile illness to dengue without warning signs, dengue with warning signs, and severe dengue. Specific laboratory tests performed in the diagnosis of dengue can be accomplished through the detection of the presence of antibodies, virus isolation, detection of the viral genome by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR), NS1 antigen detection, and immunohistochemistry. In the State of Alagoas, the diagnosis is performed only by serology and virus isolation. Thus, the aim of this study was to perform the molecular detection of DENV in sera samples from individuals with clinical suspect of the disease attended in Maceió/AL, by the methods of one-step real time RT-PCR, multiplex semi-nested- PCR and nested PCR. Sera samples from 55 patients were collected and tested for detection of the 5'UTR region and of parts of the C, prM and NS5 genes at the viral genome. Of the total samples, in 15 (27.27%) was detected DENV genome in at least one of the used tests. Of these, 13 (86.67%) were positive by One-step real time RT-PCR. The viral serotype could be determined in 9 samples (60%), of which 8 (88.9%) presented DENV-4 and 1 presented (11.1%) DENV-3. Most sera samples included in the study was collected within the period of viremia and were obtained from patients who had symptoms suggestive of dengue. These data suggest that other members from genera *Flavivirus* may be causing infections in Maceió, but misdiagnosed as dengue. However, further studies aiming the molecular and serological screening for other arboviruses are necessary to confirm this hypothesis.

Key words: Dengue; RT-PCR; Detection; Laboratorial diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sequência aberta de leitura do genoma dos flavivírus e o processamento da poliproteína. Proteínas estruturais: do capsídeo (C), da membrana (M) e glicoproteína do envelope (E). Proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).....20
- Figura 2** - Distribuição dos quatro sorotipos do DENV nas Américas, de 1990 a 2013.....30
- Figura 3** - Incidência de Dengue, Alagoas de 1996 a 2014.....32
- Figura 4** – Curva de amplificação do controle positivo em duplicata. Apresentaram Controle positivo 1 C_t de 27.979 e T_m de 78.126; Controle positivo 2 C_t de 31.182 e T_m de 78.127; Controle negativo 1 indeterminado e T_m de 78.425; Controle negativo 2 com C_t indeterminado e T_m de 80.962. A linha azul representa o limiar (*threshold*).....41
- Figura 5** – Curva de dissociação dos controles positivos para DENV, mostrando a T_m de 78,13, conforme o esperado para genomas de dengue.....41
- Figura 6** – Esquema das reações de RT-PCR seguida de semi-nested-PCR.....44
- Figura 7** – Esquema das reações de RT-PCR seguida de multiplex semi-nested-PCR.....46
- Figura 8** – Amplificação da amostra 110H e do controle positivo (CP) (DENV-3, cepa BR/SL3/02) e o controle negativo (CN). Apresentaram CN C_t indeterminado e T_m de 70.983; 110H C_t de 35.314 e T_m de 81.27; CP com C_t de 18.443 e T_m de 80.082. A linha azul representa o limiar (*threshold*).....54
- Figura 9** – Análise da curva de dissociação (*melting*) do controle negativo, da amostra 110H e do controle positivo (DENV-3, cepa BR/SL3/02), mostrando a T_m de 81.27 da amostra 110H, conforme o esperado para genomas de dengue.....55
- Figura 10** – Amplificação das amostras 125H e 136H e do controle positivo (CP) (DENV-3, cepa BR/SL3/02) e o controle negativo (CN). Apresentaram CN C_t indeterminado e T_m de 70.983; 125H C_t 40.985 e T_m de 71.728; 136H C_t de 35.314 e T_m de 73.381; CP com C_t de 18.443 e T_m de 80.082. A linha azul representa o limiar (*threshold*).....55
- Figura 11**– Análise da curva de dissociação do controle negativo, das amostras 125H e 136H e do controle positivo para DENV, mostrando a T_m de 80.08 do CP, conforme o esperado para genomas de dengue.....56

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose a 2,0% do resultado da PCR com *primers* do Lanciotti et al. (1992) utilizando *primers* específicos D1 e D2 (1 a 5) e *random primer* (6 a 10) na RT. M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1; linha 3: DENV-2; linha 4: DENV-3; linha 5: DENV-4; linha 6: Controle negativo; linha 7: DENV-1; linha 8: DENV-2; linha 9: DENV-3; linha 10: DENV-4.....58

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose a 2,0% do resultado da *nested* PCR com *primers* do Lanciotti et al. (1992) utilizando *primers* específicos (1 a 5) e *random primer* (6 a 10) na RT. M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1 (482pb); linha 3: DENV-2 (119pb); linha 4: DENV-3 (290pb); linha 5: DENV-4 (392pb); linha 6: Controle negativo; linha 7: DENV-1 (482pb); linha 8: DENV-2 (4119pb); linha 9: DENV-3 (290pb); linha 10: DENV-4 (392pb).....59

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose a 2,0% do resultado da 1ª PCR utilizando os *primers* da *semi-nested* PCR do Lanciotti et al. (1992) (TS1, TS2, TS3, TS4). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1 (482pb); linha 3: DENV-2 (119pb); linha 4: DENV-3 (290pb); linha 5: DENV-4 (392pb).....60

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do resultado da PCR com *primers* gênero-específicos para membros do gênero *Flavivirus* (FG1 e FG2), com protocolo adaptado de Bronzoni et al. (2005). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1; linha 3: DENV-2; linha 4: DENV-3; linha 5: DENV-4.....61

Figura 16 – A: Eletroforese em gel de agarose a 1,8% do resultado da multiplex-*semi-nested* PCR com *primers* sorotipo-específicos para dengue (nDEN1, nDEN2, nDEN3), segundo Bronzoni et al. (2005). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1 (472pb); linha 3: DENV-2 (316pb); linha 4: DENV-3 (659pb). **B:** Resultado *semi-nested* PCR específico para DENV-4 com o primer nDEN 4. M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: Controle positivo DENV-4 (222pb).....62

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose a 2,0% mostrando a amostra 151H que foi positiva com *primers* D1 e D2 de Lanciotti, apresentando *amplicon* de 511 pb. Linha 1: marcador de 100pb; linha 2: controle negativo; linha 3: amostra 151H considerada positiva nesta etapa; linhas 4 e 5: amostras negativas; linha 6: controle positivo DENV-2 (511pb); linha 7: controle positivo DENV-3 (511pb).....64

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% mostrando a amostra 151H que foi positiva com *primer* FG1 de Bronzoni, apresentando *amplicon* de 958 pb. Linha 1: marcador de 100pb; linha 2: controle negativo; linhas e 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 13: amostras negativas; linha 11: amostra 151H considerada positiva nesta etapa; linha 14: controle positivo DENV-2 (511pb); linha 14: controle positivo DENV-2 (958 pb).....65

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose a 2,0% representativa de amostra positiva para o sorotipo DENV-4, na reação de semi-*nested*-PCR com *primers* do Lanciotti et al. (1992). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: Amostra 109H considerada positiva; linha 3: controle positivo DENV-4 (392pb).....66

Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose a 1,8% representativa de amostra positiva para o sorotipo DENV-4, na reação de semi-*nested*-PCR com *primers* de Bronzoni et al. (2005). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: Amostra 158H considerada positiva; linha 3.: Controle positivo DENV-4 (222pb).....67

Figura 21 – Eletroforese do produto da PCR do DENV-2, cujo RNA foi submetido a diluições decimais e ao protocolo de Lanciotti, 1992, onde M= marcador de 100 pb; 1= Controle negativo; 2= RNA diluição 10^{-2} ; 3= RNA diluição 10^{-3} ; 4= RNA diluição 10^{-4} ; 5= RNA diluição 10^{-5} ; 6= RNA diluição 10^{-6} ; 7: RNA diluição 10^{-7} ; 8= RNA diluição 10^{-8} ; 9= RNA diluição 10^{-9} 72

Figura 22 – Eletroforese do produto da PCR do DENV-2, cujo RNA foi submetido a diluições decimais e ao protocolo de Bronzoni, 2005, onde M= marcador de 100 pb; 1= Controle negativo; 2= RNA diluição 10^{-2} ; 3= RNA diluição 10^{-3} ; 4= RNA diluição 10^{-4} ; 5= RNA diluição 10^{-5} ; 6= RNA diluição 10^{-6} ; 7= RNA diluição 10^{-7} ; 8= RNA diluição 10^{-8} ; 9= RNA diluição 10^{-9} 73

Figura 23 – Eletroforese do produto da semi *nested*-PCR do DENV-2, cujo RNA foi submetido a diluições decimais e ao protocolo de Lanciotti, onde M= marcador de 100 pb; 1= Controle negativo; 2= RNA diluição 10^{-2} ; 3= RNA diluição 10^{-3} ; 4= RNA diluição 10^{-4} ; 5= RNA diluição 10^{-5} ; 6= RNA diluição 10^{-6} ; 7: RNA diluição 10^{-7} ; 8= RNA diluição 10^{-8} ; 9= RNA diluição 10^{-9} 74

Figura 24 – Eletroforese do produto da multiplex-*nested*-PCR do DENV-2, cujo RNA foi submetido a diluições decimais e ao protocolo de Bronzoni, onde M= marcador de 100 pb; 1= Controle negativo; 2= RNA diluição 10^{-2} ; 3= RNA diluição 10^{-3} ; 4= RNA diluição 10^{-4} ; 5= RNA diluição 10^{-5} ; 6= RNA diluição 10^{-6} ; 7: RNA diluição 10^{-7} ; 8= RNA diluição 10^{-8} ; 9= RNA diluição 10^{-9} 75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição geográfica dos genótipos dos DENV no mundo.....	25
Quadro 2 – Distribuição geográfica dos genótipos dos DENV no Brasil.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios atualizados definidos para caso suspeito de dengue.....	28
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados para amplificação e sorotipagem do vírus da dengue.....	43
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados para amplificação e sorotipagem do vírus da dengue.....	45
Tabela 4 – Amostras séricas incluídas no estudo, segundo intervalo de tempo entre coleta e início da doença, local da coleta e procedência dos pacientes.....	48
Tabela 5 – Variação nos valores de C_t e T_m obtidos com os controles positivos para os diferentes sorotipos de vírus Dengue, em 15 reações de <i>One-step</i> RT-PCR em tempo real realizadas.....	51
Tabela 6 – Resultado das análises de amplificação nas amostras séricas provenientes de pacientes com suspeita clínica de dengue incluídas no estudo após reações de <i>One-step</i> RT-PCR em tempo real e de multiplex-semi-nested-RT-PCR convencional, mostrando em destaques coloridos as 15 amostras positivas para DENV.....	52
Tabela 7 – Amostras consideradas positivas após reação de contraprova / repetição do <i>One-step</i> RT-PCR em tempo real para presença de genoma viral de DENV e o período da coleta sanguínea em relação ao início dos sintomas.....	54
Tabela 8 – Quantificação da carga viral por RT-PCR em tempo real em amostras de soro dos pacientes.....	57
Tabela 9 – Amostras consideradas positivas após reação de multiplex-semi-nested-PCR para presença de genoma viral de DENV, utilizando protocolos com <i>primers</i> propostos por Bronzoni e Lanciotti.....	63
Tabela 10 – Sorotipos de DENV encontrados nas 9 amostras positivas testadas pelo multiplex-semi-nested-RT-PCR com <i>primers</i> de Lanciotti, et al. (1992) e de Bronzoni, et al. (2005).....	67
Tabela 11 – Resultado das análises de amplificação nas amostras séricas provenientes de pacientes com suspeita clínica de dengue incluídas no estudo após reações de <i>One-step</i> RT-PCR em tempo real e de multiplex-semi-nested-RT-PCR convencional, mostrando em destaques coloridos as 15 amostras positivas para DENV.....	68
Tabela 12 – Proporções entre amostras positivas e negativas obtidas nos testes de <i>One-step</i> RT-PCR tempo real e nos testes de RT-PCR convencionais combinados (Lanciotti e Bronzoni) para análise estatística.....	71
Tabela 13 – Proporções entre amostras positivas e negativas obtidas nos testes de <i>One-step</i> RT-PCR tempo real e nos testes de RT-PCR convencional por Lanciotti para análise estatística.....	71
Tabela 14 – Proporções entre amostras positivas e negativas obtidas nos testes de <i>One-step</i> RT-PCR tempo real e nos testes de RT-PCR convencional por Bronzoni para análise estatística.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Proteína do capsídeo
cDNA	DNA complementar
DENV	Vírus dengue
DEPC	Dietilpirocarbonato
DF	Febre da dengue
DHF	Febre Hemorrágica da dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DSS	Síndrome do choque da dengue
E	Proteína do envelope
EDTA	Ácido etilenodiamina tetraacético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HEHA	Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto
IgM	Imunoglobulina M
kb	kilobases
M	Membrana
mM	Milimolar
NS	Não estruturais
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2A	Proteína não-estrutural 2A
NS2B	Proteína não-estrutural 2B
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B

NS5	Proteína não-estrutural 5
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	Sequência de leitura aberta
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFU	Unidade formadora de placa
polyA	Poliadenilada
prM	Proteína precursora da proteína M
RNA	Ácido ribonucleico
RNC3´	Regiões não codificantes da extremidade 3´
RNC5´	Regiões não codificantes da extremidade 5´
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Vírus dengue	20
2.2 Replicação viral	21
2.3 Classificação antigênica dos flavivírus e Sorotipos de DENV	22
2.3.1 Genotipos de DENV.....	24
2.4 Epidemiologia da dengue	27
2.4.1 Transmissão.....	27
2.4.2 Aspectos clínicos.....	27
2.4.3 Dengue nas Américas e no Brasil.....	29
2.4.4 Dengue no estado de Alagoas e município de Maceió.....	31
2.5 Diagnóstico laboratorial da dengue	33
2.5.1 RT-PCR convencional.....	34
2.5.2 RT-PCR em tempo real.....	34
3 JUSTIFICATIVA	36
4 OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo Geral	37
4.2 Objetivos Específicos	37
5 METODOLOGIA	38
5.1. População de estudo	38
5.2 Vírus	39
5.3 Extração do RNA viral	39
5.4 One-step RT-PCR em tempo real	40

5.4.1	Quantificação da carga viral das amostras séricas.....	42
5.5	RT-PCR convencional e semi <i>nested</i> -PCR com <i>primers</i> para a região gênica C e prM.....	43
5.6	RT-PCR convencional e multiplex-semi- <i>nested</i> com <i>primers</i> para a região gênica NS5.....	45
5.7	Avaliação da sensibilidade da técnica de RT-PCR segundo os protocolos de Lanciotti et al. (1992) e Bronzoni et al. (2005).....	47
5.8	Análise dos dados.....	47
6	RESULTADOS.....	48
6.1	Aplicação do <i>One-step</i> RT-PCR em tempo real para detecção de genomas de DENV em amostras séricas humanas.....	50
6.1.1	Quantificação da carga viral das amostras séricas.....	56
6.2	Adaptação da semi <i>nested</i> -RT-PCR convencional com <i>primers</i> a região gênica C e prM.....	57
6.3	Adaptação da RT-PCR seguido de multiplex-semi- <i>nested</i> com <i>primers</i> para a região gênica NS5.....	60
6.4	Aplicação das reações de multiplex-semi- <i>nested</i> -RT-PCR convencionais (Lanciotti e Bronzoni) para detecção de genomas de DENV em amostras séricas humanas.....	62
6.5	Comparação entre <i>One-step</i> RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional.....	70
6.6	Avaliação da sensibilidade da técnica de Lanciotti et al. (1992) e Bronzoni et al. (2005).....	72
7	DISCUSSÃO.....	76
8	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	95
	APÊNDICE B – Obtenção da cepa viral D3BR/RP1/2003 de DENV-3, utilizado na curva padrão para quantificação da carga viral.....	97
	ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CESMAC.....	98

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença transmitida aos seres humanos por artrópodes vetores, através da picada de mosquitos infectados com o vírus, sendo o principal transmissor o *Aedes aegypti* (BRASIL, 2010a). O vírus dengue (DENV) é um arbovírus de RNA da família *Flaviviridae* e que pertence ao gênero *Flavivirus*. São conhecidos classicamente quatro sorotipos do vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 (LANCIOTTI et al., 1992; GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2010), no entanto, recentemente foi também descrito um quinto sorotipo viral (NORMILE, 2013). A infecção pelo vírus dengue causa doença que pode variar de formas assintomáticas, doença febril inespecífica, dengue clássica e até quadros com fenômenos hemorrágicos e choque, podendo evoluir para o óbito. O diagnóstico laboratorial específico para a confirmação da doença pode ser realizado através da pesquisa de anticorpos, isolamento viral, detecção do genoma do vírus pelo método da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e detecção de antígenos NS1; ainda, nos casos fatais, por imuno-histoquímica (BRASIL, 2010a). A RT-PCR permite a detecção precoce da infecção, além de possibilitar a identificação do sorotipo viral presente em amostras biológicas humanas, sendo útil para o diagnóstico e para estudos epidemiológicos (LANCIOTTI et al., 1992; DE PAULA; FONSECA, 2004; FIGUEIREDO, 2006).

Em termos epidemiológicos, a dengue é a mais importante arbovirose humana, por ter alta incidência mundial e ampla distribuição do vetor (WHO, 2009). No Brasil, a dengue é doença de notificação compulsória e, dessa forma, todos os casos suspeitos de dengue sejam confirmados ou não devem ser notificados à Vigilância Epidemiológica do município (BRASIL, 2009). No país, o número de casos para o ano de 2013 foi de 1.470.487 (BRASIL, 2014a). Em Alagoas, a dengue é um problema de saúde pública desde 1986, onde se tornou endêmica, com a circulação de três sorotipos desde 2002 e introdução do DENV-4 em 2012. A ocorrência da transmissão hiperendêmica implicou nas formas graves da doença (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994; ESTADO DE ALAGOAS, 2013, 2014a). Nos dois últimos anos, 25.893 casos de dengue foram confirmados no ano de 2012 e 8.009 no ano de 2013, segundo os dados do boletim SESAU-ALAGOAS (Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas), da semana 52 do ano de 2013, (ESTADO DE ALAGOAS, 2014b).

No estado de Alagoas, o diagnóstico laboratorial de dengue é realizado apenas por sorologia (pesquisa de antígeno NS1 e de anticorpos IgM) e isolamento viral. Em vista disso,

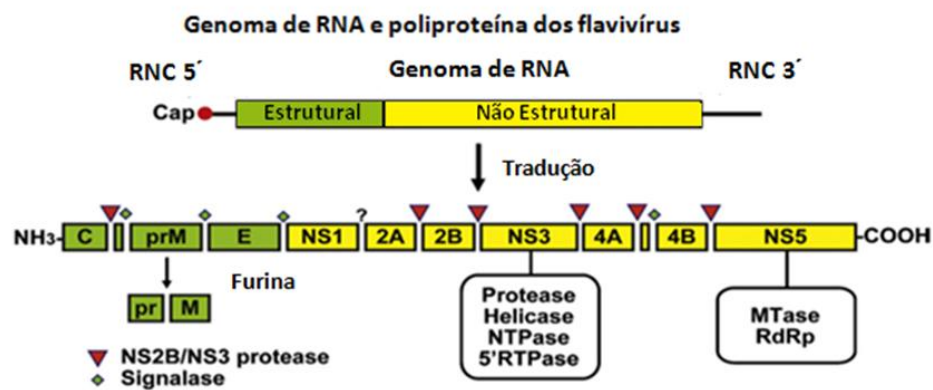
o presente trabalho se propôs a realizar técnicas moleculares para a identificação do genoma dos diferentes sorotipos de DENV, em amostras séricas de pacientes com a suspeita clínica, visando ao diagnóstico molecular da doença. Essas técnicas podem ser utilizadas para diagnóstico mais rápido e preciso das infecções humanas por dengue, possibilitando análises posteriores mais elaboradas, como a discriminação de sorotipos e genotipos dos DENV circulantes em Alagoas, além de estudos de associação entre a gravidade da doença e o genotipo viral. Desse modo, esse estudo pretendeu auxiliar no diagnóstico e no conhecimento dos sorotipos de DENV circulantes em Alagoas, considerando que tais dados são altamente relevantes à vigilância e às ações de prevenção e controle da dengue na região.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus dengue

Os vírus dengue (DENV) são arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, os quais apresentam vírions esféricos com aproximadamente 50nm de diâmetro, possuem envelope lipídico e genoma de RNA, de cadeia simples, polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb (GUBLER, 1998). O RNA viral apresenta estrutura cap na extremidade 5', mas não possui cauda polyA na extremidade 3' (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Os *Flavivirus* possuem uma única sequência aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), que é flanqueada por regiões não codificantes (RNC5', RNC3'). A RNC5' possui aproximadamente 100 nucleotídeos e a RNC3' cerca de 400 a 700 nucleotídeos (**Figura 1**) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A ORF codifica uma poliproteína, a qual é clivada em três proteínas estruturais (C-prM-E) e sete proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (**Figura 1**). As proteínas estruturais são as seguintes: proteína do capsídeo (C), pré M, que é precursora da proteína da membrana (M), e glicoproteína E do envelope viral (ROMANOS, 2008).

Figura 1 - Sequência aberta de leitura do genoma dos flavivírus e o processamento da poliproteína. Proteínas estruturais: do capsídeo (C), da membrana (M) e glicoproteína do envelope (E). Proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).



Fonte: Adaptado de SAMPATH e PADMANABHAN (2009).

A proteína C é básica e tem aproximadamente 11 kDa (LINDENBACH; RICE, 2003). Esta proteína se une ao RNA viral para originar o nucleocapsídeo e atua na montagem da partícula do vírus. O precursor da proteína M (prM) possui aproximadamente 26 kDa e é necessário para a dobragem correta e estabilização da proteína E (LINDENBACH; RICE, 2003; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína E possui aproximadamente 53 kDa, é a proteína principal de superfície do vírion, atuando na ligação e entrada do vírus na célula e é alvo de anticorpos neutralizantes. As subunidades individuais da proteína E consistem de três domínios de estrutura *beta-barrel* denominados: domínios I, II e III. Embora a neutralização dos DENV dependa da ligação de anticorpos a epítopos localizados nos três domínios, a região mais fortemente imunogênica e neutralizante nesses vírus é o domínio III da proteína E (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; WAHALA; SILVA, 2011).

A glicoproteína NS1 (~46 kDa), a proteína NS2A (~22 kDa), a proteína NS3 (~70 kDa) e a proteína NS5 (~103 kDa) são importantes para a replicação do RNA viral. A proteína NS1 pode ser localizada no interior da célula, na superfície da célula e pode ser secretada para o meio extracelular. Esta proteína participa da síntese da fita negativa do RNA (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; MULLER, 2011). A NS2A é uma proteína que está envolvida na montagem do vírus. Já a proteína NS2B tem aproximadamente 14kDa e está associada à proteína de membrana. Ela se une com a NS3 atuando como um co-fator da serina protease NS3. A proteína NS3 é multifuncional e atua no processamento da poliproteína, tem atividade de protease viral (helicase/NTPase, RTPase) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). As proteínas NS4A e NS4B são pequenas e possuem 16 e 27 kDa, respectivamente, e estão implicadas na localização apropriada de proteínas virais e montagem do vírion (LINDENBACH; RICE, 2003; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Uma interação entre NS1 e NS4A é necessária para a função da replicase. A proteína NS5 é altamente conservada, atua no processamento da poliproteína e desempenha a atividade de polimerase (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

2.2 Replicação viral

A entrada dos vírus nas células alvo ocorre através de endocitose mediada por receptores. Os vírus são liberados no citoplasma após fusão envelope viral com a membrana

do endossoma, dependente do meio ácido e de alterações conformacionais na glicoproteína do envelope (E) (MODIS et al., 2004; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). O RNA viral livre no citoplasma codifica a poliproteína precursora. Em seguida, na membrana do retículo endoplasmático (RE), há o processamento pré- e pós-traducional pela clivagem das proteases do hospedeiro e virais, originando as três proteínas estruturais (C-prM-E) e as sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4A, NS4B e N55) (LINDENBACH; RICE, 2003; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; MULLER, 2011). Após a tradução do RNA viral, a proteína C e as proteínas não estruturais NS2a, NS2b, NS3, NS4A, NS4B e N55 são liberadas para o citoplasma (LINDENBACH; RICE, 2003; MULLER, 2011).

Em seguida, a replicação inicia com a síntese da fita negativa de RNA (ssRNA⁻), a qual é utilizada na formação de uma dupla fita de RNA, a partir da qual são originadas numerosas cópias de RNA de cadeia positiva (ssRNA⁺). A montagem do vírion ocorre na superfície do RE, onde o RNA viral se une com a proteína C, formando o nucleocapsídeo, o qual é empacotado na bicamada lipídica RE que contém as glicoproteínas prM e E. Os vírus imaturos e não infecciosos seguem para o lúmen do RE e são transportados para o trans-Golgi, onde ocorre a maturação do vírus, através da clivagem da proteína prM em proteína M, mediada pela furina. As partículas infecciosas são liberadas por exocitose para o meio extracelular (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; MULLER, 2011).

2.3 Classificação antigênica dos flavivírus e Sorotipos de DENV

Todos os membros do gênero *Flavivirus* mostram sítios antigênicos comuns como revelado em ensaios clássicos de inibição de hemaglutinação (IH), nos quais se utilizou soros imunes policlonais, e que levou à base da classificação dos membros dos flavivírus (SABIN, 1952; SABIN, 1953; CASALS; BROWN, 1954). Por outro lado, os ensaios de neutralização viral são mais discriminatórios para a definição antigênica, e podem ser usados para distinguir espécies virais dentro de um mesmo gênero, bem como para definir subgrupos intimamente relacionados (BURKE; MONATH, 2001). Com base nos resultados de neutralização-cruzada utilizando antissoros policlonais hiperimunes os flavivírus foram divididos em grupos pertencentes a sorocomplexos antigênicos distintos, sendo que os vírus DENV formam juntos um destes sorocomplexos (grupo Dengue) (BURKE; MONATH, 2001).

A proteína E do envelope dos flavivírus é uma hemaglutinina viral e compõe o alvo primário para neutralização por anticorpos (BURKE; MONATH, 2001; DOWD; PIERSON, 2011), apresentando inúmeros epítomos, sendo que a neutralização efetiva dos vírions requer a ligação a múltiplos anticorpos (WAHALA; SILVA, 2011). Os dados de neutralização-cruzada na HI de anticorpos policlonais (heterólogos) e monoclonais (homólogos) refletem diferenças na estrutura antigênica da proteína E, e fornecem evidência para a presença de determinantes antigênicos de grupos, sorocomplexos, e sorotipos virais (BURKE; MONATH, 2001).

Dessa forma, segundo as propriedades antigênicas determinadas em ensaios sorológicos, são conhecidos classicamente quatro sorotipos do vírus dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 (HENCHAL; PUTNAK, 1990). No entanto, recentemente, foi também descrito um quinto sorotipo viral, o qual foi detectado em uma amostra de soro/sanguínea de um caso grave de uma epidemia que ocorreu em 2007, na Malásia. Esta amostra foi inicialmente diagnosticada como DENV-4, mas através do sequenciamento foi descoberto que o vírus ocupa um novo ramo na árvore genealógica dos DENV. Acredita-se que não existe ciclo de transmissão deste quinto sorotipo entre humanos, porém suspeita-se que há circulação entre os primatas não-humanos (NORMILE, 2013).

Os sorotipos de DENV possuem epítomos sorotipo-específicos e epítomos que são comuns entre todos os vírus DENV. Por essa razão, apesar da reatividade cruzada entre os diferentes sorotipos de DENV, os anticorpos gerados numa infecção primária com determinado sorotipo evitam apenas a re-infecção do indivíduo com o mesmo sorotipo (sorotipo homólogo). Esses indivíduos são, portanto, suscetíveis a infecções subsequentes com sorotipos diferentes de DENV (sorotipo heterólogo) (BURKE; MONATH, 2001). Além disso, os anticorpos heterófilos são paradoxalmente associados ao aumento da gravidade da doença nos indivíduos re-infectados com dengue (SIERRA et al., 2012). A principal teoria proposta para explicar o aumento do risco de doença grave em casos de infecção secundária é a chamada imunoamplificação-dependente de anticorpo (Antibody-dependent enhancement ou ADE), que postula que anticorpos fracamente neutralizantes, produzidos na primeira infecção contra um sorotipo, se liguem a receptores Fc γ R de monócitos e macrófagos e assim aumentem a taxa de infecção destas células, levando a respostas inflamatórias exacerbadas e deletérias ao paciente (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977; HALSTEAD, 1988; SIERRA et al., 2012).

Os diferentes tipos de DENV compartilham entre 62% a 77% da sequência de seus aminoácidos, sendo DENV-1 e DENV-3 os mais estreitamente relacionados (77% de

homologia), seguido de DENV-2 (69%) e de DENV-4 (62%) (BURKE; MONATH, 2001). Contudo, análises mais extensas e baseadas nas sequências nucleotídicas dos genomas de cada sorotipo revelaram um elevado grau de diversidade intra-sorotipo (diferenças de aminoácidos de até 10% na proteína E) e permitiu a identificação de diferentes genotipos dentro de cada sorotipo viral (RICO-HESSE, 1990; LEWIS et al., 1993; RICO-HESSE, 2003; AMARILLA et al., 2009).

2.3.1 Genotipos de DENV

Nos quatro sorotipos do DENV há uma divergência de aproximadamente 30% na sequência de nucleotídeos de todo o genoma. Os genotipos de DENV são identificados através do sequenciamento da região das junções dos genes E/NS1, também da sequência completa do gene E e do genoma completo (GONÇALVEZ et al., 2002; RICO-HESSE, 2003; FÉRES, 2008; BARBOZA, 2013).

Cada genotipo de DENV apresenta diversidade genética extensa e resulta em grupos filogeneticamente distintos, embora não haja consenso sobre os critérios para a definição de diferentes genotipos (RICO-HESSE, 2003; HOLMES, 2009). É sabido, contudo, que os genotipos apresentam potencial patogênico e distribuição geográfica distintos (RICO-HESSE, 2003; HOLMES, 2009; WAHALA; SILVA, 2011). Desse modo, os genotipos de DENV têm sido utilizados como ferramentas para determinar a origem e a propagação de epidemias de dengue (TRENT et al., 1983; RICO-HESSE, 1990; LANCIOTTI; GUBLER; TRENT, 1997; RICO-HESSE, 2003; AMARILLA et al., 2009; ALFONSO et al., 2012). Genotipos dos quatro sorotipos de DENV, com base na sequência completa do gene E, são apresentados no **Quadro 1** (GONÇALVEZ et al., 2002; CARNEIRO, 2009). No entanto, a classificação dos genotipos se expandirá à medida que mais cepas de cada sorotipo dengue forem sendo examinadas (RICO-HESSE, 2003). No Brasil, de acordo com publicações de grupos de pesquisa nacionais, os genotipos de DENV circulantes são listados no **Quadro 2**.

Quadro 1 – Distribuição geográfica dos genótipos dos DENV no mundo.

Sorotipo	Genótipo
DENV-1	Genótipo I - Havaí, China, sudeste da Ásia e leste da África
	Genótipo II – Tailândia
	Genótipo III – Malásia
	Genótipo IV - Oeste do Pacífico e Austrália
	Genótipo V - Américas, Oeste da África e Ásia
DENV-2	Genótipo I (subtipo I) – Asiático I – Malásia e Tailândia
	Genótipo II (subtipo III) – Asiático II- Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Genótipo (subtipo IV) - Austrália, Leste e Oeste da África, ilhas do Oceano Índico e Pacífico, subcontinente indiano e Oriente Médio.
	Genótipo Americano (subtipo V) – América Latina, Caribe, subcontinente indiano, ilhas do Pacífico
	Genótipo Americano/Sudeste Asiático (VI) – Tailândia, Vietnã, América
	Genótipo silvestre – Oeste da África e Sudeste da Ásia
DENV-3	Genótipo I - Indonésia, Malásia, Filipinas, ilhas do Sul do Pacífico
	Genótipo II - Tailândia, Vietnã e Bangladesh;
	Genótipo III - Sri Lanka, Índia, África e Samoa
	Genótipo IV - Porto Rico, América Latina e Central e Tahiti
DENV-4	Genótipo I - Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão
	Genótipo II - Indonésia, Malásia, Tahiti, Caribe e América
	Genótipo III – Tailândia
	Genótipo IV – Malásia (cepas silvestres)

Fonte: GONÇALVEZ et al., 2002; CARNEIRO, 2009; DRUMOND et al., 2013.

Quadro 2 – Distribuição geográfica dos genótipos dos DENV no Brasil.

Sorotipo	Genótipo
DENV-1	Genótipo I – Rondônia, 2007 (Proteína NS1)
	Genótipo I – São Paulo, 2005 (junção E/NS1)
	Genótipo I – São Paulo, 2004 (junção E/NS1)
DENV-2	Genótipo III – Ceará, 2006 (junção E/NS1, préM, M e E)
	Genótipo III – São Paulo, 2005 (junção E/NS1)
	Genótipo III – São Paulo, 2004 (junção E/NS1)
	Genótipo III – Rio de Janeiro, 2003 (junção E/NS1)
	Genótipo III – Rio de Janeiro, 2002 (genoma completo) (junção E/NS1)
DENV-3	Genótipo I – Minas Gerais, 2008 (proteína C, préM, M e E)
	Genótipo III (subtipo C) – Rio de Janeiro, 2002 (proteína C, préM, M e E)
	Genótipo III – São Paulo, Roraima, Mato Grosso, Góias, Amazonas, Rondônia e Pará (proteína E)
	Genótipo III – Rio de Janeiro, 2006 (genoma completo)
	Genótipo III – Ceará, 2006 (junção E/NS1, préM, M e E)

Fonte: Adaptado de FÉRES, 2008.

Em relação à associação dos diferentes DENV com a clínica da doença, alguns estudos têm demonstrado que os sorotipos que podem causar doença com maior gravidade são o DENV-2 e o DENV-3 (VAUGHN et al, 2000; NISALAK et al, 2003; PEREIRA et al., 2004; BALSAMEDA et al., 2006). Já em relação aos genótipos, as cepas do Sudeste Asiático (DENV-2) são associadas às formas mais graves de dengue, pois os vírus replicam de maneira mais eficiente nas células dendríticas humanas, do que aquelas cepas do genótipo Americano (RICO-HESSE et al., 1997; COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005). Além disto, comparou-se as cepas das duas linhagens (asiática e americana) de DENV-2 em relação à sua capacidade de infectar e de se difundir em várias populações do *Aedes aegypti* (ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2003). O genótipo do Sudeste Asiático apresentou maiores taxas de infecção disseminada, sugerindo que os vetores e os hospedeiros humanos selecionaram as cepas mais virulentas do genótipo do Sudeste Asiático (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

2.4 Epidemiologia da dengue

2.4.1 Transmissão

Os DENV são transmitidos aos seres humanos principalmente através dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* infectados, os quais introduzem o vírus no hospedeiro durante o repasto sanguíneo (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Novos mosquitos se tornam infectados ao se alimentarem do sangue de indivíduos virêmicos ou pela transmissão transovariana (FIGUEIREDO, 2007). O ciclo que envolve o ser humano, *Aedes aegypti* e outro ser humano é chamado de ciclo urbano, que é o mais comum. Na África e na Ásia, ocorre também o ciclo silvático (enzoótico) que envolve primatas não humanos e outras espécies de mosquito do gênero *Aedes*, tais como *A. furcifer*, *A. luteocephalus* e *A. taylori* (CARDOSA et al., 2009).

Os fatores que contribuem para o aumento das populações de mosquitos e do contato entre os mosquitos vetores e o homem são os seguintes: urbanização, desmatamento, condições precárias de habitação, esgoto e gestão de resíduos e a falta de sistemas de coleta e armazenamento de água confiáveis. A distribuição e transmissão dinâmica das doenças por arbovírus também sofreram uma grande influência pelas mudanças demográficas globais que resultaram de transporte moderno (GUBLER, 2002).

Nos últimos anos, ocorreu um aumento na distribuição geográfica do vírus e do seu vetor o *Aedes aegypti* (GUBLER, 2005). Estes fatores levaram à emergência de epidemias de dengue em várias regiões do mundo (GUBLER, 1998, 2005). Os números de casos de dengue vêm crescendo mundialmente. Atualmente, cerca de 2,5 bilhões de pessoas (mais de 40% da população mundial) estão em risco de infecção de dengue. Estima-se que, a cada ano, possam ocorrer de 50 a 100 milhões de casos de dengue no mundo (WHO, 2014).

2.4.2 Aspectos clínicos

A infecção pelo DENV causa doença que pode variar de formas assintomáticas, à febre do dengue (DF), caracterizada por febre alta e dores generalizadas e sangramento ocasional de menor gravidade, até formas graves de doença com fenômenos hemorrágicos,

conhecidas como Febre Hemorrágica do Dengue (DHF), com ou sem choque, e a Síndrome do Choque do Dengue (DSS) que podem ser fatais (HALSTEAD, 2007).

Porém, houve uma recente atualização na classificação das formas de dengue e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO), os casos de dengue passaram a ser classificados como: dengue; dengue com sinais de alarme e dengue grave, a partir de 2014 (BRASIL, 2014c). Desse modo, no Brasil, segundo o Ministério da Saúde a definição de “Caso de dengue” é feita com base nos critérios apresentados na **Tabela 1**. Porém, a terminologia dos casos de dengue segundo a classificação anterior (DF, DHF, DSS) continua sendo amplamente utilizada (WHO, 2009; PEELING et al., 2010; SIERRA et al., 2012).

Tabela 1 – Critérios atualizados definidos para caso suspeito de dengue.

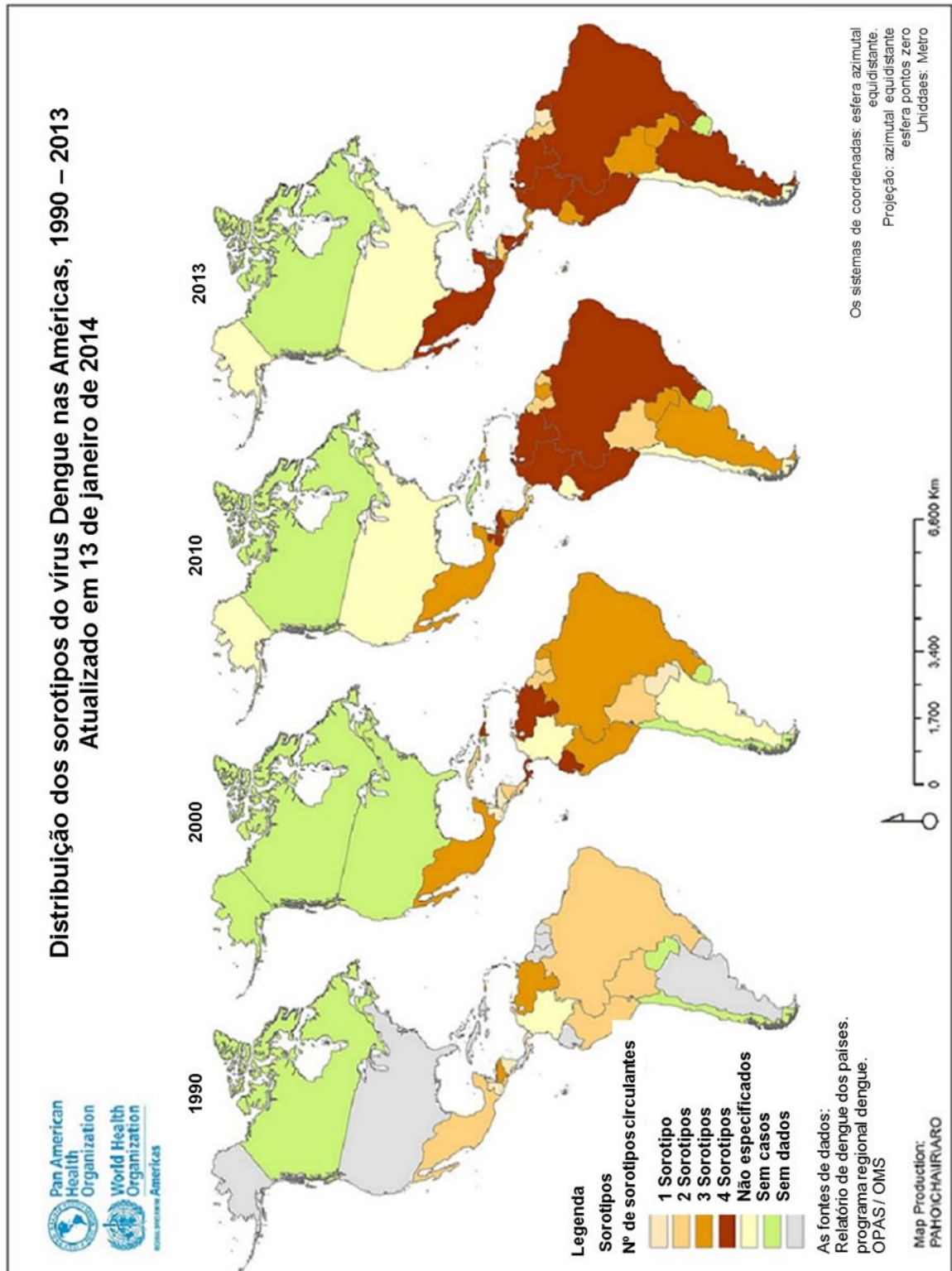
Síndrome suspeita	Critérios clínicos e laboratoriais
Dengue	Paciente que apresente febre, entre 2 e 7 dias, acompanhada de duas ou mais das seguintes manifestações: náusea, vômitos; exantema; mialgias, artralgia; cefaleia, dor retroorbital; petéquias ou prova do laço positiva; leucopenia.
Dengue com sinais de alarme	Todo caso de dengue que, no período de defervescência da febre apresenta um ou mais dos seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdomen; vômitos persistentes; acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico); sangramento de mucosas; letargia ou irritabilidade; hipotensão postural (lipotímia); hepatomegalia maior do que 2 cm; aumento progressivo do hematócrito.
Dengue grave	É todo caso de dengue que apresenta um ou mais dos seguintes resultados: Choque devido ao extravasamento grave de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior a três segundos, pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mm Hg; hipotensão arterial em fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória; Sangramento grave , segundo a avaliação do médico (exemplos: hematêmese, melena, metrorragia volumosa, sangramento do sistema nervoso central); Comprometimento grave de órgãos tais como: dano hepático importante (AST o ALT > 1000), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos.

Fonte: BRASIL, 2014c.

2.4.3 Dengue nas Américas e no Brasil

A dengue é uma doença de origem asiática ou africana, porém atualmente tem distribuição cosmopolita, causando inúmeras epidemias anuais em diferentes partes do mundo (WILDER-SMITH; GUBLER, 2008). Nas Américas, nas últimas décadas, a primeira epidemia com o DENV-1 foi relatada no ano de 1977, na Jamaica, e se expandiu para outros países (MARTÍN et al., 2010). Em 1981, a primeira epidemia da forma hemorrágica da doença causada DENV-2 foi relatada em Cuba (KOURI, 1989; MARTÍN et al., 2010). No mesmo ano, nas ilhas do Caribe Oriental, relatou-se a presença do DENV-4, o qual se expandiu para outros países. Em 1989, registrou-se uma segunda epidemia da forma hemorrágica da doença, na Venezuela (MARTÍN et al., 2010). O vírus DENV-3 foi detectado em 1994 numa epidemia na Nicarágua, e em seguida se expandiu para o México, Caribe, América Central e América do Sul (GUZMAN et al., 1996; GUBLER, 1998; ARAÚJO et al., 2012). Atualmente, nas Américas, encontram-se os quatro sorotipos do DENV (**Figura 2**). E no ano 2013, 2.350.000 casos de dengue foram notificados nas Américas, sendo que 37.687 eram de dengue grave (WHO, 2014).

Figura 2 - Distribuição dos quatro sorotipos do DENV nas Américas, de 1990 a 2013.



Fonte: Adaptado de OPAS/OMS, 2014.

No Brasil, o DENV-1, provavelmente, foi introduzido nos anos 80. Sendo os primeiros casos na região Norte, em Roraima (1981), e na região Sudeste (1986, no Rio de Janeiro) (OSANAI et al., 1983; SCHATZMAYR, NOGUEIRA, ROSA, 1986). A introdução do DENV-2 foi detectada em 1990, no Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 1990; NOGUEIRA et al., 1991), e posteriormente, na mesma cidade, foi detectado o primeiro caso autóctone do DENV-3, em 2000 (NOGUEIRA et al., 2001). O DENV-4 foi detectado em 1981 em Roraima (OSANAI et al., 1983), tendo ressurgido somente em 2008, em Manaus (FIGUEIREDO et al., 2008) e disseminou-se pelo país durante os anos seguintes, tendo sido reconhecida pelo Ministério da Saúde a presença do DENV-4 no país, somente no ano de 2010 (BRASIL, 2010b).

Atualmente, o Brasil ocupa a primeira posição em número de casos registrados de DF no mundo (TEIXEIRA, 2012). O país encontra-se, portanto, em grave situação de hiperendemicidade (TEIXEIRA et al., 2009) com a circulação simultânea dos quatro sorotipos virais e com o aumento na incidência de casos graves da doença. Segundo o Ministério da Saúde, só em 2014, foram registrados 515.663 casos de dengue no país até a semana epidemiológica 22 (25/05 a 31/05), sendo confirmados 236 casos de dengue grave, 3.324 casos com sinais de alarme e 149 óbitos. Em 2013 foram confirmados 500 óbitos por dengue no país. Nos meses de janeiro a maio de 2014 foram enviadas 6.321 amostras para realização do exame de isolamento viral nos centros de referência distribuídos no país, sendo 2.032 positivos (32,1%) e com as seguintes proporções dos sorotipos virais: DENV-1 (80,1%), seguido de DENV-4 (17,7%), DENV-2 (1,8%) e DENV-3 (0,4%) (BRASIL, 2014b).

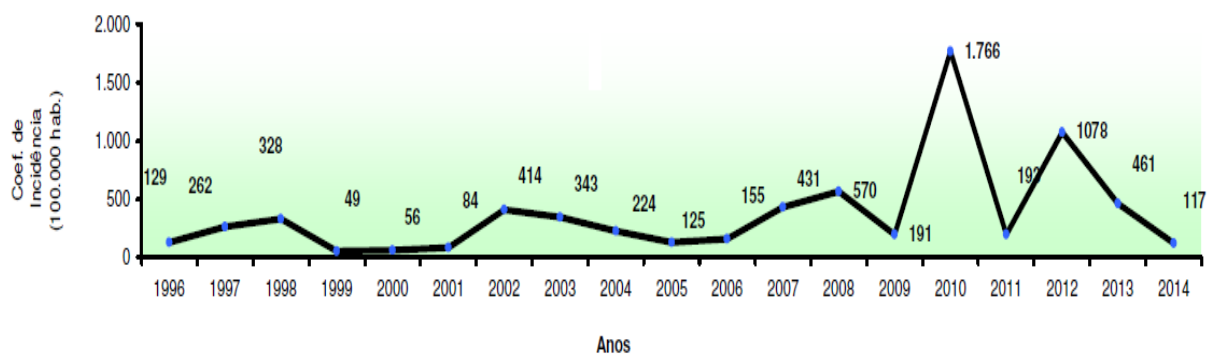
2.4.4 Dengue no estado de Alagoas e município de Maceió

Em Alagoas, a dengue é um problema de saúde pública e é considerada a doença endêmica de maior importância. O sorotipo DENV-1 foi introduzido no ano de 1986 no estado, e o DENV – 2, em 1991. Em 2002, detectou-se o DENV-3 em Alagoas, e em 2012 o DENV-4 foi introduzido (ESTADO DE ALAGOAS, 2014a). De 1996 a 2013, houve picos epidêmicos da doença em 1998, 2002, 2008, 2010 e 2012 (**Figura 3**). Provavelmente, o pico epidêmico do ano de 2002 ocorreu devido à introdução de um novo sorotipo, o DENV-3 (**Figura 3**). Neste ano, com a circulação simultânea de três sorotipos virais, elevados índices de infestação predial pelo *Aedes aegypti* e um grande número de indivíduos susceptíveis,

instalou-se o padrão de transmissão hiperendêmica, agravando-se na década atual. A transmissão hiperendêmica leva ao aumento da frequência das formas graves da dengue e, conseqüentemente, da letalidade. Os primeiros registros de internações de pacientes com dengue grave em UTI nos hospitais de Alagoas, bem como as quatro primeiras mortes no estado ocorreram em 2003 (ESTADO DE ALAGOAS, 2014b). Em 2008, houve pico de incidência da doença, provavelmente, devido a um alto índice de infestação predial pelo *Aedes aegypti*, em Maceió (**Figura 3**) (ESTADO DE ALAGOAS, 2009). O ano de 2010 foi o ano epidêmico mais crítico, provavelmente, devido as fortes enchentes causadas pela chuva neste ano, o que intensifica o risco para a ocorrência de casos novos de doenças transmissíveis (ESTADO DE ALAGOAS, 2010a, 2010b). No ano de 2012, com a introdução do sorotipo DENV-4, houve a maior ocorrência de formas graves da dengue (**Figura 3**). O *Aedes aegypti* infesta hoje 100% dos municípios alagoanos (ESTADO DE ALAGOAS, 2014a).

Apesar do grande número de casos anuais de dengue em Alagoas, o diagnóstico laboratorial oferecido na região ainda é precário. No ano de 2013, das amostras coletadas oportunamente de pacientes com diagnóstico clínico de dengue (amostras coletadas em até 5 dias após o início da doença), em Alagoas, e encaminhadas para o LACEN-AL, em nenhuma das tentativas de isolamento viral foi obtido sucesso na identificação dos sorotipos. Por causa disso, no referido ano, não é conhecido qual (ais) os sorotipos virais foram circulantes nos municípios (ESTADO DE ALAGOAS, 2014b).

Figura 3 - Incidência de Dengue, Alagoas de 1996 a 2014*.



Fonte: BRASIL, 2014a. SES- AL/SINAN. Dados tabulados em 12/05/2014, sujeitos a atualização.

2.5 Diagnóstico laboratorial da dengue

Os casos de dengue podem ser confirmados laboratorialmente por: pesquisa do antígeno viral NS1 por teste rápido ou ELISA, sorologia com a pesquisa de IgM e IgG, isolamento viral em cultura de células, pesquisa do genoma viral por RT-PCR e, para os casos fatais, pesquisa de antígenos virais nos tecidos por imuno-histoquímica (BRASIL, 2014c). No Brasil, a técnica padrão ouro para a identificação dos sorotipos do DENV é o isolamento viral (BRASIL, 2010a). No caso dos vírus isolados em cultura de células, para a identificação do sorotipo viral, utiliza-se a técnica de imunofluorescência, com antissoros sorotipo-específicos.

Os testes diagnósticos podem ser avaliados a partir da sensibilidade (porcentagem de amostras verdadeiramente positivas, como identificadas pelo ensaio de referência), especificidade (porcentagem de amostras verdadeiramente negativas, como identificadas pelo ensaio de referência) (PEELING et al., 2010). Levando em consideração estes parâmetros, a técnica de isolamento viral tem como vantagem a especificidade e identificação dos sorotipos. No entanto, esta técnica possui um alto custo financeiro, requer conhecimento e instalações adequadas, não diferencia infecção primária de infecção secundária, requer que a amostra seja coletada na fase de viremia (0-5 dias após o início), e para a sua leitura é necessário mais do que uma semana.

Já a técnica de RT-PCR, além de ser específica, é sensível; os resultados podem ser obtidos dentro de 24 a 48 horas; e permite identificar sorotipo e genotipo virais. No entanto, na RT-PCR, a amostra também precisa ser coletada no período de 0 a 5 dias após o início dos sintomas, e tem custo elevado.

A detecção do antígeno NS1 é outra opção no diagnóstico da dengue, pois apresenta uma fácil execução e possui um menor custo em relação ao isolamento e à RT-PCR. Em contrapartida, esta técnica tem menor sensibilidade quando comparada ao o isolamento e à RT-PCR. Já a detecção de IgM em amostra única, tem o menor custo e identifica prováveis casos de dengue, sendo útil para vigilância, nos rastreamentos de surtos e na monitoração da eficácia de intervenções. Porém, em infecções secundárias, a quantidade de IgM pode ser baixa ou mesmo indetectável. A soroconversão de IgM e IgG é também acessível quanto ao custo, possui uma execução fácil e possibilita diferenciação entre infecção secundária e infecção primária. Como desvantagem, tem-se que a quantidade de IgM pode ser baixa nas infecções secundárias, e a confirmação da doença requer a coleta pareada de duas ou mais

amostras de soro. (PEELING et al., 2010). Finalmente, a imuno-histoquímica além de não ser tão sensível quanto o isolamento viral ou a detecção de RNA, só está disponível para os casos fatais de infecção.

2.5.1 RT-PCR convencional

Para a detecção molecular de dengue já foram descritos diversos protocolos de RT-PCR com *primers* distintos (LANCIOTTI et al., 1992; BRONZONI et al., 2005; KUMARIA; CHAKRAVARTI, 2005; AQUINO et al., 2006). No entanto, tem sido adotado como padrão ouro para este tipo de diagnóstico o RT-PCR com os *primers* descritos por Lanciotti et al. (1992), segundo a OMS (WHO, 2009). Vários pesquisadores têm se utilizado desse método com diversas adaptações (POERSCH et al., 2005; GOMES et al., 2007; CASTRO, 2008; PAUDEL et al., 2011).

Variações do método original têm sido padronizadas para otimizar tempo e custos, como por exemplo, as reações de passo único (*one-step*). Da mesma forma, tentativas de aumentar a sensibilidade dos testes moleculares foram realizadas ao se padronizar diferentes protocolos de PCR em tempo real (SHU et al., 2003; CHIEN et al., 2006; SANTOS et al., 2008; PAUDEL et al., 2011).

2.5.2 RT-PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real possibilita acompanhar a amplificação e visualizar dados de forma mais rápida que o convencional, pois não é necessária a realização de eletroforese. Ela também possui maior sensibilidade do que a RT-PCR convencional e o isolamento (MACKAY et al., 2002; POERSCH et al., 2005). Um ganho na realização desta técnica é a possibilidade de quantificação do material amplificado com base em fluorescência, a qual é realizada na fase exponencial da reação, no ponto chamado ciclo limiar (*threshold cycle- C_t*). Para tal, adiciona-se à reação um fluorocromo que, no caso do, ocorre a ligação entre este e a dupla fita de DNA, que quando é excitado pela luz emitida pelo aparelho, libera fluorescência verde (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002; NOVAIS; ALVES, 2004). A

utilização *SYBR® Green* tem como vantagem o baixo custo em relação a outros compostos fluorescentes, como sondas específicas (LAI et al., 2007).

Nestas reações, para se considerar positiva a amostra, então, deve-se verificar a temperatura de dissociação/ *melting*) (T_m - temperatura onde metade do produto da PCR está dissociado/ desnaturado) e o ciclo limiar/ *threshold cycle* (C_t - o número de ciclos necessários para que a amplificação se torne detectável) específicos para o genoma pesquisado (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

O software do aparelho de PCR em tempo real utiliza uma linha de base (*baseline*) para calcular o limiar (*threshold*) de ciclo de reação de PCR em tempo real (limiar usualmente é calculado como dez vezes o desvio padrão do valor da linha de base). A linha de base é construída automaticamente como sendo o limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento, nos estágios iniciais da PCR, quando há pouca mudança no sinal fluorescente, sendo que qualquer sinal abaixo da linha de base é considerado ruído de fundo do equipamento (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

Em relação à pesquisa de dengue por RT-PCR em tempo real, pode-se utilizar *primer* específico para o gênero *Flavivirus*, mas a T_m deve ser específica para a espécie DENV, o que é determinado previamente, em protocolos de padronização das reações nas quais se utiliza cepas padrões do vírus (SANTOS et al., 2008). Para a escolha dos *primers*, deve-se considerar uma região altamente conservada do genoma dos vírus DENV, a qual pode ser aquela que fica localizada na extremidade 5' do genoma viral (POLONI, 2009).

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos vêm ocorrendo no estado de Alagoas surtos e epidemias de dengue, em número crescente, a cada ano, e com o aumento do número de casos graves da doença. Para citar somente o ano da maior epidemia, em 2012, os 102 municípios alagoanos notificaram 33.629 casos suspeitos de dengue, sendo registrados 552 casos suspeitos da forma grave da doença (ESTADO DE ALAGOAS, 2013). Apesar dos dados alarmantes, o diagnóstico laboratorial das infecções por DENV no estado ainda não é realizado em número equivalente à quantidade de casos da doença. Muitos dos casos suspeitos notificados recebem apenas o diagnóstico clínico e epidemiológico de dengue, não possibilitando a confirmação etiológica da doença nem muito menos o sorotipo viral envolvido.

Análises moleculares sobre os vírus dengue circulantes são importantes, na medida em que permitem o conhecimento do perfil epidemiológico para esta enfermidade em cada região, detectando sorotipos e genotipos mais frequentes, verificando precocemente a introdução de um novo sorotipo, e ainda, na tentativa de se encontrar fatores prognósticos, numa possível associação de sorotipo e gravidade da doença.

Desse modo, este trabalho visou contribuir para o diagnóstico etiológico dos casos de dengue em Maceió, e para a definição dos sorotipos circulantes no município. Tais dados são de relevância para a melhor compreensão da epidemiologia da dengue na região.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Detectar e identificar o genoma do vírus dengue em pacientes com a suspeita clínica da doença, atendidos em Maceió/AL, por meio de técnicas de RT-PCR e comparar o desempenho das mesmas.

4.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de genoma de vírus dengue em amostras séricas humanas coletadas de pacientes com suspeita clínica, pelas técnicas de: *One-step* RT-PCR em tempo real, multiplex semi-*nested*-PCR e *nested*-PCR.
- Determinar os sorotipos de dengue detectados nas amostras incluídas no estudo.
- Comparar a frequência de positividade das amostras obtida pelos métodos de multiplex semi-*nested*-PCR, *nested*-PCR e *One-step* RT-PCR na detecção de genoma de dengue e comparar a sensibilidade do limite de detecção dos métodos de RT-PCR convencional utilizados.
- Quantificar a carga viral nas amostras positivas na técnica em tempo real.

5 METODOLOGIA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CESMAC (Centro de Estudos Superiores de Maceió) sob protocolo nº 1384/2012 (Anexo A).

Este estudo é do tipo investigação analítico-descritiva, transversal e observacional, de cunho epidemiológico.

5.1 População de estudo

Os pacientes incluídos no estudo, de cujas amostras sanguíneas foram obtidas, foram recrutados no período de agosto de 2012 a abril de 2014, nas seguintes unidades de saúde de Maceió: no Hospital Escola Dr. Hélio Auto (HEHA), no PAM Bebedouro e no Hospital UNIMED. Algumas amostras foram também colhidas de pacientes que foram visitados em seus domicílios. Indivíduos de ambos os sexos, sem exclusão por faixa etária e que apresentaram quadro clínico compatível com dengue foram incluídos na pesquisa.

Para a maioria dos pacientes foram utilizados os critérios preconizados pelo Ministério da Saúde para se considerar um paciente com suspeita de dengue (apresentados na **Tabela 1** do item 2.5). Resumidamente, foram os seguintes: pacientes que apresentaram doença febril aguda, com duração máxima de sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos sinais ou sintomas como: cefaleia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, prostração ou exantema, associados ou não a presença de sangramentos ou hemorragias (BRASIL, 2014c). As informações sobre a data de início dos sintomas nos pacientes foram obtidas através de entrevistas e/ou prontuários. Excepcionalmente, contudo, amostras de alguns pacientes com os critérios clínicos acima descritos, mas que se encontravam já além do sétimo dia de doença tiveram também suas amostras coletadas e incluídas no estudo.

Após a explicação sobre o trabalho e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) pelo paciente, realizou-se coleta de 5 mL de sangue, em tubo sem anticoagulante. No caso dos pacientes menores de idade, a autorização através do TCLE ocorreu através da assinatura do seu responsável. Como critério de exclusão adotado foi a não assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos para obtenção dos soros. Os mesmos foram alíquotados e estocados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou em nitrogênio líquido, para o uso posterior.

5.2 Vírus

As cepas do DENV utilizadas como controles positivos neste trabalho foram obtidas da viroteca do Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), da Universidade de São Paulo. As mesmas foram cultivadas *in vitro* em células C6/36 de *Aedes albopictus* e células VERO E6 de *Cercopithecus aethiops* (rim de macaco verde africano) para produção de estoques virais, no Laboratório de Virologia da FCFRP-USP e no LAPEVI/ICBS/UFAL (Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia). Os isolados virais foram recolhidos do sobrenadante celular após 7 dias de infecção, e as alíquotas foram divididas e estocadas em nitrogênio líquido e em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. As cepas virais utilizadas foram as seguintes: DENV-1 cepa MOCHIZUCKI, com título de $6,75 \times 10^6$ PFU/mL; DENV-2 cepa NGC, com título de $7,5 \times 10^6$ PFU/mL; DENV-3 cepas BR/SL3/02, com título de $1,6 \times 10^6$ PFU/mL e H87 (título ainda não determinado); DENV-4 cepa H241 com título de $1,625 \times 10^7$ PFU/mL.

5.3 Extração do RNA viral

A extração dos RNAs virais a partir das amostras de soro ($150\text{ }\mu\text{L}$) e das alíquotas de controle positivo (isolados virais) e negativo (soro sabidamente não reagente ou água ultra pura), foi realizada utilizando o kit comercial NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel), seguindo as especificações do fabricante. Inicialmente, $600\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de lise (RAV 1) foram adicionados a $150\text{ }\mu\text{L}$ de soro. Após a homogeneização em vórtex, a mistura foi incubada por 5 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente a esta etapa de lise foram adicionados $600\text{ }\mu\text{L}$ de etanol absoluto e o material foi para o vórtex por 15 segundos. A amostra lisada foi transferida para a coluna de membrana de sílica e submetida a uma centrifugação de $8.000 \times g$ por 1 minuto. Foi realizada uma lavagem da coluna com $500\text{ }\mu\text{L}$ do tampão RAW com centrifugação de $8.000 \times g$ por 1 minuto. Após esta etapa, foram realizadas duas lavagens

subsequentes da coluna com 600 μL de RAV 3 com centrifugação de 8.000 x g por 1 minuto e com 200 μL de RAV 3 com centrifugação de 11.000 x g por 5 minutos, respectivamente. Finalizadas as lavagens, o RNA que ficou ligado à membrana de sílica foi eluído da coluna por meio da adição de 50 μL de água *RNase free*, com uma incubação de 2 minutos e com uma centrifugação de 11.000 x g por 1 minuto. Em seguida, o RNA foi estocado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior utilização nas reações de PCR.

5.4 *One-step* RT-PCR em tempo real

Para a implantação da técnica de *One-step* RT-PCR em tempo real no LAPEVI-ICBS/UFAL, utilizou-se, inicialmente, controles positivos que eram RNAs purificados extraídos de DENV-2, cultivado em células (cepa viral NGC, em células C6/36). Como controle negativo foi utilizado RNA extraído de soro de indivíduo saudável (amostra sabidamente negativa para dengue). A implantação da técnica foi realizada através de uma reação utilizando controle positivo e controle negativo em duplicata. Com o sucesso da reação, posteriormente, testou-se neste protocolo também os controles positivos dos outros três sorotipos de DENV, sendo: cepas BR/SL3/02 (em células C6/36) e H87 (em células VERO E6) de DENV-3; cepa MOCHIZUCKI de DENV-1 (em células C6/36); e H241 de DENV-4 (em células C6/36). Para execução dos testes utilizando as amostras séricas, uma destas cepas controle foi utilizada, tendo sido escolhidas ao acaso para cada rodada de amostras.

A **figura 4** mostra a curva de amplificação da duplicata dos controles positivo e o controle negativo, com seus respectivos C_{ts} , da reação de implantação da técnica de *One-step* RT-PCR em tempo real. Já a temperatura de dissociação dos controles positivos (genoma de DENV-2 cepa NGC) é ilustrada na **figura 5**.

Figura 4 – Curva de amplificação do controle positivo em duplicata. Apresentaram Controle positivo 1 C_t de 27.979 e T_m de 78.126; Controle positivo 2 C_t de 31.182 e T_m de 78.127; Controle negativo 1 indeterminado e T_m de 78.425; Controle negativo 2 com C_t indeterminado e T_m de 80.962. A linha azul representa o limiar (*threshold*).

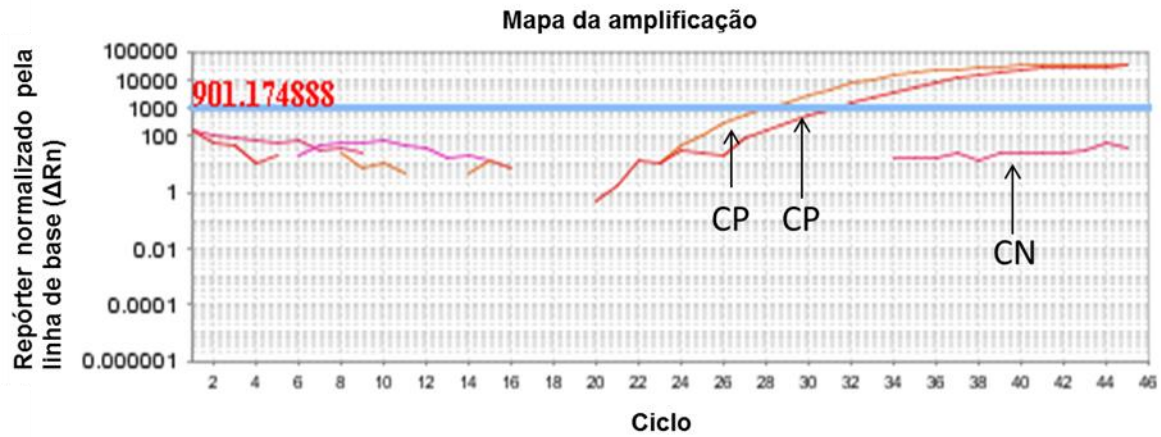
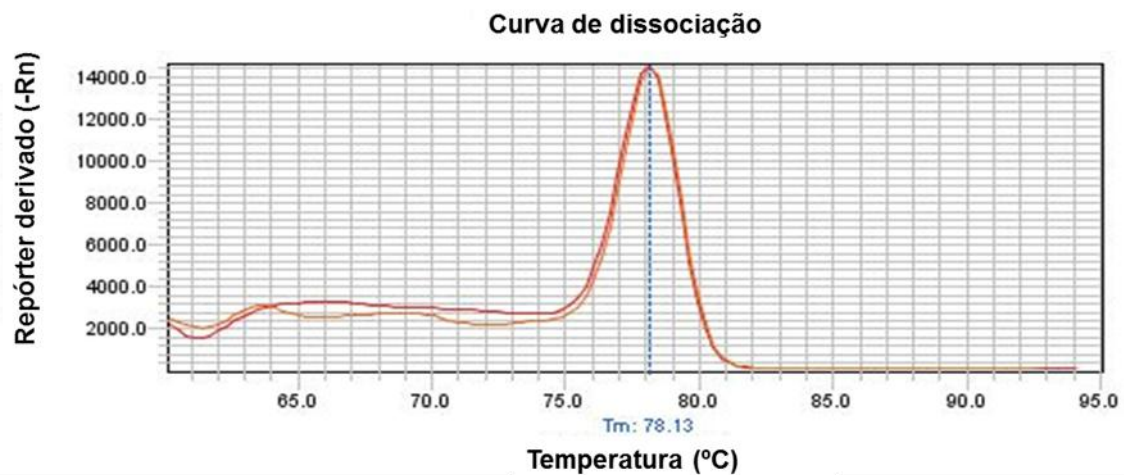


Figura 5 – Curva de dissociação dos controles positivos para DENV, mostrando a T_m de 78,13, conforme o esperado para genomas de dengue.



Em relação à aplicação da técnica para as amostras séricas, nas reações de amplificação foram utilizados como controles positivos RNA de qualquer sorotipo viral, com *primers* específicos para a região da extremidade 5' não codificadora do genoma viral, que é altamente conservada em todos os sorotipos de dengue. Como controle negativo, empregou-se água ultrapura ou uma amostra doada de indivíduo saudável (amostra sabidamente negativa

para dengue) coletada de um voluntário do laboratório. As amostras que se mostraram positivas foram repetidas em uma segunda reação, para a confirmação da positividade.

Os *primers* utilizados nas reações de *One-step* RT-PCR em tempo real foram os seguintes: RNC5'-S, com a sequência (5'-3') 5_UTR-S AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA; e RNC5'-C, com a sequência 5_UTR-C CGC GTT TCA GCA TAT TGA AAG, os quais amplificam um fragmento de 120 pares de base (pb) da região não codificadora do genoma viral (AQUINO et al., 2006; SANTOS et al., 2008).

Para a reação de amplificação do genoma viral utilizou-se um kit comercial *Super Script III Platinum SYBR Green One Step qRT-PCR* (Invitrogen®, USA) em volume final de 25 µL. Foi preparado uma mix com todos os reagentes e depois se acrescentou as amostras. Em cada tubo de reação continha 12,5 µL do *SYBR Green*, 0,5 µL da enzima *Super Script III Platinum*, 1 µL do primer RNC5' S (10 µM), 1 µL do primer RNC5' C (10 µM), e 10 µL de RNA de cada amostra. Após isso, as mix com as amostras foram colocadas no aparelho Applied Biosystems *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems*. Neste aparelho, as amostras passaram pelas seguintes etapas: 50 °C por 20 minutos, para a transcrição reversa, seguida de 95 °C por 5 minutos, para a desnaturação das duplas fitas. A PCR ocorreu em 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 40 segundos, 72 °C por 30 segundos. A construção da curva de dissociação ocorreu a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto, 95 °C por 15 segundos. A análise da curva de dissociação foi realizada através do software v2.1 do aparelho.

A análise do ciclo limiar (C_i) foi realizada individualmente para cada amostra, pois ela varia para cada paciente. O limiar foi estabelecido para cada amostra com base na detecção de amplificação das amostras e dos controles. O limiar foi ajustado manualmente, com base no mesmo ter que estar na metade da curva de amplificação das amostras que foram positivas.

5.4.1 Quantificação da carga viral das amostras séricas

Para a quantificação da carga viral das amostras séricas, utilizou-se uma fórmula obtida através da construção de uma curva padrão que foi realizada no Laboratório de Virologia da FCFRP-USP. Para a construção desta curva, foi utilizado: RNA do vírus DENV-3, cepa D3BR/RP1/2003, obtido por transfecção *in vitro* (Apêndice B)(AQUINO et al., 2006) e quantificado por espectrofotometria em aparelho NanoDrop®. A curva foi obtida

após a diluição decimal do RNA viral, com posterior quantificação pela técnica de RT-PCR em tempo real. Esta curva gerou uma equação da reta, a qual possibilita o cálculo da carga viral da amostra clínica a partir do C_t desta amostra (obtido em RT-PCR em tempo real). Para a quantificação das amostras em Cópias de RNA/mL, obteve-se a equação $y = -0,2492x + 10,531$, onde "y" é o log da concentração e "x" é o C_t encontrado pelo *One-step* RT-PCR em tempo real. A quantificação da carga viral das amostras séricas foi realizada com base nos C_{ts} obtidos nas reações de *One-step* RT-PCR em tempo real, os quais foram substituídos na fórmula supra citada.

5.5 RT-PCR convencional e semi *nested*-PCR com *primers* para a região gênica C e prM

Para a RT-PCR convencional foram utilizados os *primers* descritos por Lanciotti et al. (1992) (**Tabela 2**), e protocolo foi adaptado conforme descrito abaixo (**Figura 6**). Na etapa de transcrição reversa (RT), inicialmente, utilizou-se o *primer* original do artigo e posteriormente usou-se os *primers* randômicos.

Tabela 2- *Primers* utilizados para amplificação e sorotipagem do vírus da dengue.

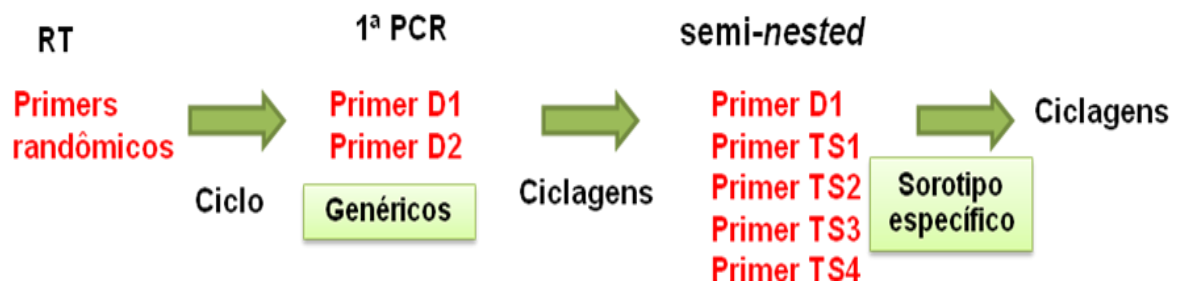
<i>Primer</i>	Sequência	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (pb)
Primeira etapa			
D1 (sense)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG - 3'	134-161	511
D2 (antissense)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC - 3'	616-644	
Segunda etapa			
D1 + TS1(antissense)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG - 3'	568-586	482
D1 + TS2 (antissense)	5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG - 3'	232-252	119
D1 + TS3 (antissense)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC - 3'	400-421	290
D1 + TS4(antissense)	5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	506-527	392

Fonte: Adaptado de Lanciotti et al. (1992).

Para a reação da transcrição reversa (RT), com um volume final de 20 μ L, foram utilizados: 4 μ L de tampão 5x [250 mM Tris-HCl (pH 8.3) 375 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$]; 1,4 μ L de DTT (0,1 M); 1,0 μ L de dNTP (10 mM); 1,0 μ L de *random primer* (50 ng/ μ L);

Invitrogen®); 1,0 µL de inibidor de RNase (40 U/ µL); 2,6 µL de água DEPC; 1,0 µL de enzima RT M-MLV (200 U/ µL) (Invitrogen®); 8,0 µL de amostra (RNA). A ciclagem utilizada foi a seguinte: 25 °C por 10 minutos; 37 °C por 2 horas; 85 °C por 5 minutos; 4 °C ∞.

Figura 6 – Esquema das reações de RT-PCR seguida de *semi-nested*-PCR.



Para a PCR, em um volume final de 50 µL, foram utilizados: 5,0 µL de tampão 10x; 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 1,0 µL de dNTP (10 mM); 1,0 µL de *primer* D1 (15 µM); 1,0 µL de *primer* D2 (15 µM); 34,7 µL de água DEPC ou ultrapura; 0,3 µL de enzima Taq (5 U/ µL; Invitrogen®); 5,0 µL de amostra (cDNA). A reação de amplificação foi submetida à seguinte programação: 1 ciclo de 94 °C por 2 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 55 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto; 1 ciclo de 72 °C por 1 minuto; 4 °C ∞. Os *amplicons* foram armazenados a -20 °C ou analisados imediatamente.

Para a *semi nested*-RT-PCR, em um volume final de 50 µL, foram utilizados: 5,0 µL de tampão 10x; 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 2,0 µL de dNTP (10 mM); 1,0 µL de *primer* D1 (15 µM); 1,0 µL de *primer* TS1 (15 µM); 1,0 µL de *primer* TS2 (15 µM); 1,0 µL de *primer* TS3 (15 µM); 1,0 µL de *primer* TS4 (15 µM); 30,7 µL de água DEPC/ultrapura; 0,3 µL de enzima Taq (5 U/ µL); 5,0 µL de amostra (*amplicon*). A ciclagem foi a seguinte: 20 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 55 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto; 1 ciclo de 72 °C por 1 minuto; 4 °C ∞.

Com os *amplicons* da PCR e da *semi nested*-RT-PCR foi realizada eletroforese com gel de agarose a 2,0 % em tampão TBE 0,5X. Em cada gel foi adicionado um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®). O gel foi corado com brometo de etídio a 1,5

µg/mL. Posteriormente, o mesmo foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta (ECX-20.M) e documentado utilizando o equipamento (Doc-Print II, Vilber Lourmat).

5.6 RT-PCR convencional e multiplex-semi-nested com *primers* para a região gênica NS5

As amostras foram também testadas por um segundo tipo de protocolo de reação, por RT-PCR convencional utilizando os *primers* e o protocolo descritos por Bronzoni et al. (2005) (Tabela 3), com ligeiras modificações. Os *primers* FG1 e FG2 são específicos para o gênero *Flavivirus*, ao passo que os demais *primers* são espécie-específicos. Para os vírus DENV-1, DENV-2 e DENV-3 a reação de semi *nested* é também uma reação multiplex (*M-N-PCR*), na qual todos os *primers* são combinados em um único tubo. Para o vírus DENV-4, no entanto, uma reação de semi *nested* é realizada em tubo contendo apenas os *primers* FG1 e nDEN-4 (Figura 7).

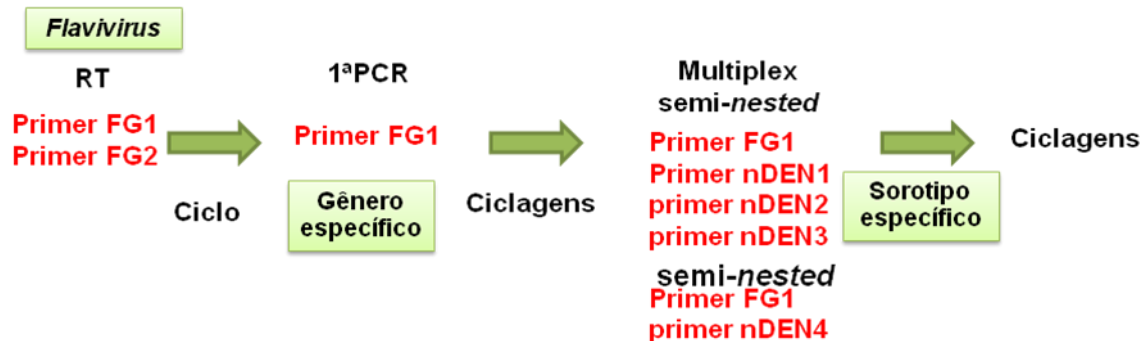
Tabela 3 – *Primers* utilizados para amplificação e sorotipagem do vírus da dengue.

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)
Primeira etapa		
FG1(sense)	5´- TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT - 3´	958
FG2 (antissense)	5´- GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA - 3´	
Segunda etapa		
FG1 + nDEN1 (antissense)	5´- CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC - 3´	472
FG1 + nDEN2 (antissense)	5´- GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC - 3´	316
FG1 + nDEN3 (antissense)	5´- TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT - 3´	659
FG1 + nDEN4 (antissense)	5´- GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC - 3´	222

Fonte: Bronzoni et al. (2005); adaptado de Poloni, 2009.

Para a reação da transcrição reversa (RT), com um volume final de 20 µL, foram utilizados: 4 µL de tampão 5x [250 mM Tris-HCl (pH 8.3) 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂]; 1,0 µL de DTT (0,1 M); 1,0 µL de dNTP (10 mM); 1,0 µL de *primer* FG1 (15 µM); 1,0 µL de *primer* FG2 (15 µM); 1,0 µL de inibidor de RNase (40 U/ µL); 2,5 µL de água DEPC; 0,5 µL de enzima Super script III (200 U/ µL; Invitrogen®); 8,0 µL de amostra (RNA). A ciclagem utilizada foi a seguinte: 25 °C por 5 minutos; 50 °C por 50 minutos; 85 °C por 5 minutos; 4 °C ∞.

Figura 7 – Esquema das reações de RT-PCR seguida de multiplex semi-nested-PCR.



Para a PCR gênero-específica, em um volume final de 50 μL , foram utilizados: 5 μL de tampão 10x; 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM); 1,0 μL de dNTP (10 mM); 1,0 μL de *primer FG1* (15 μM); 33,3 μL de água DEPC; 0,3 μL de enzima *Taq Platinum* (5 U/ μL ; Invitrogen®); 8,0 μL de amostra (cDNA). A reação de amplificação foi submetida à seguinte programação: 1 ciclo de 94 °C por 1 minuto; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos; 1 ciclo de 72 °C por 5 minutos; 4 °C ∞ . Os *amplicons* foram armazenados a -20 °C ou analisados imediatamente.

Para a *M-N-PCR* de detecção dos DENV-1,-2,-3, em um volume final de 50 μL , foram utilizados: 5,0 μL de tampão 10x; 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM); 1,0 μL de dNTP (10 mM); 1,0 μL de *primer nDEN1* (15 μM); 1,0 μL de *primer nDEN 2* (15 μM); 1,0 μL de *primer nDEN 3* (15 μM); 38,3 μL de água DEPC; 0,2 μL de enzima *Taq Platinum* (5 U/ μL ; Invitrogen®); 1,0 μL de amostra (*amplicon*). A ciclagem foi a seguinte: 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos; 1 ciclo de 72 °C por 5 minutos; 4 °C ∞ .

Para a semi *nested-RT-PCR* de detecção de DENV-4, em um volume final de 50 μL , foram utilizados: 5,0 μL de tampão 10x; 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM); 1,0 μL de dNTP (10 mM); 1,0 μL de *primer FG1* (15 μM); 1,0 μL de *primer nDEN 4* (15 μM); 39,3 μL de água DEPC; 0,2 μL de enzima *Taq Platinum* (5 U/ μL ; Invitrogen®); 1,0 μL de amostra (*amplicon*). A ciclagem foi a seguinte: 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos; 1 ciclo de 72 °C por 5 minutos; 4 °C ∞ .

Com os *amplicons* da PCR gênero-específica, M-N- e semi *nested-RT-PCR* foi realizada uma eletroforese com gel de agarose a 1,5 %, 1,8 % e 1,8 %, respectivamente, em

tampão TBE 0,5x. O gel foi corado com brometo de etídio (1,5 µg/mL). Posteriormente, o mesmo foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta (ECX-20.M) e documentado utilizando o equipamento (Doc-Print II, Vilber Lourmat).

5.7 Avaliação da sensibilidade do limite de detecção da técnica de RT-PCR segundo os protocolos de Lanciotti et al. (1992) e Bronzoni et al. (2005)

Para a avaliação da sensibilidade da técnica de RT-PCR segundo os protocolos de Lanciotti et al. (1992) e Bronzoni et al. (2005) foi utilizado estoque de vírus DENV-2 cepa NGC cultivado em células VERO E6, em título de $3,7 \times 10^4$ PFU/mL. Uma alíquota de 200µL do sobrenadante de cultura celular deste estoque viral foi utilizada para a extração do RNA. O RNA total extraído foi então submetido a diluições decimais seriadas. As reações foram realizadas com as diluições de 1:100 (10^{-2}) até 1:1000000000 (10^{-9}) e posteriormente submetidas a RT, PCR, multiplex semi *nested* PCR e semi *nested* PCR de acordo com o protocolo de cada autor conforme descrito.

5.8 Análise dos dados

Os dados coletados foram organizados em tabelas e analisados de modo descritivo, através da frequência (porcentagem) no Microsoft Excel 2007. As análises de comparação entre os resultados positivos / negativos dos métodos tempo real versus RT-PCR convencional foram realizadas pelo teste exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad InStat (EUA). Para estes testes, a hipótese de nulidade foi rejeitada, quando a possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não excedeu 5 % ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

Neste trabalho foram incluídos 55 indivíduos com suspeita clínica de dengue, atendidos em unidades de saúde de Maceió, cujas coletas sanguíneas foram realizadas em: Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto (n=18), Hospital UNIMED (n=3) e PAM Bebedouro (n=30), além de quatro coletas domiciliares (**Tabela 4**). A inclusão dos pacientes no estudo foi realizada no período de agosto de 2012 a abril de 2014.

Tabela 4 – Amostras séricas incluídas no estudo, segundo intervalo de tempo entre coleta e início da doença, local da coleta e procedência dos pacientes.

N	Código do LAPEVI	Intervalo de tempo entre coleta e início dos sintomas	Data da coleta	Local da coleta	Procedência do indivíduo
1	102H	7 dias	29/08/2012	UNIMED	Maceió-AL
2	103H	6 dias	29/08/2012	UNIMED	Maceió-AL
3	104H	9 dias	29/08/2012	UNIMED	Maceió-AL
4	105H	3 dias	08/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
5	106H	2 dias	08/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
6	107H	4 dias	08/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
7	108H	1 dias	08/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
8	109H	3 dias	08/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
9	110H	6 dias	08/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
10	111H	2 dias	08/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
11	112H	—	09/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
12	113H	2 dias	12/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
13	114H	—	12/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
14	115H	—	12/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
15	116H	2 dias	14/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
16	117H	—	14/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL

Continuação da Tabela 4 – Amostras séricas incluídas no estudo, segundo intervalo de tempo entre coleta e início da doença, local da coleta e procedência dos pacientes.

N	Código do LAPEVI	Intervalo de tempo entre coleta e início dos sintomas	Data da coleta	Local da coleta	Procedência do indivíduo
17	118H	3 dias	15/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
18	119H	—	17/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
19	120H	3 dias	17/11/2012	PAM Bebedouro	—
20	121H	—	15/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
21	122H	—	17/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
22	124H	3 dias	17/11/2012	PAM Bebedouro	—
23	125H	—	19/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
24	126H	—	19/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
25	127H	7 dias	22/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
26	128H	3 dias	22/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
27	129H	4 dias	22/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
28	130H	12 dias	22/11/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
29	131H	4 dias	17/12/2012	PAM Bebedouro	Maceió-AL
30	132H	3 dias	29/01/2013	HEHA	Maceió-AL
31	133H	3 dias	02/04/2013	Domicílio	Maceió-AL
32	134H	6 dias	15/04/2013	HEHA	Matriz do Camaragibe- AL
33	135H	3 dias	18/04/2013	PAM Bebedouro	Maceió-AL
34	136H	7 dias	18/04/2013	PAM Bebedouro	Maceió-AL
35	137H	3 dias	18/04/2013	PAM Bebedouro	Maceió-AL
36	138H	5 dias	25/04/2013	PAM Bebedouro	Maceió-AL
37	139H	5 dias	15/08/2013	Domicílio	Maceió-AL
38	140H	3 dias	19/08/2013	Domicílio	Maceió-AL
39	141H	9 dias	03/10/2013	Domicílio	Maceió-AL

Continuação da Tabela 4 – Amostras séricas incluídas no estudo, segundo intervalo de tempo entre coleta e início da doença, local da coleta e procedência dos pacientes.

N	Código do LAPEVI	Intervalo de tempo entre coleta e início dos sintomas	Data da coleta	Local da coleta	Procedência do indivíduo
40	142H	4 dias	13/12/2013	HEHA	Marechal Deodoro-AL
41	143H	6 dias	16/12/2013	HEHA	Maceió-AL
42	144H	8 dias	18/12/2013	HEHA	Limoeiro de Anadia-AL
43	150H	7 dias	13/01/2014	HEHA	Maceió-AL
44	151H	3 dias	21/01/2014	HEHA	Fernão Velho-AL
45	152H	3 dias	29/01/2014	HEHA	Maceió-AL
46	153H	—	03/02/2014	HEHA	Barra de Camaragibe-AL
47	154H	4 dias	03/02/2014	HEHA	Pilar-AL
48	155H	7 dias	05/02/2014	HEHA	Maceió-AL
49	156H	4 dias	06/02/2014	HEHA	Maceió-AL
50	157H	—	20/02/2014	HEHA	—
51	158H	2 dias	10/03/2014	HEHA	Maceió-AL
52	159H	—	11/03/2014	HEHA	—
53	160H	3 dias	11/03/2014	HEHA	Maceió-AL
54	161H	4 dias	11/03/2014	HEHA	Maceió-AL
55	162H	5 dias	10/03/2014	HEHA	Campo Alegre-AL

NOTA: ___*: Pacientes sem prontuários ou sem registro.

6.1 Aplicação do *One-step* RT-PCR em tempo real para detecção de genomas de DENV em amostras séricas humanas

Foram realizadas 15 rodadas de reações por RT-PCR em tempo real para o processamento das amostras séricas, nas quais observou-se variação de C_t e T_m para os controles positivos utilizados em cada reação. A **tabela 5** mostra os valores obtidos com os controles positivos de todos os sorotipos de DENV. O valor mínimo e o valor máximo

(amplitude) obtidos de C_t foram de 15.566 e 31.356, respectivamente. Considerando-se todas as 15 rodadas de reação realizadas, cada uma delas com um controle positivo, valor médio de C_t foi de 23.432, e a mediana foi de 22.379. O desvio padrão foi de 5,243. Já em relação à amplitude das T_m obtidas, o valor mínimo e o valor máximo obtidos de T_m foram de 78.126 e 80.082, respectivamente. Considerando-se todas as rodadas de reações realizadas, o valor médio de T_m foi de 79.480 e a mediana foi de 79.483. O desvio padrão foi de 0,618.

Tabela 5 – Variação nos valores de C_t e T_m obtidos com os controles positivos para os diferentes sorotipos de vírus Dengue, em 15 reações de *One-step* RT-PCR em tempo real realizadas.

ISOLADO	SOROTIPO	VARIAÇÃO DO C_t	VARIAÇÃO DO T_m
MOCHIZUCKI	DENV-1	26.699 - 30.808	79.633 - 80.081
NGC	DENV-2	15.566 - 31.356	78.126 - 78.127
BR/SL3/02	DENV-3	17.903 - 18.856	79.772 - 80.082
H87	DENV-3	23.954	78.74
H241	DENV-4	18.695 - 23.764	79.333 - 79.483

Foram testadas por este protocolo as 55 amostras de soro coletadas de pacientes com a suspeita clínica de dengue, cujos valores obtidos para C_t e T_m são mostrados na **Tabela 6**. Das 55 amostras, 13 (23,64%) foram consideradas positivas pelo *One-step* RT-PCR em tempo real (**Tabela 7**). As amostras que se mostraram positivas foram repetidas em uma segunda reação (contraprova), para a confirmação da positividade. Dentre as amostras positivas, o maior C_t foi 39.975 e o menor 16.608; a T_m variou entre 77.248 e 81.71 (**Tabela 7**). As **figuras 8 e 9** ilustram o C_t e a T_m da amostra 110H que foi considerada positiva, como representativa das reações. Para se considerar positiva a amostra, o ponto de corte da T_m foi no intervalo de 77 a 81.

Tabela 6 – Resultado das análises de amplificação nas amostras séricas provenientes de pacientes com suspeita clínica de dengue incluídas no estudo após reações de *One-step* RT-PCR em tempo real, mostrando em destaque as 13 amostras positivas.

N	Código do LAPEVI	1ª Detecção		Contraprova**		Resultado RT-PCR tempo real
		Ct*	Tm	Ct	Tm	
1	102H	X	79.474	---	---	Negativo
2	103H	30.127	78.136	32.096	79.335	Positivo
3	104H	X	76.652	---	---	Negativo
4	105H	X	93.21	---	---	Negativo
5	106H	32.006	80.085	29.904	80.239	Positivo
6	107H	X	74.117	---	---	Negativo
7	108H	X	65.026	---	---	Negativo
8	109H	35.885	81.422	36.449	79.187	Positivo
9	110H	29.222	77.248	35.673	81.71	Positivo
10	111H	X	87.686	---	---	Negativo
11	112H	21.346	78.886	25.790	79.333	Positivo
12	113H	44.824	69.62	---	---	Negativo
13	114H	X	80.528	---	---	Negativo
14	115H	29.946	79.175	28.991	79.324	Positivo
15	116H	25.215	77.249	20.482	77.687	Positivo
16	117H	35.887	80.974	31.911	81.116	Positivo
17	118H	34.280	81.423	32.205	80.521	Positivo
18	119H	X	73.055	---	---	Negativo
19	120H	X	71.709	---	---	Negativo
20	121H	X	66.51	---	---	Negativo
21	122H	X	67.532	---	---	Negativo
22	124H	39.975	80.676	34.493	80.37	Positivo
23	125H	40.985	71.728	---	---	Negativo
24	126H	X	66.361	---	---	Negativo
25	127H	X	92.604	---	---	Negativo
26	128H	X	84.106	---	---	Negativo
27	129H	X	88.435	---	---	Negativo
28	130H	X	80.678	---	---	Negativo
29	131H	X	81.27	---	---	Negativo
30	132H	38.593	81.12	36.560	84.848	Negativo

Continuação da Tabela 6 – Resultado das análises de amplificação nas amostras séricas provenientes de pacientes com suspeita clínica de dengue incluídas no estudo após reações de *One-step* RT-PCR em tempo real, mostrando em destaque as 13 amostras positivas.

N	Código do LAPEVI	1ª Detecção		Contraprova**		Resultado RT-PCR tempo real
		Ct*	Tm	Ct	Tm	
31	133H	X	65.314	---	---	Negativo
32	134H	X	71.131	---	---	Negativo
33	135H	12.924	72.919	---	---	Negativo
34	136H	35.314	73.381	---	---	Negativo
35	137H	X	77.699	---	---	Negativo
36	138H	X	66.068	---	---	Negativo
37	139H	X	87.686	---	---	Negativo
38	140H	X	76.801	---	---	Negativo
39	141H	27.967	65.765	---	---	Negativo
40	142H	X	77.098	---	---	Negativo
41	143H	X	78.736	---	---	Negativo
42	144H	X	88.88	---	---	Negativo
43	150H	X	92.006	---	---	Negativo
44	151H	X	74.564	---	---	Negativo
45	152H	X	79.486	---	---	Negativo
46	153H	X	61.445	---	---	Negativo
47	154H	X	77.401	---	---	Negativo
48	155H	X	61.212	---	---	Negativo
49	156H	31.117	80.686	31.619	79.19	Positivo
50	157H	X	80.08	---	---	Negativo
51	158H	16.704	78.744	16.608	78.892	Positivo
52	159H	32.481	79.335	31.683	79.335	Positivo
53	160H	X	61.902	---	---	Negativo
54	161H	X	63.237	---	---	Negativo
55	162H	30.936	82.321	X	79.935	Indeterminado

LEGENDA: * X significa C_t indeterminado; **as amostras positivas foram repetidas. ***---significa não realizado.

Tabela 7 – Amostras consideradas positivas após reação de contraprova / repetição do *One-step* RT PCR em tempo real para presença de genoma viral de DENV e o período da coleta sanguínea em relação ao início dos sintomas.

N	Código do LAPEVI	1ª Detecção		Contraprova**		Intervalo de tempo entre coleta e início dos sintomas	Data da coleta da amostra
		Ct*	T _m	Ct	T _m		
1	103H	30.127	78.136	32.096	79.335	6 dias	29/08/2012
2	106H	32.006	80.085	29.904	80.239	2 dias	08/11/2012
3	109H	35.885	81.422	36.449	79.187	3 dias	08/11/2012
4	110H	29.222	77.248	35.673	81.71	6 dias	08/11/2012
5	112H	21.346	78.886	25.790	79.333	—	09/11/2012
6	115H	29.946	79.175	28.991	79.324	—	12/11/2012
7	116H	25.215	77.249	20.482	77.687	2 dias	14/11/2012
8	117H	35.887	80.974	31.911	81.116	—	14/11/2012
9	118H	34.280	81.423	32.205	80.521	3 dias	15/11/2012
10	124H	39.975	80.676	34.493	80.37	3 dias	17/11/2012
11	156H	31.117	80.686	31.619	79.19	4 dias	06/02/2014
12	158H	16.704	78.744	16.608	78.892	2 dias	10/03/2014
13	159H	32.481	79.335	31.683	79.335	—	11/03/2014

NOTA: ___*: Pacientes sem prontuários.

Figura 8 – Amplificação da amostra 110H e do controle positivo (CP) (DENV-3, cepa BR/SL3/02) e o controle negativo (CN). Apresentaram CN C_t indeterminado e T_m de 70.983; 110H C_t de 35.314 e T_m de 81.27; CP com C_t de 18.443 e T_m de 80.082. A linha azul representa o limiar (*threshold*).

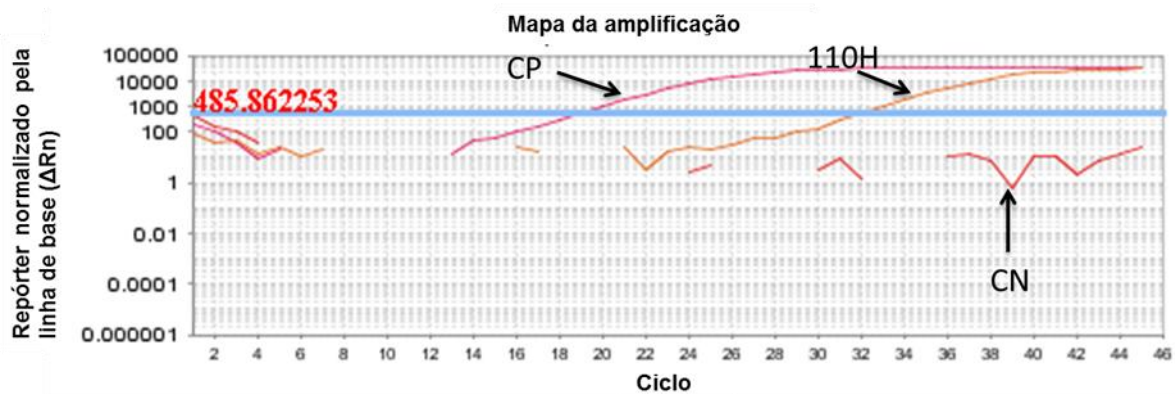
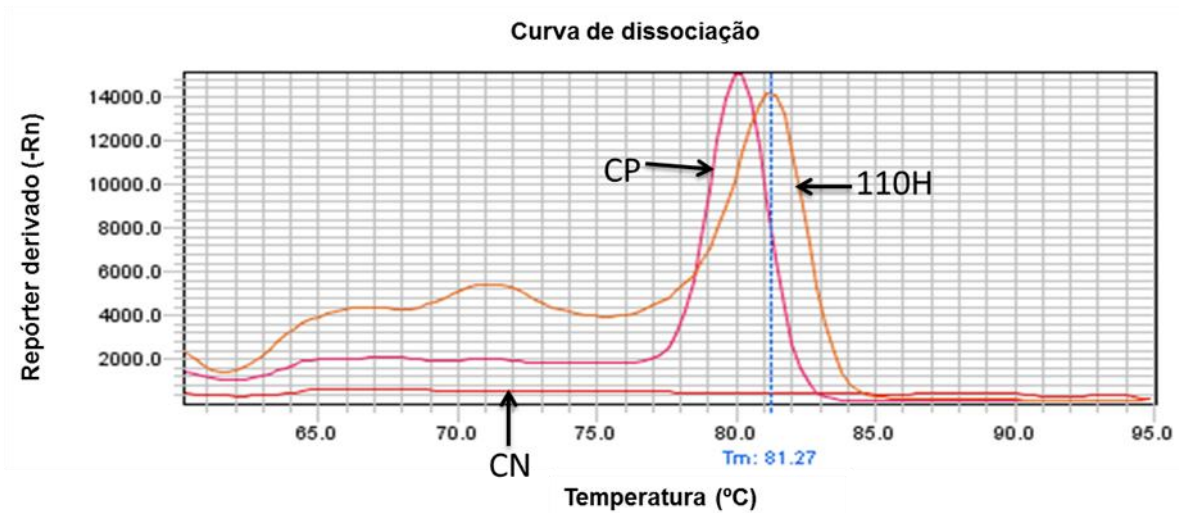


Figura 9 – Análise da curva de dissociação (*melting*) do controle negativo, da amostra 110H e do controle positivo (DENV-3, cepa BR/SL3/02), mostrando a T_m de 81.27 da amostra 110H, conforme o esperado para genomas de dengue.



Duas das amostras testadas (125H e 136H) apresentaram C_t com valor positivo, porém com temperaturas de dissociação fora do limite considerado específico para DENV, sendo assim consideradas negativas para dengue (**Figuras 10 e 11, e Tabela 6**).

Figura 10 – Amplificação das amostras 125H e 136H e do controle positivo (CP) (DENV-3, cepa BR/SL3/02) e o controle negativo (CN). Apresentaram CN C_t indeterminado e T_m de 70.983; 125H C_t 40.985 e T_m de 71.728; 136H C_t de 35.314 e T_m de 73.381; CP com C_t de 18.443 e T_m de 80.082. A linha azul representa o limiar (*threshold*).

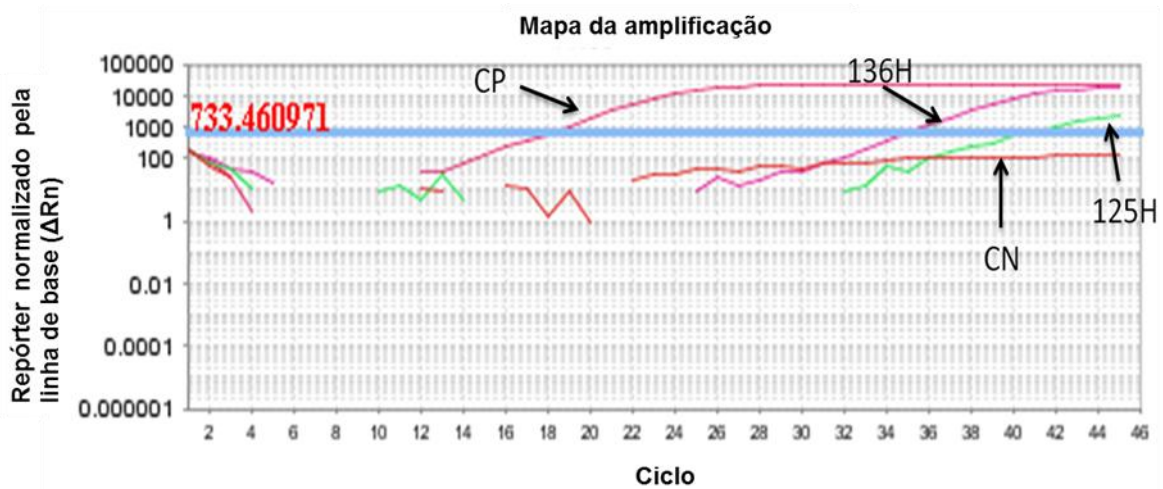
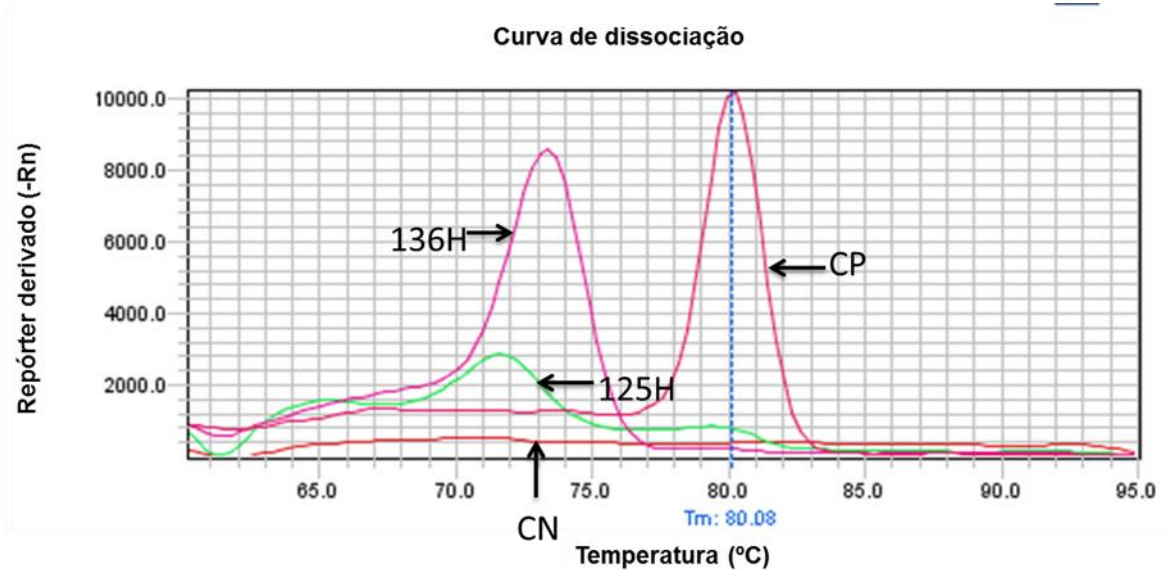


Figura 11– Análise da curva de dissociação do controle negativo, das amostras 125H e 136H e do controle positivo para DENV, mostrando a T_m de 80.08 do CP, conforme o esperado para genomas de dengue.



6.1.1 Quantificação da carga viral das amostras séricas

A quantificação da carga viral foi realizada nas 13 amostras positivas por *One-step* RT-PCR em tempo real. As amostras foram testadas numa primeira determinação e confirmadas com uma contraprova. Os resultados das médias de carga viral obtidas são ilustradas na **tabela 8**. Observa-se que a amostra 158H teve uma carga viral alta em comparação às demais amostras.

Tabela 8 – Quantificação da carga viral por *One-step* RT-PCR em tempo real em amostras de soro dos pacientes.

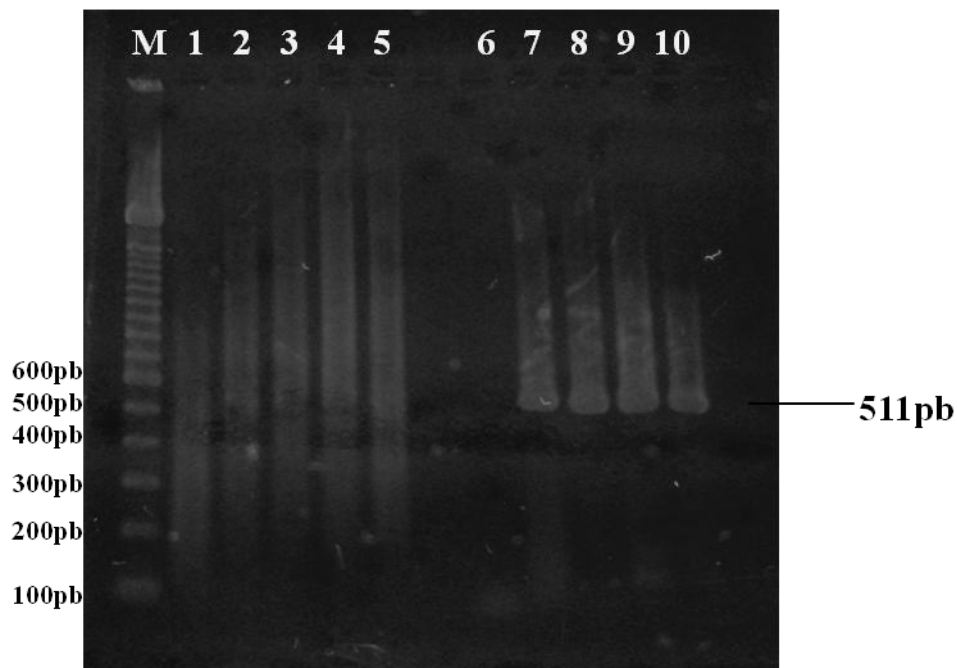
Código do Lapevi	Ct (1)	Cópias de RNA/mL	Ct (2)	Cópias de RNA/mL	Média dos Cts	Média de cópias de RNA/mL
		(1ª determinação)		(2ª determinação ou contraprova)		
103H	30.127	10,5 x 10 ⁵	32.096	3,4 x 10 ⁵	32.096	7,0 x 10 ⁵
106H	32.006	3,5 x 10 ⁵	29.904	11,9 x 10 ⁵	29.904	7,7 x 10 ⁵
109H	35.885	3,8 x 10 ⁴	36.449	2,8 x 10 ⁴	36.449	3,3 x 10 ⁴
110H	29.222	177,3 x 10 ⁴	35.673	4,3 x 10 ⁴	35.673	90,8 x 10 ⁴
112H	21.346	16,2 x 10 ⁷	25.790	1,2 x 10 ⁷	25.790	8,7 x 10 ⁷
115H	29.946	1,1 x 10 ⁶	28.991	2,0 x 10 ⁶	28.991	1,6 x 10 ⁶
116H	25.215	1,7 x 10 ⁷	20.482	26,7 x 10 ⁷	20.482	14,2 x 10 ⁷
117H	35.887	3,8 x 10 ⁴	31.911	37,9 x 10 ⁴	31.911	20,9 x 10 ⁴
118H	34.280	9,7 x 10 ⁴	32.205	32,0 x 10 ⁴	32.205	20,9x 10 ⁴
124H	39.975	3,7 x 10 ³	34.493	86,1 x 10 ³	34.493	44,9 x 10 ³
156H	31.117	5,9 x 10 ⁵	31.619	4,5 x 10 ⁵	31.368	5,2 x 10 ⁵
158H	16.704	2,3 x 10 ⁹	16.608	2,5 x 10 ⁹	16.656	2,4 x 10 ⁹
159H	32.481	2,7 x 10 ⁵	31.683	4,3 x 10 ⁵	32.082	3,5 x 10 ⁵

6.2 Adaptação da semi *nested*-RT-PCR convencional com *primers* para a região gênica C e prM

Para a reação de transcrição reversa (RT), descrita por Lanciotti et al. (1992) foi comparado o desempenho de *primers* genéricos para dengue (D1 e D2; que amplificam qualquer dos quatro sorotipos virais) com o de *primers* randômicos, para escolha daqueles que resultariam em melhor desempenho na reação. Para revelar esta reação de RT é necessário já realizar a etapa posterior de 1ª PCR, com os primers D1 e D2, cujo resultado pode ser visualizado na **figura 12**. Na comparação entre o uso na RT dos *primers* randômicos versus

genéricos para dengue, foi obtido melhor desempenho com os *primers* randômicos (uma maior intensidade da banda) para todos os sorotipos de DENV testados (-1, -2, -3, e -4). Assim, padronizou-se a utilização de *primers* randômicos na etapa de transcrição reversa.

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose a 2,0% do resultado da PCR com *primers* do Lanciotti et al. (1992) utilizando *primers* específicos D1 e D2 (1 a 5) e *random primer* (6 a 10) na RT. M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1; linha 3: DENV-2; linha 4: DENV-3; linha 5: DENV-4; linha 6: Controle negativo; linha 7: DENV-1; linha 8: DENV-2; linha 9: DENV-3; linha 10: DENV-4.



Na sequência de reações do protocolo descrito por Lanciotti et al. (1992) após a 1ª PCR são realizadas reações de *nested-PCR*, para determinação dos sorotipos de DENV. Nestas reações, no entanto, verificou-se a formação de bandas derivadas do excesso de produto da PCR, quando os *amplicons* da 1ª PCR estavam em grande quantidade (observado pela espessura da banda na eletroforese) (**Figura 13**). Foi padronizado, então, que quando a 1ª PCR resultasse em banda espessa na eletroforese, seria repetida a reação, na qual seriam utilizados os *primers* da *nested* (TS1, TS2, TS3, TS4) numa reação de 1ª PCR. Neste caso, ao invés de o DNA molde ser o *amplicon*, seria o próprio cDNA obtido diretamente da RT. Essa estratégia melhorou a definição das bandas no gel (**Figura 14**).

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose a 2,0% do resultado da *nested* PCR com *primers* do Lanciotti et al. (1992) utilizando *primers* específicos (1 a 5) e *random primer* (6 a 10) na RT. M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1 (482pb); linha 3: DENV-2 (119pb); linha 4: DENV-3 (290pb); linha 5: DENV-4 (392pb); linha 6: Controle negativo; linha 7: DENV-1 (482pb); linha 8: DENV-2 (4119pb); linha 9: DENV-3 (290pb); linha 10: DENV-4 (392pb).

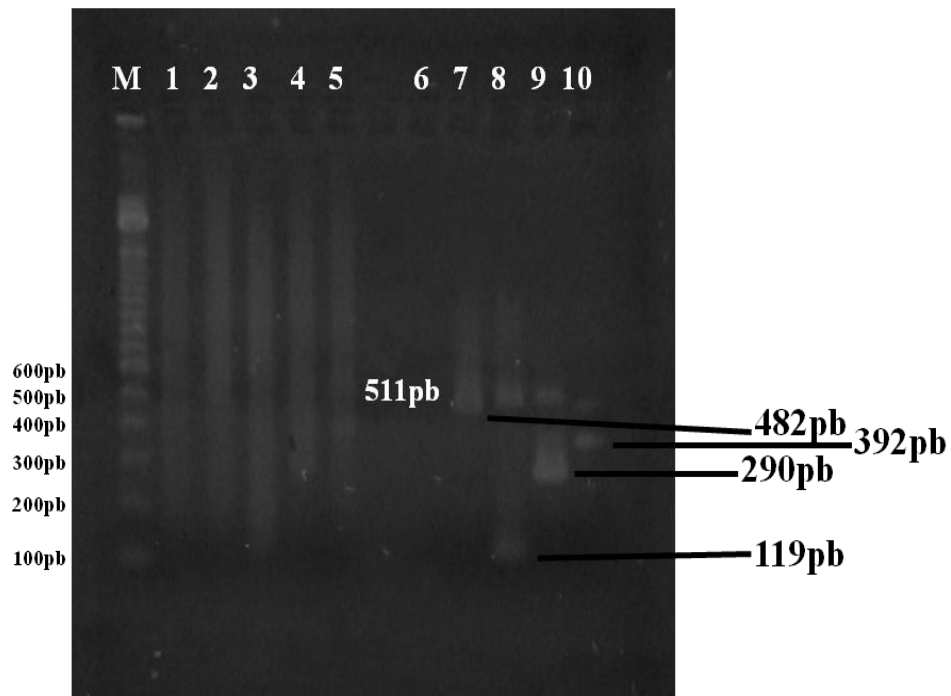
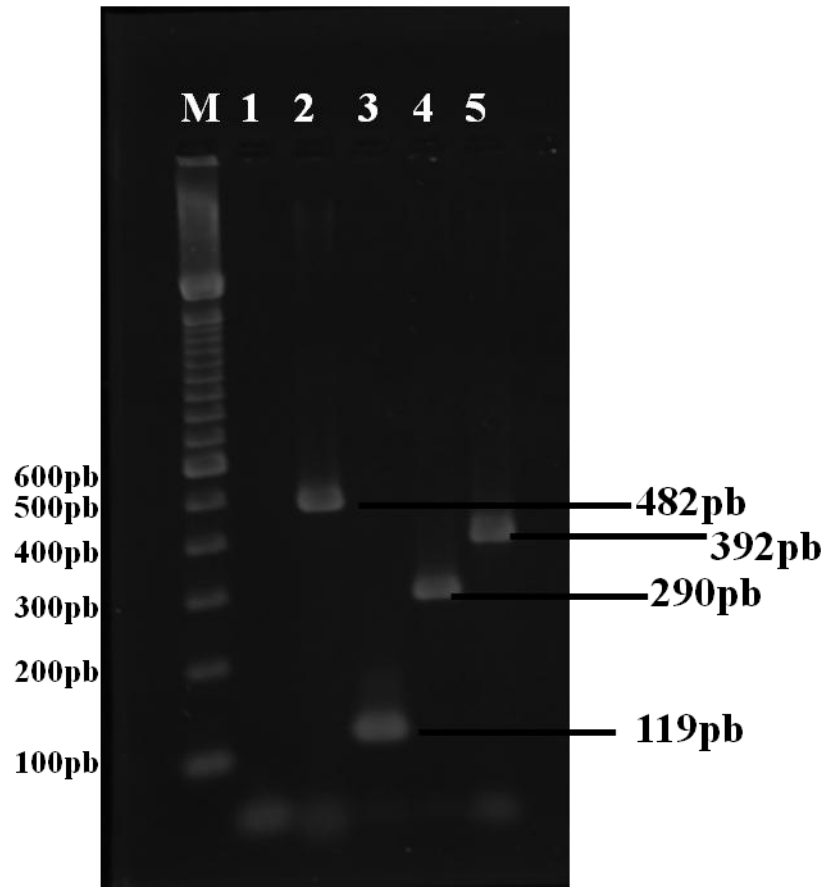


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose a 2,0% do resultado da 1ª PCR utilizando os *primers* da semi-nested PCR do Lanciotti et al. (1992) (TS1, TS2, TS3, TS4). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1 (482pb); linha 3: DENV-2 (119pb); linha 4: DENV-3 (290pb); linha 5: DENV-4 (392pb).



6.3 Adaptação da RT-PCR seguido de multiplex-semi-nested com *primers* para a região gênica NS5

O resultado da implantação da RT-PCR seguida de multiplex-semi-nested utilizando os *primers* de Bronzoni et al. (2005) pode ser visualizado nas **figuras 15 e 16**, as quais mostram *amplicons* de tamanhos esperados, a saber: *amplicon* de 958pb na reação com *primers* gênero-específicos para flavivírus (FG1 e FG2; **Figura 15**); e *amplicons* de 472pb para DENV-1, 316pb para DENV-2, 659pb para DENV-3, e 222pb para DENV-4 (**Figura 16**).

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do resultado da PCR com *primers* gênero-específicos para membros do gênero *Flavivirus* (FG1 e FG2), com protocolo adaptado de Bronzoni et al. (2005). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1; linha 3: DENV-2; linha 4:DENV-3; linha 5:DENV-4.

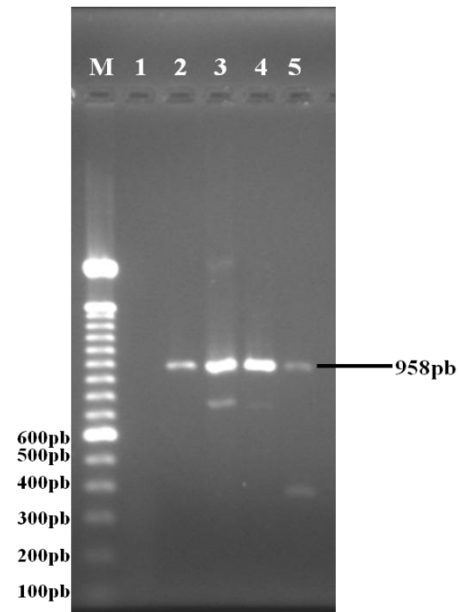
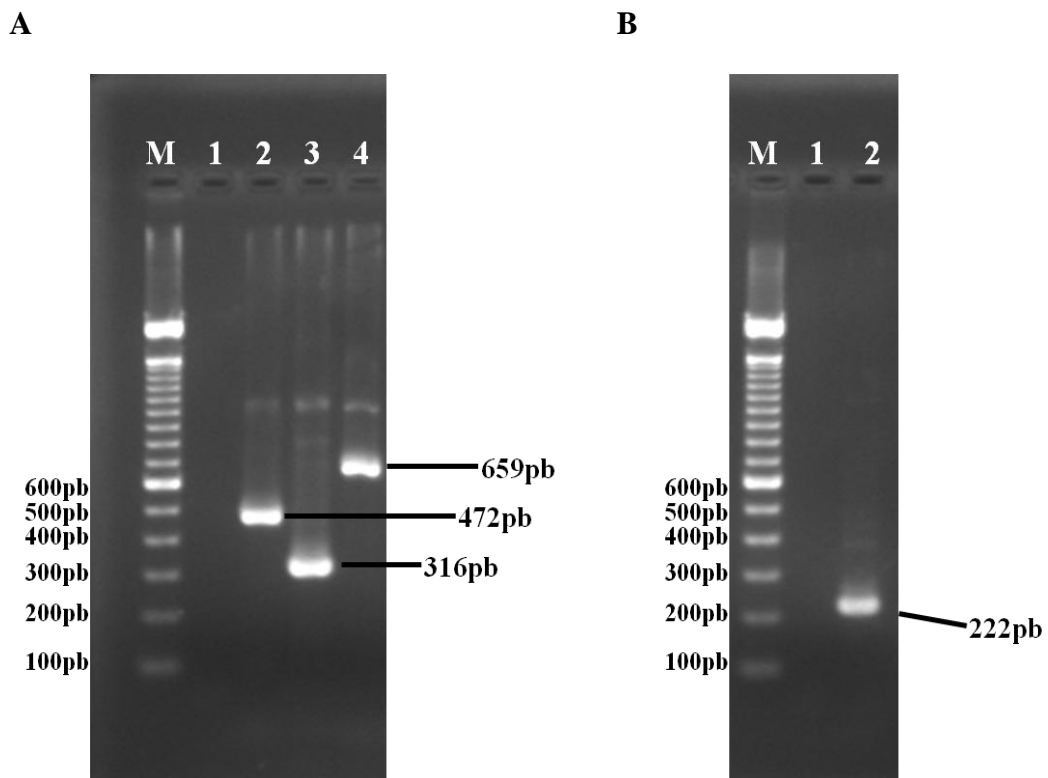


Figura 16 – **A:** Eletroforese em gel de agarose a 1,8% do resultado da multiplex-semi-nested PCR com *primers* sorotipo-específicos para dengue (nDEN1, nDEN2, nDEN3), segundo Bronzoni et al. (2005). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: DENV-1 (472pb); linha 3: DENV-2 (316pb); linha 4: DENV-3 (659pb). **B:** Resultado semi-nested PCR específico para DENV-4 com o primer nDEN 4. M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: Controle positivo DENV-4 (222pb).



6.4 Aplicação das reações de multiplex-semi-nested-RT-PCR convencionais (Lanciotti e Bronzoni) para detecção de genomas de DENV em amostras séricas humanas

Após a adaptação dos protocolos de multiplex semi-nested-RT-PCR (Lanciotti e Bronzoni) no LAPEVI, os mesmos foram utilizados para testar as amostras séricas dos pacientes incluídos no estudo. Foram testadas por este protocolo 55 amostras de soro, das quais, 9 amostras (16,36%) foram consideradas positivas ao levar-se em conta os resultados das amplificações das reações segundo Lanciotti e Bronzoni combinados. Porém, do total de amostras consideradas positivas houve concordância de resultados em apenas 2 (22,2%;

amostras 112H e 158H). Ao se considerar isoladamente os resultados das reações feitas por Lanciotti, apenas 6 amostras (10,9%) foram positivas. Pelo protocolo de Bronzoni, 5 amostras (9,1%) foram positivas conforme mostra a **Tabela 9**.

Para considerar uma amostra positiva em cada um dos métodos, levou-se em conta apenas aquelas que tiveram amplicon detectável após a reação de semi-*nested*-PCR. Digno de nota, uma amostra (151H) foi positiva nas 1ª PCRs de ambos protocolos (Lanciotti e Bronzoni) sem, contudo, ter mostrado amplificação nas reações seguintes de multiplex-semi-*nested*-PCR. Os resultados da amplificação desta amostra na 1ª PCR de Lanciotti e da 1ª PCR de Bronzoni são mostrados na **figuras 17 e 18**, respectivamente.

Tabela 9 – Amostras consideradas positivas após reação de multiplex-semi-*nested*-PCR para presença de genoma viral de DENV, utilizando protocolos com *primers* propostos por Bronzoni e Lanciotti.

N	Código do LAPEVI	Protocolo no(s) qual(ais) foi obtido amplicon após reação de <i>nested</i>	Intervalo de tempo entre coleta e início dos sintomas	Data da coleta da amostra
1	106H	Bronzoni	2 dias	08/11/2012
2	109H	Lanciotti	3 dias	08/11/2012
3	112H	Lanciotti e Bronzoni	—	09/11/2012
4	115H	Lanciotti	—	12/11/2012
5	116H	Lanciotti	2 dias	14/11/2012
6	155H	Bronzoni	7 dias	05/02/2014
7	158H	Lanciotti e Bronzoni	2 dias	10/03/2014
8	159H	Lanciotti	—	11/03/2014
9	162H	Bronzoni	5 dias	10/03/2014

NOTA: ___*: Pacientes sem prontuários ou sem registro.

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose a 2,0% mostrando a amostra 151H que foi positiva com *primers* D1 e D2 de Lanciotti, apresentando *amplicon* de 511 pb. Linha 1: marcador de 100pb; linha 2: controle negativo; linha 3: amostra 151H considerada positiva nesta etapa; linhas 4 e 5: amostras negativas; linha 6: controle positivo DENV-2 (511pb); linha 7: controle positivo DENV-3 (511pb).

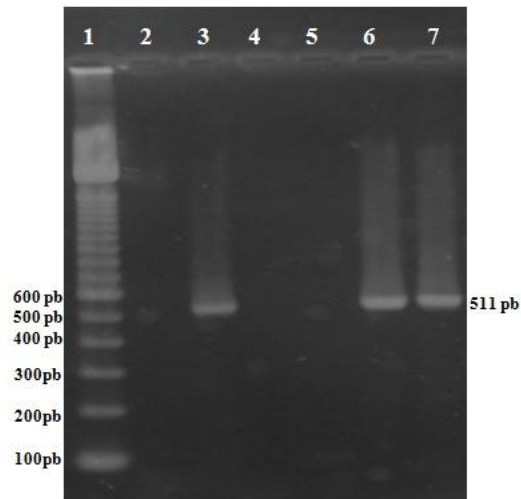
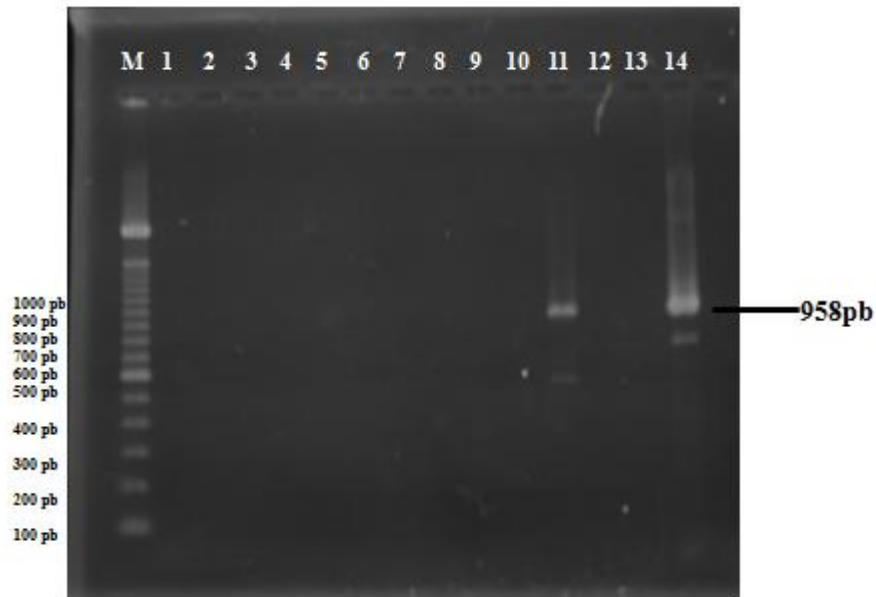


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% mostrando a amostra 151H que foi positiva com *primer* FG1 de Bronzoni, apresentando *amplicon* de 958 pb. Linha 1: marcador de 100pb; linha 2: controle negativo; linhas e 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 13: amostras negativas; linha 11: amostra 151H considerada positiva nesta etapa; linha 14: controle positivo DENV-2 (511pb); linha 14: controle positivo DENV-2 (958 pb).



Das 9 amostras positivas por RT-PCR convencional (Bronzoni e /ou Lanciotti), 8 delas (88,9%) apresentaram o sorotipo DENV-4 (**Figuras 19 e 20**) e 1 apresentou o sorotipo DENV-3 (11,1%) (**Tabela 10**).

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose a 2,0% representativa de amostra positiva para o sorotipo DENV-4, na reação de semi-nested-PCR com *primers* do Lanciotti et al. (1992). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: Amostra 109H considerada positiva; linha 3: controle positivo DENV-4 (392pb).

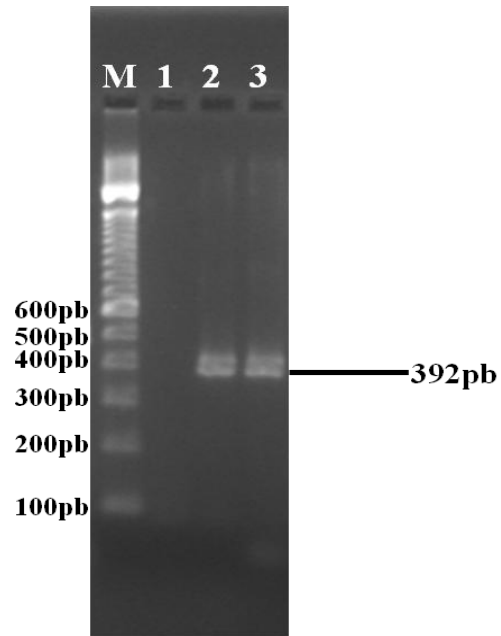


Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose a 1,8% representativa de amostra positiva para o sorotipo DENV-4, na reação de semi-nested-PCR com *primers* de Bronzoni et al. (2005). M: Marcador de 100pb. Linha 1: Controle negativo; linha 2: Amostra 158H considerada positiva; linha 3: Controle positivo DENV-4 (222pb).

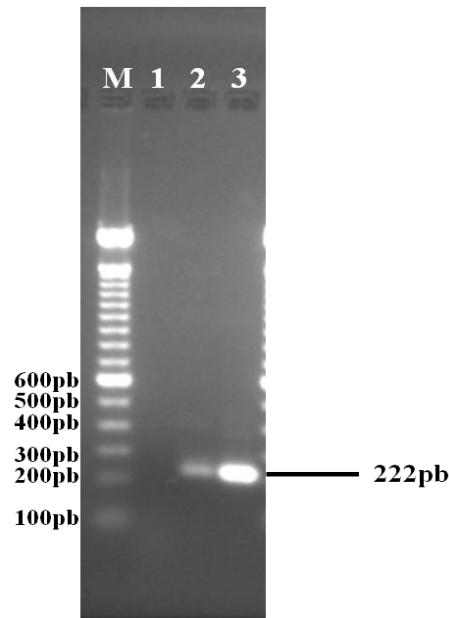


Tabela 10 – Sorotipos de DENV encontrados nas 9 amostras positivas testadas pelo multiplex-semi-nested-RT-PCR com *primers* de Lanciotti, et al. (1992) e de Bronzoni, et al. (2005).

Sorotipo	Amostras positivas
DENV-1	0
DENV-2	0
DENV-3	1 (11,1%)
DENV-4	8 (88,9%)

NOTA: As percentagens mostradas na tabela foram calculadas em relação ao total de amostras positivas.

Tomadas em conjunto, as três técnicas de detecção de genoma de DENV executadas no trabalho resultaram em 15 amostras positivas (27,27%) no total de 55 incluídas no estudo (em destaque colorido amarelo, verde e azul na **Tabela 11**). Das 15 amostras em que o genoma de DENV foi detectado, 13 (86,67%) foram consideradas positivas pelo *One-step* RT-PCR em tempo real (**Tabela 7**).

Tabela 11 – Resultado das análises de amplificação nas amostras séricas provenientes de pacientes com suspeita clínica de dengue incluídas no estudo após reações de *One-step* RT-PCR em tempo real e de multiplex-semi-nested-RT-PCR convencional, mostrando em destaques coloridos as 15 amostras positivas para DENV.

N	Código do LAPEVI	Resultado RT-PCR tempo real	Resultado RT-PCR convencional
1	102H	Negativo	Negativo
2	103H	Positivo	Negativo
3	104H	Negativo	Negativo
4	105H	Negativo	Negativo
5	106H	Positivo	DENV-4
6	107H	Negativo	Negativo
7	108H	Negativo	Negativo
8	109H	Positivo	DENV-4
9	110H	Positivo	Negativo
10	111H	Negativo	Negativo
11	112H	Positivo	DENV-4
12	113H	Negativo	Negativo
13	114H	Negativo	Negativo
14	115H	Positivo	DENV-3
15	116H	Positivo	DENV-4
16	117H	Positivo	Negativo
17	118H	Positivo	Negativo
18	119H	Negativo	Negativo
19	120H	Negativo	Negativo
20	121H	Negativo	Negativo
21	122H	Negativo	Negativo
22	124H	Positivo	Negativo
23	125H	Negativo	Negativo

Continuação da Tabela 11 – Resultado das análises de amplificação nas amostras séricas provenientes de pacientes com suspeita clínica de dengue incluídas no estudo após reações de *One-step* RT-PCR em tempo real e de multiplex-semi-nested-RT-PCR convencional, mostrando em destaques coloridos as 15 amostras positivas para DENV.

N	Código do LAPEVI	Resultado RT-PCR tempo real	Resultado RT-PCR convencional
24	126H	Negativo	Negativo
25	127H	Negativo	Negativo
26	128H	Negativo	Negativo
27	129H	Negativo	Negativo
28	130H	Negativo	Negativo
29	131H	Negativo	Negativo
30	132H	Negativo	Negativo
31	133H	Negativo	Negativo
32	134H	Negativo	Negativo
33	135H	Negativo	Negativo
34	136H	Negativo	Negativo
35	137H	Negativo	Negativo
36	138H	Negativo	Negativo
37	139H	Negativo	Negativo
38	140H	Negativo	Negativo
39	141H	Negativo	Negativo
40	142H	Negativo	Negativo
41	143H	Negativo	Negativo
42	144H	Negativo	Negativo
43	150H	Negativo	Negativo
44	151H	Negativo	Negativo
45	152H	Negativo	Negativo
46	153H	Negativo	Negativo
47	154H	Negativo	Negativo
48	155H	Negativo	DENV-4
49	156H	Positivo	Negativo
50	157H	Negativo	Negativo
51	158H	Positivo	DENV-4

Continuação da Tabela 11 – Resultado das análises de amplificação nas amostras séricas provenientes de pacientes com suspeita clínica de dengue incluídas no estudo após reações de *One-step* RT-PCR em tempo real e de multiplex-semi-*nested*-RT-PCR convencional, mostrando em destaques coloridos as 15 amostras positivas para DENV.

N	Código do LAPEVI	Resultado RT-PCR tempo real	Resultado RT-PCR convencional
52	159H	Positivo	DENV-4
53	160H	Negativo	Negativo
54	161H	Negativo	Negativo
55	162H	Indeterminado	DENV-4

LEGENDA: * X significa C_i indeterminado; **as amostras positivas foram repetidas. As amostras destacadas em amarelo significa que foram positivas apenas pelo método do real-time; as que aparecem em azul foram positivas apenas pelo método de multiplex semi-*nested* RT-PCR convencional; e na sobreposição entre as cores são mostradas em verde as amostras que foram positivas em ambos os métodos.

6.5 Comparação entre *One-step* RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional

Nas 55 amostras do estudo foi possível realizar a comparação dos resultados da amplificação obtidos pelas três técnicas executadas neste trabalho. A **Tabela 11** mostrada anteriormente ilustra os resultados positivos encontrados no presente trabalho. A comparação de resultados (positivo / negativo) entre: 1) *One-step* RT-PCR em tempo real e 2) multiplex semi-*nested*-RT-PCR convencional combinados (Lanciotti + Bronzoni) ou 3) só Lanciotti foram analisados estatisticamente (em tabelas de contingência 2 x 2, conforme reproduzidas abaixo), utilizando o teste exato de Fisher, e os resultados obtidos em ambas comparações (1 versus 2; e 1 versus 3) mostraram diferenças significativas (p= 0,0002 e p=0,0001, respectivamente, **Tabelas 12 e 13**). Porém, quando realizada a comparação dos resultados considerando-se apenas 1) *One-step* RT-PCR em tempo real e 2) multiplex semi-*nested*-RT-PCR convencional Bronzoni, a diferença entre os métodos não se mostrou significante (p=0,0798; **Tabela 14**).

Tabela 12 – Proporções entre amostras positivas e negativas obtidas nos testes de *One-step* RT-PCR tempo real e nos testes de RT-PCR convencionais combinados (Lanciotti e Bronzoni) para análise estatística.

	<i>One-step</i> RT-PCR tempo real positivo	<i>One-step</i> RT-PCR tempo real negativo	Total (p=0.0002)
RT-PCR convencional positivo	7 (12,73%)	2 (3,64%)	9 (16,36%)
RT-PCR convencional negativo	6 (10,91%)	40 (72,73%)	46 (83,64%)
Total	13 (23,64%)	42 (76,37%)	55 (100%)

Tabela 13 – Proporções entre amostras positivas e negativas obtidas nos testes de *One-step* RT-PCR tempo real e nos testes de RT-PCR convencional por Lanciotti para análise estatística.

	<i>One-step</i> RT-PCR em tempo real positivo	<i>One-step</i> RT-PCR em tempo real negativo	Total (p=0.0001)
RT-PCR convencional positivo (Lanciotti)	6 (10,91%)	0 (0%)	6 (10,91%)
RT-PCR convencional negativo (Lanciotti)	7 (12,73%)	42 (76,36%)	49 (89,09%)
Total	13 (23,64%)	42 (76,36%)	55 (100%)

Tabela 14 – Proporções entre amostras positivas e negativas obtidas nos testes de *One-step* RT-PCR tempo real e nos testes de RT-PCR convencional por Bronzoni para análise estatística.

	<i>One-step</i> RT-PCR tempo real positivo	<i>One-step</i> RT-PCR tempo real negativo	Total (p=0.0798)
RT-PCR convencional positivo (Bronzoni)	3 (5,45%)	2 (3,64%)	5 (9,09%)
RT-PCR convencional negativo (Bronzoni)	10 (18,18%)	40 (72,73%)	50 (90,91%)
Total	13 (23,63%)	42 (76,37%)	55 (100%)

6.6 Avaliação da sensibilidade do limite de detecção da técnica de Lanciotti et al. (1992) e Bronzoni et al. (2005)

A partir do estoque de vírus DENV-2 cepa NGC, foi realizado a avaliação da sensibilidade da técnica de Lanciotti et al. (1992) e Bronzoni et al. (2005). As **figuras 21 e 22** mostram as eletroforeses dos produtos da PCR (1ª etapa de reação). Na PCR do Lanciotti apareceu banda até a diluição 10^{-5} , enquanto que na PCR da Bronzoni apareceu até a diluição 10^{-4} . Com este resultado, pode-se dizer que a PCR do Lanciotti foi mais sensível. Os resultados demonstram os tamanhos de pares de base esperados para a PCR de Lanciotti (511 pb) e para a PCR de Bronzoni (958 pb).

Figura 21 – Eletroforese do produto da PCR do DENV-2, cujo RNA foi submetido a diluições decimais e ao protocolo de Lanciotti, 1992, onde M= marcador de 100 pb; 1= Controle negativo; 2= RNA diluição 10^{-2} ; 3= RNA diluição 10^{-3} ; 4= RNA diluição 10^{-4} ; 5= RNA diluição 10^{-5} ; 6= RNA diluição 10^{-6} ; 7: RNA diluição 10^{-7} ; 8= RNA diluição 10^{-8} ; 9= RNA diluição 10^{-9} .

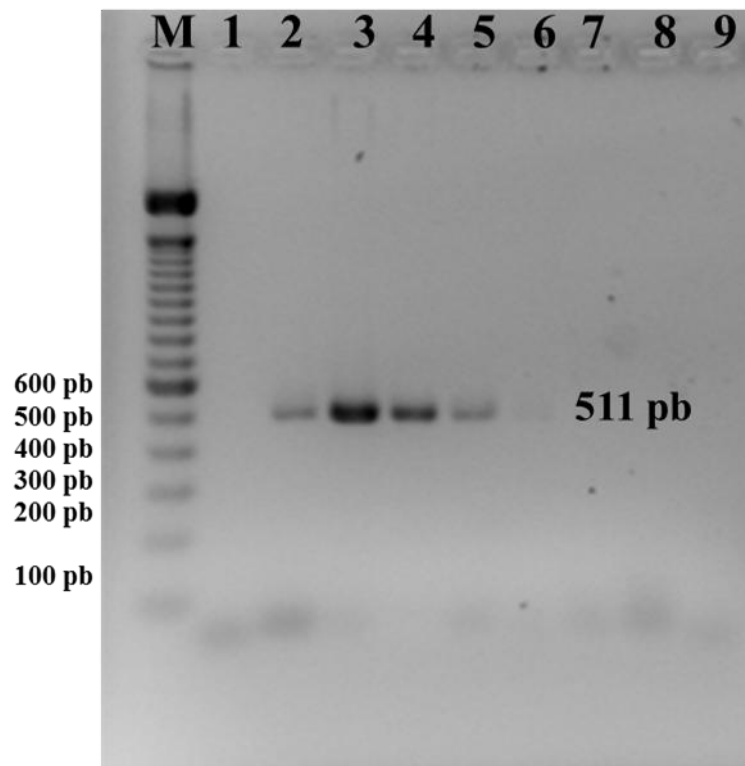
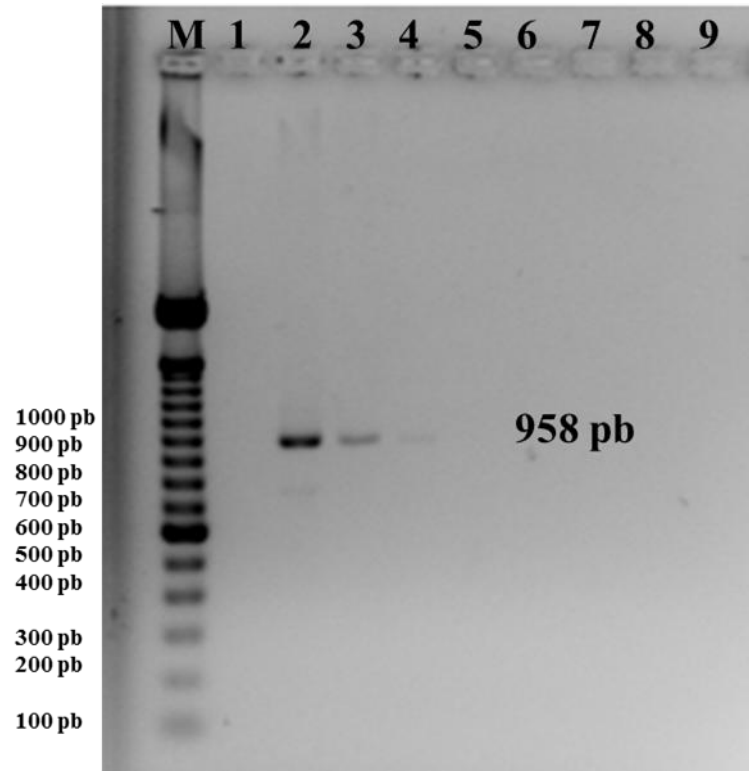


Figura 22 – Eletroforese do produto da PCR do DENV-2, cujo RNA foi submetido a diluições decimais e ao protocolo de Bronzoni, 2005, onde M= marcador de 100 pb; 1= Controle negativo; 2= RNA diluição 10^{-2} ; 3= RNA diluição 10^{-3} ; 4= RNA diluição 10^{-4} ; 5= RNA diluição 10^{-5} ; 6= RNA diluição 10^{-6} ; 7= RNA diluição 10^{-7} ; 8= RNA diluição 10^{-8} ; 9= RNA diluição 10^{-9} .



Em contrapartida, na 2^a etapa da reação, a *multiplex-semi-nested* do protocolo Bronzoni mostrou amplificação visível até a diluição 10^{-7} , enquanto que a *semi-nested* do protocolo Lanciotti mostrou uma banda fraca até a diluição 10^{-5} . Assim, conclui-se que a *multiplex-semi-nested* do protocolo Bronzoni foi mais sensível que a *semi-nested* do protocolo Lanciotti. Os resultados nas **figuras 23 e 24** demonstram os tamanhos de pares de base esperados para as reações de Lanciotti (119 pb) e Bronzoni (316 pb).

Figura 23 – Eletroforese do produto da semi *nested*-PCR do DENV-2, cujo RNA foi submetido a diluições decimais e ao protocolo de Lanciotti, onde M= marcador de 100 pb; 1= Controle negativo; 2= RNA diluição 10^{-2} ; 3= RNA diluição 10^{-3} ; 4= RNA diluição 10^{-4} ; 5= RNA diluição 10^{-5} ; 6= RNA diluição 10^{-6} ; 7= RNA diluição 10^{-7} ; 8= RNA diluição 10^{-8} ; 9= RNA diluição 10^{-9} .

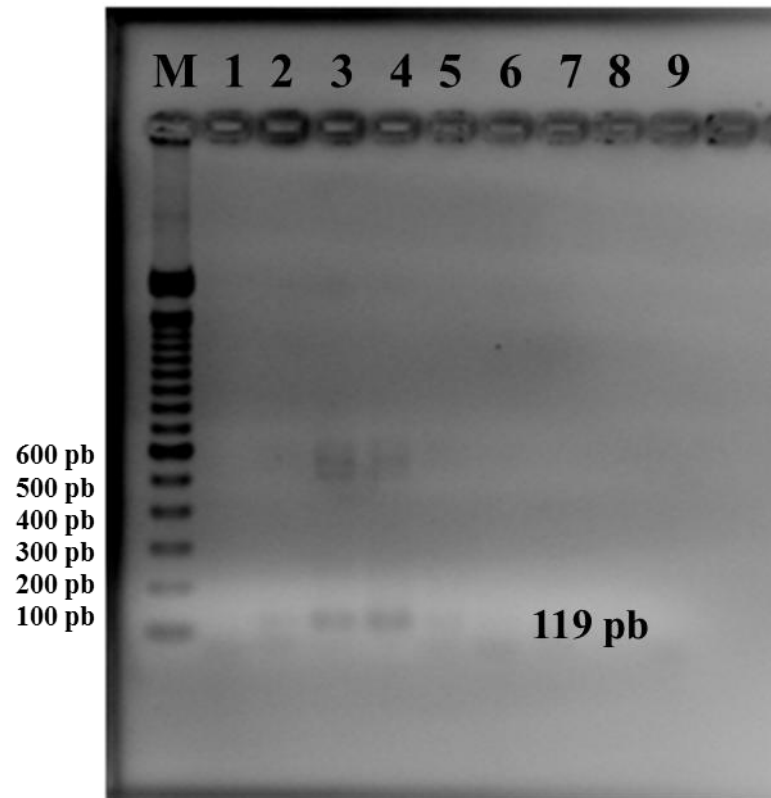
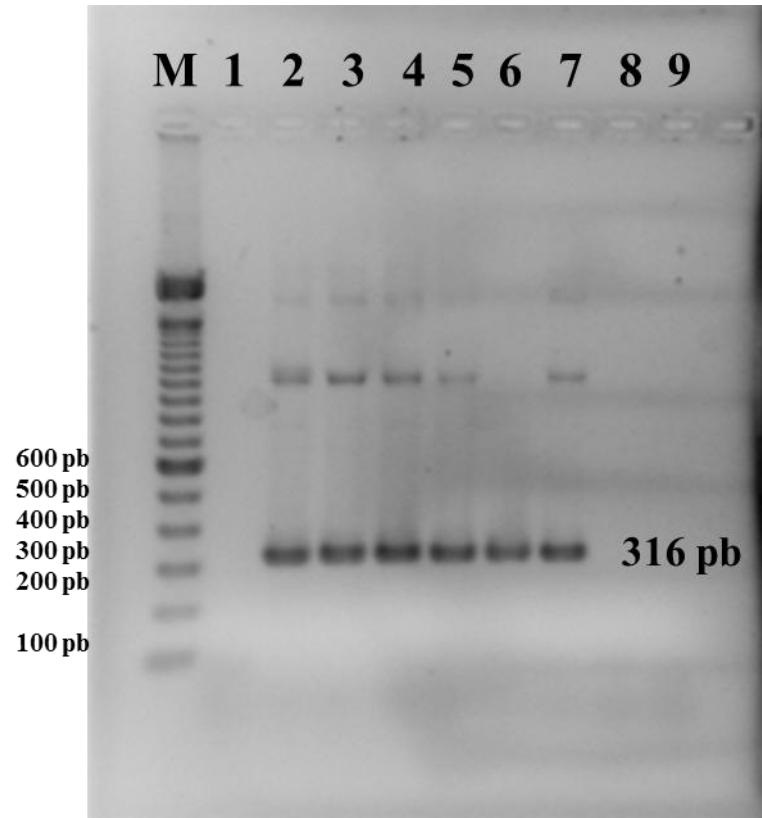


Figura 24 – Eletroforese do produto da multiplex-*nested*-PCR do DENV-2, cujo RNA foi submetido a diluições decimais e ao protocolo de Bronzoni, onde M= marcador de 100 pb; 1= Controle negativo; 2= RNA diluição 10^{-2} ; 3= RNA diluição 10^{-3} ; 4= RNA diluição 10^{-4} ; 5= RNA diluição 10^{-5} ; 6= RNA diluição 10^{-6} ; 7= RNA diluição 10^{-7} ; 8= RNA diluição 10^{-8} ; 9= RNA diluição 10^{-9} .



7 DISCUSSÃO

Na atualidade, a dengue é uma das enfermidades infecciosas de maior impacto no mundo, tanto por sua elevada morbidade quanto pelo aumento no número de casos de formas graves da doença. Um dos fatores que afetam o panorama da dengue numa dada região é a introdução de um novo sorotipo do DENV, o que pode aumentar o risco das formas hemorrágicas (TEIXEIRA et al., 2009). Em vista disso, embora os casos de dengue numa região endêmica sejam, em sua maior parte, diagnosticados apenas clinicamente, é essencial que se realize o diagnóstico laboratorial etiológico dessas infecções. Isto porque já é bem conhecido que o quadro clínico do paciente com suspeita de dengue pode ser facilmente confundido com outras arboviroses, sejam elas pertencentes à mesma família do DENV (*Flaviviridae*) ou a outras famílias virais (*Togaviridae*, *Bunyaviridae* e *Reoviridae*) (FIGUEIREDO, 2000; GUBLER, 2002; VASCONCELOS et al., 2005; FIGUEIREDO, 2007; GUZMAN et al., 2010). Uma das formas de se realizar o diagnóstico etiológico da infecção por DENV é através da pesquisa do genoma viral, o que não só permite a detecção precoce da infecção, como também a identificação do sorotipo viral, sendo útil para vigilância dessa doença bem como para estudos de epidemiologia molecular (LANCIOTTI et al., 1992; FIGUEIREDO, 2006).

No estado de Alagoas, a dengue se manifesta de forma endêmica e epidêmica, porém, o diagnóstico laboratorial só tem sido realizado por métodos sorológicos (pesquisa de anticorpos e de antígenos) e virológicos (isolamento viral em cultura de células), o que pode levar a resultados falso-negativos, além de não permitirem a análise da epidemiologia molecular das infecções. Em vista disso, esse trabalho realizou o estudo molecular de infecções por dengue em Maceió, como tentativa de reconhecimento dos sorotipos virais circulantes nas epidemias de 2012 a 2014 nesta cidade.

O método de *One-step* RT-PCR em tempo real tem se mostrado o de maior sensibilidade em inúmeros estudos para detecção de genomas virais, sejam eles para dengue ou para outros vírus (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002; SHU et al., 2003; ARISMENDY; CASTELLANOS, 2011). Em comparação à técnica de RT-PCR convencional, a RT-PCR em tempo real apresenta uma padronização mais fácil, maior especificidade e sensibilidade, uma taxa de contaminação menor, maior rapidez, além de possibilitar a quantificação das amostras (SHU et al., 2003; POERSCH et al., 2005; YONG et

al., 2007; POLONI, 2009). Além disso, nesta técnica não é necessária a manipulação do amplicon após a reação de amplificação, sendo, por isto, considerado um sistema fechado ou homogêneo (MACKAY, ARDEN & NITSCHKE, 2002). A técnica de PCR em tempo real possibilita acompanhar a amplificação e visualizar dados de forma mais rápida e exata, através do monitoramento da reação, à medida que a mesma avança, em tempo real. Os dados são, desta forma, coletados ao longo da PCR, ao invés de o serem apenas no final da reação (EÇA et al., 2004).

Pelo método de *One-step* RT-PCR em tempo real utilizado no presente estudo, menos de ¼ das amostras foram consideradas positivas para presença de genoma de DENV (**Tabela 7**), levando-se em consideração a análise conjunta dos parâmetros do teste (os valores de T_m , de C_t , da derivada da curva de dissociação, e a curva de amplificação [ΔRn]). Nas condições de reação empregadas neste estudo e utilizando-se diferentes tipos de controles positivos (diferentes linhagens de DENV, dos quatro sorotipos, como mostrados na **Tabela 5**), verificou-se que os valores de C_t e de T_m médios obtidos foram de 23.432 e 79.480, respectivamente. Estes valores devem servir de base para a interpretação dos resultados das amplificações obtidas nas amostras do estudo. Contudo, eles diferem ligeiramente dos valores médios encontrados por SANTOS et al. (2008), que foram: C_t entre 17 e 21, e T_m de 81. Ressalta-se, porém, que no estudo de SANTOS et al. (2008), embora tenha-se utilizado os mesmos *primers* do presente trabalho (RNC5'-S e RNC5'-C), as amostras de soro eram inicialmente inoculadas em cultura de células, para amplificação da quantidade de vírus da amostra, antes da realização da RT-PCR em tempo real. Além disso, no que diz respeito aos valores de T_m , a maioria das amostras incluídas no referido estudo eram de DENV-3 e nenhuma foi de DENV-4. Neste estudo, porém, entre as amostras em que foi possível determinar o sorotipo, a maioria foi de DENV-4 (**Tabela 10**).

Além disso, no presente trabalho observou-se que a algumas das amostras mostrou valores de C_t inferiores ao da média dos controles positivos (**Tabela 7**), o que sugere que as mesmas possuíam maior carga viral que a dos controles. Isso já era o esperado, pois os controles utilizados foram preparados a partir da propagação e adaptação dos respectivos vírus em cultura de células, o que resulta em aumento da carga viral (STORCH, 2001), ao passo que as amostras clínicas (soros) foram diretamente testadas no RT-PCR, sem isolamento prévio dos vírus em cultura de células. Outro grupo de pesquisadores, da Universidade de Cartagena na Colômbia, também utilizou o mesmo protocolo de reação de RT-PCR em tempo real que o do presente estudo e os autores consideraram positivas as

amostras que apresentavam C_t menores do que 42 (OCHOA DIAZ, et al. 2013). Corroborando com este dado, no presente estudo (**Tabela 7**), todas as amostras consideradas positivas por real time apresentaram C_{ts} menores do que 42 (a média foi de 30.081).

Uma amostra de nosso estudo apresentou um C_t dentro dos valores encontrados para os controles positivos (amostra 158H), com os C_t de 16.704 e 16.608 (**Tabelas 6 e 7**), ou seja, esta amostra apresentou uma alta carga viral em comparação com as outras amostras séricas positivas (**Tabela 8**), ao passo que a amostra 124H apresentou o maior C_t (39.975) e com isto a menor carga viral ($44,9 \times 10^3$ cópias de RNA/ mL) (**Tabela 8**). A amostra 158H foi coletada 2 dias após o início dos sintomas, enquanto a amostra 124H foi coletada 3 dias após o início dos sintomas. Porém, não se pôde relacionar, no presente estudo, carga viral alta com a fase precoce do período virêmico, pois não se acompanhou a cinética da viremia dos indivíduos. A carga viral de DENV tem sido relacionada à gravidade da doença em alguns estudos. No entanto, neste trabalho, não foi possível associar gravidade da doença com a carga viral. Isto, porque dos 13 pacientes em que foi detectado o genoma viral e a carga viral foi quantificada, apenas 6 indivíduos tiveram dados disponíveis, sendo que, destes, todos apresentavam-se com a forma clínica dengue. Vaughn et al. (2000) realizaram um estudo com crianças na Tailândia, o qual mostrou uma associação entre o pico do título de viremia e a gravidade da doença. Os pacientes que desenvolveram a síndrome do choque da dengue apresentaram os picos dos títulos virais de 100 a 1000 vezes maiores do que aqueles com DF mais benigna (branda), em infecção primária. Libraty et al. (2002) analisou a relação entre a viremia e a infecção secundária com DENV-3 em crianças na Tailândia. Os níveis da viremia foram maiores nos casos de DHF, de DF/DHF intermediária que em DF. O mesmo mostrou uma correlação positiva entre a hemoconcentração e os níveis de viremia. Contrariamente, Cruz-Hernández et al. (2013), num estudo realizado no México, mostrou que pacientes com a FD causada pelo DENV-1 e DENV-2 apresentaram níveis de viremia medianos significativamente maiores do que pacientes com a DHF.

Em relação aos achados com C_{ts} indeterminados pela técnica de One-step RT-PCR em tempo real, geralmente isso ocorre quando a quantidade de DNA amplificado é inferior ao limiar de detecção (*threshold*) depois de certos ciclos. Assim, das 55 amostras testadas, 36 (65,45%) tiveram C_t indeterminado. Nestes casos, duas explicações seriam possíveis: 1) ou as amostras possuíam uma carga de DENV menor que o limite de detecção do teste ou 2) as amostras eram, de fato, negativas para DENV. Neste último caso, outras duas hipóteses são possíveis: a) ou a doença febril aguda apresentada pelo paciente tinha outra etiologia que não

dengue ou b) a amostra sanguínea foi coletada fora do período de viremia da infecção. Estes aspectos serão discutidos a seguir.

Das 15 amostras do estudo (27,27%) que se apresentaram positivas para DENV em qualquer dos métodos utilizados, 11 (73,33%) tinham o registro do intervalo de tempo decorrido entre o início da doença e o dia da coleta sanguínea (**Tabelas 7 e 9**). Destas, 8 (72,73%) foram coletadas dentro do limite de 5 dias após o início da doença, e 3 foram coletadas até o 7º dia de doença (27,27%). O Ministério da Saúde considera que um paciente com suspeita de dengue tem período de viremia de 7 dias (BRASIL, 2014c). No entanto, outros autores consideram mais comum que a viremia dure somente até o 5º dia da doença (GUBLER, 1998; WHO, 2009; SANTIAGO et al., 2013). Outros, contudo, consideram que a viremia pode se estender até o 10º dia de doença (DE PAULA; FONSECA, 2004). Guilarde et al. (2008) detectaram viremia após a defervescência em pacientes que apresentaram FHD ou que apresentaram quadro intermediário de FD / FHD. Porém, segundo Gubler (1981), embora a viremia na dengue possa durar de dois a 12 dias, os vírus só foram detectáveis até o 4º ou 5º dia de doença. Vaughn et al. (2000) detectou período virêmico até o 7º dia de doença, porém com média de cinco dias. Trinta e nove amostras deste estudo (70,91% do total de 55 amostras e 90,70% do total das que tinham intervalo conhecido [n=43]) foram coletadas até o 7º dia da doença, sendo que destas 30 (54,55% do total) ocorreram até o 5º dia (**Tabela 4**), o que garante que a maioria das amostras do estudo estava, com certeza, dentro do período virêmico conhecido para dengue. Todavia, na intenção de incluir o máximo de número de amostras no estudo, foram excepcionalmente também incluídos quatro (7,27% do total) pacientes com mais de 7 dias de doença (de até 12 dias) e outros 12 (21,82% do total) em que não se tinha o registro do tempo decorrido desde o início dos sintomas. Dentro destas 12 amostras, há certamente a possibilidade de que algumas ou várias delas tenham sido coletadas seguindo-se o critério de inclusão (de até 7 dias de doença).

Ao se considerar um parâmetro essencial na interpretação dos dados de PCR em tempo real, os valores do T_m específicos para DENV podem variar de 77°C a 81°C no protocolo de One-step utilizado, dependendo do sorotipo (SANTOS et al., 2008) e isso foi demonstrado para os controles positivos utilizados neste trabalho (**Tabela 5**). Em outro protocolo de reação de RT-PCR em tempo real descrito por Yong et al. (2007), e que utiliza outro conjunto de primers, a T_m das amostras positivas para dengue variou de 81.5°C até 83.5°C. Já no presente estudo, considerando-se o valor da T_m , uma das amostras (132H) apresentou resultados discrepantes entre a primeira e segunda determinação (81.12°C e

84.84°C, respectivamente; **Tabela 6**), sendo, por isso, considerada como negativa para DENV. Posteriormente, a mesma amostra foi testada por RT-PCR convencional com *primers* para outra região gênica (genes C, prM [Lanciotti] e NS5 [Bronzoni]) e foi considerada negativa. Contudo, esta amostra apresentou C_t positivo assim como as amostras 125H e 136H, mas por não apresentarem temperaturas de dissociação compatíveis com DENV (**Figuras 10 e 11**, e **Tabela 6**) suspeitou-se que poderia tratar-se de infecções por outros flavivírus. Segundo Santos et al. (2008), embora os *primers* sejam genéricos para todos os sorotipos de DENV, eles são também altamente específicos para esta espécie, apesar disso, reações inespecíficas podem acontecer quando em presença de outros flavivírus (como febre amarela, Ilhéus, Saint Louis, Rocio, Bussuquara, Cacicaporé, Iguape). Na padronização do ensaio, esses autores testaram o método em amostras de isolados virais dessas espécies e encontraram que os outros flavivírus (que não DENV) foram detectados com C_t de 36–39, e com T_m de cerca de 75, o que corresponderia a dímeros de *primers* (SANTOS et al., 2008). Assim, as amostras 132H, 125H e 136H foram testadas por RT-PCR convencional para outros flavivírus, o Ilhéus (ILHV) e o Saint Louis (SLEV), mas nas reações de amplificação apareceram apenas bandas inespecíficas sendo, deste modo, consideradas negativas para estes flavivírus (dados não mostrados).

Já a hipótese da formação de dímeros de primers foi levada em conta nos casos das amostras com T_m diferentes dos DENV e que tiveram altos valores de C_t (por exemplo, as amostras 113H e 125H, que apresentaram C_t de 44.824 e 40.985, respectivamente, considerados muito altos) (**Tabela 6**). Na técnica descrita por Yong et al. (2007), os dímeros de *primers* apresentaram T_m entre 75 °C e 77 °C. No estudo realizado por Ferraz et al. (2013), o qual utilizou outro protocolo e *primers*, avaliou a especificidade da PCR em tempo real para dengue com amostras de cultura contendo outros flavivírus (vírus da diarreia viral bovina, febre amarela e Saint Louis). Não houve amplificação com amostra do vírus da diarreia viral bovina (BVDV). O vírus da febre amarela (YFV) apresentou uma curva de dissociação inespecífica e a sua T_m foi em torno de 75 °C, devido possivelmente a dímeros de *primers*. Já em relação ao vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) apresentou dois picos na curva de dissociação (T_{ms} entre 80 °C a 85 °C), sendo que um destes picos foi similar ao que é encontrado em amostras de dengue.

Em relação à comparação entre todos os métodos utilizados neste trabalho, ou seja, entre dois protocolos diferentes de multiplex-semi-nested-RT-PCR e *One-step* RT-PCR em tempo real para a detecção de RNA viral nas amostras, a reação em tempo real mostrou-se

mais sensível que a RT-PCR convencional, pois das 55 amostras analisadas, 13 (23,64%) foram consideradas positivas, enquanto que na reação convencional o genoma viral foi detectado apenas em nove amostras (16,36%) (**Tabela 12**). A comparação combinada do número de amostras positivas e negativas por real-time versus RT-PCR convencional (Lanciotti + Bronzoni) mostrou diferença estatística. De fato, de acordo com a literatura, a reação em tempo real é mais sensível que outras técnicas como RT-PCR convencional, isolamento viral e ELISA (IgM, IgG) (SHU et al., 2003; SANTOS et al., 2008; POLONI, 2009). Neste estudo, porém, a comparação entre número de amostras positivas e negativas obtidas por real-time e por RT-PCR protocolo Bronzoni não mostrou diferença estatística significativa (Tabela 14), embora o pequeno número de amostras avaliado possa ter prejudicado a relevância desta comparação. O teste exato de Fisher, porém, é um teste aplicável mesmo quando o n é pequeno (MOTTA; WAGNER, 2003).

Contudo, os *primers* utilizados nas reações de *One-step* RT-PCR em tempo real deste trabalho não permitiam a definição dos sorotipos virais, o que pode ser uma desvantagem em relação aos demais métodos adotados (Lanciotti e Bronzoni). Justifica-se, porém, que para o diagnóstico em tempo oportuno da infecção por dengue (ou seja, ainda durante o período da doença aguda) basta ao clínico, para o adequado manejo de seus pacientes, a confirmação de infecção por dengue, sendo, nestes casos, a sorotipagem um dado apenas complementar. Ressalta-se, porém, que a definição dos sorotipos virais é de alta relevância para questões epidemiológicas, inclusive com aplicação na vigilância das regiões acometidas por epidemias de dengue. Isto, porque dentre os fatores que influem no prognóstico do paciente infectado, inclui-se o sorotipo viral. Neste sentido, há mais de uma década já é conhecido, por exemplo, que o sorotipo DENV-2 tende a causar quadros clínicos mais severos nos indivíduos acometidos (VAUGHN et al., 2000; PAWITAN, 2011, DRUMOND et al., 2013). Ainda, podem ocorrer casos de co-infecção com diferentes sorotipos de DENV, o que já foi bem documentado no Brasil e em outros locais (BASTOS et al., 2012; COLOMBO et al., 2013). Assim, a determinação dos sorotipos virais foi um dos objetivos deste estudo. Através de RT-PCR convencional, em nove amostras consideradas positivas, foi possível detectar dois sorotipos virais, sendo a maioria DENV-4 (88,9%) e uma única amostra com DENV-3 (**Tabela 10**). No ano de 2012, em Alagoas, das 408 amostras em que foi realizada tentativa de isolamento viral, 20 (4,9%) amostras foram consideradas positivas, e nestas apenas o DENV-4 foi detectado, o que pode justificar a maioria dos casos serem confirmados como DENV-4, neste estudo (ESTADO DE ALAGOAS, 2013). No ano de 2013 e neste ano de 2014

nenhuma amostra teve os sorotipos do DENV identificados pelo órgão de referência regional (LACEN-AL) (ESTADO DE ALAGOAS, 2014b). Desta forma, este trabalho auxilia no conhecimento dos sorotipos circulantes no estado do ano de 2012 e 2014, pois em amostra do ano de 2012 (115H) foi detectado DENV-3.

Já em relação à comparação entre a sensibilidade dos dois protocolos de RT-PCR convencional (LANCIOTTI et al., 1992; BRONZONI et al., 2005) para a detecção de RNA viral nas amostras, na curva de sensibilidade da segunda etapa de reação (multiplex-semi-nested e semi-nested) o protocolo de Bronzoni mostrou-se mais sensível que o de Lanciotti. Porém, em contradição, na aplicação das técnicas para as 55 amostras séricas analisadas, seis (10,9%) foram consideradas positivas por Lanciotti, enquanto que na reação convencional por Bronzoni cinco foram positivas (9,1%) (**Tabela 9**). Não sendo possível, portanto, concluir qual dos dois protocolos foi o mais sensível, de fato. Ambos os métodos já foram utilizados com sucesso por diversos autores (MONDINI et al., 2007a; POLONI, 2009; SANTANA et al., 2010; COLOMBO et al., 2013; ROCCO; KAVAKAMA; SANTOS, 2001; POERSCH et al., 2005; CASTRO, 2008; PAUDEL et al., 2011; BASTOS et al., 2012), o que demonstra que são confiáveis para a detecção do genoma dos DENV.

Apesar disso, neste trabalho houve importantes discordâncias entre os dois métodos convencionais (**Tabelas 6 e 9**). Apenas duas amostras foram concordantes por estes dois métodos (112H e 158H). Entre as amostras discordantes, a amostra 115H, na qual foi detectado DENV-3 apenas pelo protocolo de Lanciotti, há uma possibilidade de que o vírus DENV-3 tenha sofrido mutação na posição da sequência de anelamento dos primers, resultando em cepas diferentes às usadas na padronização do teste do protocolo de Bronzoni, e talvez por isso, o *primer* usado possa não anelar no RNA deste vírus. Em relação às outras amostras que foram consideradas positivas apenas em um dos métodos (106H, 109H, 116H, 155H, 159H e 162H), há a possibilidade de ter ocorrido degradação do RNA viral, pois as reações foram realizadas em períodos diferentes e usaram o mesmo RNA extraído e estocado.

Uma das amostras, a 151H apresentou resultado intrigante, pois foi considerada positiva nas 1ª PCRs dos protocolos (Lanciotti e Bronzoni) sem ter mostrado amplificação nas reações seguintes de multiplex-semi-nested-PCR. Em relação ao aparecimento de amplicon de 511pb na 1ª PCR do protocolo do Lanciotti (**Figura 17**) há forte indício que de a amostra seria positiva para outro flavivírus. Isto, porque segundo o artigo original (LANCIOTTI et al., 1992), os *primers* D1 e D2 também anelam e mostram amplificação para outros flavivírus do

sorocomplexo da Encefalite Japonesa. Esses autores testaram seus *primers* com isolados virais de vírus do Nilo Ocidental e vírus da Encefalite de Saint Louis e obtiveram *amplicons* de 511pb nestas reações, iguais, portanto, aos esperados para DENV. Testaram também com o vírus da Encefalite Japonesa, e mostrou amplicon de 550pb. Houve ainda amplificação de fragmentos menores, inespecíficos, com vírus de outros sorocomplexos, como Febre amarela e Edge Hill (LANCIOTTI et al., 1992). Finalmente, no protocolo de Bronzoni, os *primers* da primeira etapa foram já desenhados para anelarem em regiões conservadas de todos os flavivírus, sendo gênero-específicos (BRONZONI et al., 2005). Por este motivo, esta amostra foi testada para os flavivírus Encefalite de Saint Louis, Rocio e Ilhéus, mas resultou em uma banda forte, porém não com os tamanhos esperados (dados não mostrados).

A circulação de todos estes flavivírus no Brasil tem sido demonstrada por ensaios sorológicos em animais silvestres, animais sentinelas e seres humanos, bem como, em estudos moleculares. Além disso, todos esses arbovírus normalmente produzem no homem doença febril aguda indistinguíveis (TERZIAN et al., 2011). No Brasil, o risco dessas viroses emergirem é relacionado à existência de grandes cidades densamente povoadas e infestadas por mosquitos *Culex*, *Aedes aegypti* e outras espécies (GUBLER, 2002). Em 2004, o vírus da Encefalite de Saint Louis foi isolado pela primeira vez em São Paulo/SP em um paciente com doença febril aguda que recebeu diagnóstico inicial para dengue (ROCCO et al., 2005). Em 2006, Mondini et al. (2007b) detectaram pela primeira vez, um surto de infecção por Encefalite de Saint Louis (SLEV) concomitante com uma epidemia de DENV-3 em São José do Rio Preto/SP. Posteriormente, outros estudos confirmaram a ocorrência dessas infecções no país (MONDINI et al., 2007a; TERZIAN et al., 2011), como em Ribeirão Preto/ SP, por exemplo, onde detectou-se um caso de Encefalite de Saint Louis em paciente que havia recebido diagnóstico inicial de dengue. Neste caso, foram encontrados anticorpos IgG anti-SLEV e anticorpos neutralizantes, além de resultado positivo na RT-PCR (MAIA et al., 2014). Um outro estudo, em 2011, em Minas Gerais, mostrou que o vírus SLEV também foi isolado de cérebro de cavalo que apresentava manifestações neurológicas (ROSA et al., 2013).

Há evidências de outros flavivírus causando infecções subnotificadas no Brasil, como a presença de anticorpos neutralizantes para vírus Rocio em pessoas vivendo em áreas rurais das Regiões Sudeste e Nordeste do Brasil (FIGUEIREDO, 2000) e dois casos de infecção aguda por Rocio na Bahia, em 1995 (STRAATMANN et al., 1997). É importante chamar atenção também para o vírus do Nilo Ocidental que é também membro do gênero *Flavivirus* e

leva a quadro clínico com febre e exantema, podendo ser facilmente confundido com a infecção pelo DENV (SOARES et al., 2010). Foi realizada uma pesquisa para presença de anticorpos específicos contra este vírus em 168 cavalos no Pantanal e encontrou-se 3 animais com os anticorpos, demonstrando evidência sorológica da circulação do vírus Nilo Ocidental no Brasil (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). Na região Nordeste, anticorpos monotípicos anti-Nilo Ocidental foram também detectados em 6 amostras dos 88 soros de cavalos do estado da Paraíba (SILVA, 2010).

Em suma, considerando-se que as amostras séricas incluídas neste estudo eram todas provenientes de indivíduos com sintomas sugestivos de dengue, e que a maior parte delas foi coletada dentro do período de viremia – o que evitaria resultados falsos negativos na pesquisa de genomas virais -, mas que somente 27,27% delas apresentaram amplificação positiva para DENV, estes resultados sugerem que outros flavivírus podem estar causando infecções em Maceió, mas recebendo diagnóstico clínico equivocado de dengue. Mais estudos de triagem sorológica e molecular para outros arbovírus necessitam ser realizados para comprovar essa hipótese.

8 CONCLUSÕES

- Através de todas as técnicas utilizadas no estudo, *One-step* RT-PCR em tempo real e multiplex-semi-nested-PCR, foi detectada presença de genoma de vírus dengue em apenas 15 amostras séricas humanas. Considerando que isto representa somente 27,27% do total, esse dado sugere que outros flavivírus possam estar causando infecções em Maceió, mas recebendo diagnóstico clínico de dengue de forma equivocada.
- Os sorotipos das infecções por dengue foram determinados em 9 das amostras do estudo, sendo que a maioria apresentou-se como sendo DENV-4 e apenas uma demonstrou ser DENV-3.
- Na comparação da sensibilidade dos métodos *One-step* RT-PCR em tempo real e multiplex-semi-nested-RT-PCR para detecção de genoma de dengue, o método do *One-step* RT-PCR em tempo real se mostrou capaz de detectar maior número de amostras positivas. Porém, sem a realização de curvas de sensibilidade por todos os métodos, não foi possível concluir sobre essa questão de modo definitivo.

REFERÊNCIAS

- ALFONSO, H. L. et al. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. **Virology Journal**, v. 9, p.124, 2012.
- AMARILLA, A. A. et al. Genetic diversity of the E protein of Dengue Type 3 virus. **Virology Journal**, v. 6, p. 113-126, 2009.
- ARAÚJO, J. M. G. et al. Origin and Evolution of Dengue Virus Type 3 in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, 2012.
- ARISMENDY, J. P.; CASTELLANOS, J. E. Real time PCR. Application in dengue studies. **Colombia Médica**, v. 42, n. 2, 2011.
- ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 5, p. 539–544, 2003.
- AQUINO, V. et al. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002–2004. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 710-715, 2006.
- BALMASEDA, A. et al. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 3, p. 449–456, 2006.
- BARBOZA, M. M. O. **Caracterização genômica do sorotipo 1 de vírus dengue isolados no Ceará no ano de 2011**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- BASTOS, M. S. et al. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(3), p. 393-394, mai-jun, 2012.
- BRASIL. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013 **Ministério da saúde**. 2014a. Disponível em: <
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/27/Casos-e-incid-dengue-ate 2013.pdf>
 >.Acesso em: 18 Mai. 2014.
- BRASIL. Dengue. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Caderno 9, 2010. Disponível em: <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_epidemia_2010_web.pdf
 > Acesso em: 25 mar. 2014. 06 Agos. 2013.
- BRASIL. Dengue: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 22 de 2014. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Volume 45, Nº 11, 2014b. Acesso em: 13 jun. 2014. 06 Agos. 2014.

BRASIL. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. . **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.** Departamento de Vigilância Epidemiológica 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_epidemias_dengue_11_02_10.pdf >. Acesso em: 06 Agos. 2013.

BRASIL. Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **NOTA TÉCNICA N.º 110 / 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS.** 2010.

BRASIL. Nova classificação de caso de dengue – OMS. **Ministério da Saúde.** Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. 2014c. .Disponível em:<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/Download/Nova_classificacao_de_caso_de_dengue_OMS.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2014.

BRONZONI, R. V. M. et al. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p. 696-702, 2005.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. Chapter 33. In: **Fields - Virology**, vol. 1, 4th Edition.. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 852 – 920.

CARDOSA, J. et al. Dengue vírus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with dengue hemorrhagic fever. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 423. 2009.

CARNEIRO, A. R. **Caracterização molecular de cepas do Vírus Dengue 1 isoladas no Brasil entre os anos de 1994 a 2008.** 2009. 144 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

CASALS, J.; BROWN, L. V. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 99, p. 429–449, 1954.

CASTRO, L. A. **Avaliação da detecção da proteína NS1 no diagnóstico da infecção pelo vírus dengue-3 em comparação a outros métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico da dengue, São Paulo.** 121p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências). FMRP-USP. Ribeirão Preto, 2008.

CHIEN, L. J. et al. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1295-1304, 2006.

COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **Journal of Virology**, p. 853–859, 2005.

COLOMBO, T. et al. Co-infection of dengue virus by serotypes 1 and 4 in patient from medium sized city from brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.55, n. 4, p. 275-281, 2013.

CRUZ-HERNÁNDEZ, S. I. et al. Determination of Viremia and Concentration of Circulating Nonstructural Protein 1 in Patients Infected with Dengue Virus in Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 3, p. 446–454, 2013.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n.6, Salvador, dez., 2004.

DOWD, K. A.; PIERSON, T. C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: A reductionist view. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 306–315, 2011.

DRUMOND, B. P. et al. Circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2, Genotype American/Asian in Brazil: Dynamics and Molecular and Phylogenetic Characterization. **PLOS ONE**, v. 8, 2013.

EÇA, L.P. et al. In: **Biologia Molecular – Guia Prático e Didático**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

ESTADO DE ALAGOAS. Dados parciais até Semana 05. Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas. **Boletim Informativo Semanal**. 2009. Disponível em: <http://siteantigo.saude.al.gov.br:82/sites/default/files/boletim_suvisa_semana_05.pdf> Acesso em: 22 set. 2014.

ESTADO DE ALAGOAS. Emergência de Saúde Pública de Interesse Estadual – ESPIE–Enchentes. Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas. **Nota Técnica CIEVS/SES/AL**. Nº. 39/10. 2010a. Disponível em: <http://siteantigo.saude.al.gov.br:82/sites/default/files/nota_tecnica_no_39_enchentes.pdf> Acesso em: 22 set. 2014.

ESTADO DE ALAGOAS. Encerramento da busca ativa diária do CIEVS dos agravos de notificação nos municípios em Estado de Calamidade Pública (ECP). Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas. **Nota Técnica CIEVS/SUVISA/SES/AL**. Nº 43. 2010b. Disponível em: <http://siteantigo.saude.al.gov.br:82/sites/default/files/nota_tecnica_no_43_municipios_e_cp_encerramento_da_busca_diaria.pdf> Acesso em: 22 set. 2014.

ESTADO DE ALAGOAS. Situação Atual da Dengue em Alagoas. Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas. **Boletim Informativo Semanal**. Nº 52/2012. 2013. Disponível em: <http://www.saude.al.gov.br/sites/default/files/boletim_suvisa_semana_52_-_cleide_0.pdf> Acesso em: 13 jan. 2014.

ESTADO DE ALAGOAS. Situação Atual da Dengue em Alagoas. Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas. **Boletim Informativo Semanal**. Nº 52/2013. 2014b. Disponível em: <http://www.saude.al.gov.br/sites/default/files/boletim_suvisa_semana_52_-_cleide.pdf> Acesso em: 13 jan. 2014.

ESTADO DE ALAGOAS. Situação Atual da Dengue em Alagoas. Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas. **Nota Técnica Semanal**. Nº 17. 2014a. Disponível em: <http://www.saude.al.gov.br/sites/default/files/nota_tecnica_semana_17-2014.pdf> Acesso em: 18 mai. 2014.

- FÉRES, V. C. R. **Epidemiologia molecular do vírus dengue em Goiânia-GO, 1994-2006: vigilância laboratorial e caracterização dos sorotipos circulantes.** 149 f. Tese (Doutor em Medicina Tropical), Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Goiânia, 2008.
- FERNANDEZ-GARCIA, et al. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host Microbe**, v. 5, p. 318–328, 2009.
- FERRAZ, F. O. et al. Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, p. 41–46, 2013.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 203-210, mar-abr, 2006.
- FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1643-1649, 2000.
- FIGUEIREDO, R. M. et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.
- GOMES, A. L. V. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. Short communication. **Journal of Virological Methods**, v. 145, p. 76–79, 2007.
- GONCALVEZ, A. P. et al. Diversity and Evolution of the Envelope Gene of Dengue Virus Type 1. **Virology**, v. 303, p 110–119, 2002.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 480-496, 1998.
- GUBLER, D. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 17, n. 4, p. 221-4, 2005.
- GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives Of Medical Research**, Fort Collins, p.330-342, 2002.
- GUBLER, D. J. et al. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 59, n. 4, p. 623-630, 1981.
- GUILLARDE, A. O. et al.. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. **The Journal Infectious Diseases**, v. 197, p. 817-824, 2008.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 7–16, 2010.

- GUZMAN, M. G. et al. Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 114-117, 1996.
- HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v. 370, p. 1644-1652, 2007.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, p. 476-481, 1988.
- HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, p. 201-217, 1977.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 376-396. 1990.
- HOLMES, E. C. RNA virus genomics: a world of possibilities. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, 2009.
- KOURI, G. P. et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: Lessons from the cuban epidemic, 1981. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 67, p. 375–380, 1989.
- KUMARIA, R.; CHAKRAVARTI, A. Molecular detection and serotypic characterization of dengue viruses by single-tube multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, p. 311-316, 2005.
- LAI, Y. L. et al. Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 935-941, 2007.
- LANCIOTTI, R. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.
- LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Virology**, v. 78, p. 2279–2284, 1997.
- LEWIS, J. A. et al. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology**, v. 197, p. 216–224, 1993.
- LIBRATY, D.H. et al.. Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, p. 1213-1221, 2002.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.
- LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The 33 Viruses and Their Replication. In: **Fields Virology**, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 2007. p.1103-1113.

MACKAY, I. A.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MAIA, F. G. M. et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 96–97, 2014.

MARTÍN, J. L. S. et al. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128–135, 2010.

MODIS, Y. et al. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**. v. 427, p. 313–319, 2004.

MONDINI, A. et al. Saint Louis Encephalitis vírus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n. 1, p. 176-178, 2007b.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v.40, p. 84-86, 2007a.

MOTTA, V. T.; WAGNER, M. B. **Bioestatística**. Caxias do Sul: EDUCS, 2003. p. 180.

MULLER, V. D. M. **Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela**. 102 f. Tese (Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011.

NISALAK, A. et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973-1979. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 191–202, 2003.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue Haemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz** ,v. 86, p. 269, 1991.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue Virus Type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p.253, 1990.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, p. 415, 2013.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, 2004.

OCHOA DIAZ , M. M. O. et al. Detecção molecular do vírus da dengue em amostras coletadas em Bolívar Colômbia. **Livro de resumos XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Página (resumo) AO-27, agos. 2013. 1 CD-ROM.

OPAS, OMS. Distribuição dos vírus dengue nas Américas. **Organização Pan Americana de Saúde. Organização Mundial da Saúde**. 2014. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/CD/Dengue/1990-2013-cha-dengue-serotypes-americas-map.jpg>. Acesso em: 18 mai. 2014.

OSANAI, C. H. et al. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 1, p. 53-54, 1983.

PAUDEL, D. et al. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 10, 2011.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile vírus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467-474, 2011.

PAWITAN, J. A. Dengue Virus Infection: Predictors for Severe Dengue. **Acta Medica Indonesiana**, v. 43, n. 2, p. 129-135, 2011.

PEELING, R.W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 30-38, 2010.

PEREIRA, M. N. et al. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 293–295, 2004.

POERSCH, C. O. et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 272–277, 2005.

POLONI, T. R. R. S.. **Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas a Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da Região Sudeste do Brasil: Aspectos Epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, p 218 – 227, 1994.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 315–341, 2003.

RICO-HESSE R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, p. 479–493, 1990.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244–251, 1997.

ROCCO, M.I.; KAVAKAMA, B.B.; SANTOS, C.L.S. Brief communication first isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 55-57, 2001.

ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 281-285, 2005.

ROMANOS, T. V. Maria. Febre Amarela e Dengue. In: **Introdução à Virologia Humana**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2008. p. 399-409.

ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7:e2537, 2013.

SABIN, A. B. Relationships between arthropod-borne viruses based on antigenic analysis, growth requirements, and selective biochemical inactivation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 56, n. 3, p. 580-582, 1953.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.1, p. 30–50, 1952.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**, v. 81(1), p. 6-15. 2009.

SANTANA, V. S. et al.. Concurrent dengue and malaria in the Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43(5), p. 508-511, 2010.

SANTIAGO, G. A. et al. Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, 2013.

SANTOS, H.W.G. et al. A Simple One-Step Real-Time RT-PCR for Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 1426–1433, 2008.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. An outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 245-246, 1986.

SHU, P. Y. et al. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR Green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2408–2416, 2003.

SIERRA, B. et al. Variation in inflammatory / regulatory cytokines in secondary, tertiary, and quaternary challenges with dengue virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 538-547, 2012.

SILVA, J. R. **Pesquisa de infecções por flavivírus da encefalite de Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral**. 149f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2010.

SOARES, C. N. et al. Is west nile virus a potential cause of central nervous system infection in Brazil? **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 68, n. 5, p. 761-763, 2010.

STRAATMANN, A. et al. Evidência sorológica da circulação do arbovírus Rocio (Flaviviridae) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 511-515, 1997.

STORCH, G.A. Diagnostic Virology. chapter 18. In: **Fields - Virology**, vol. 1, 4th Edition. FIELDS, B.N. et al. (Editors). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 410 – 442. 2001.

TEIXEIRA, M. G. Few characteristics of dengue's fever epidemiology in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 18, p. 1-4, 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, p. 7-18, 2009.

TERZIAN, A. C. B. et al. Detection of Saint Louis Encephalitis Virus in Dengue-Suspected Cases During a Dengue 3 Outbreak. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 3, p. 291-300, 2011.

TRENT, D. W. et al. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. **Virology**, v. 128, p. 271–284, 1983.

VASCONCELOS, P.F.C. et al. Arboviroses. In: **Tratado de infectologia**. FOCACCIA, R (Ed.). 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 2–9. 2000.

WAHALA, W. M. P. B.; SILVA, A. M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, v. 3, p. 2374-2395, 2011.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 523–540, 2009.

WILDER-SMITH, M. D.; GUBLER, D. J. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. **Medical Clinics of North America**, v. 92 p. 1377–1390, 2008.

WHO. **Dengue e dengue grave. Dengue and severe dengue**. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: 24 mar. 2014, 12:49.

WHO. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: **World Health Organization**. 2009.

YONG, Y. K. et al. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. **Singapore Medical Journal**; v. 48, n. 7, p. 662, 2007.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante voluntário(a) da pesquisa e pelo responsável)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após o consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa”

Eu,.....,

tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo “Detecção molecular e genotipagem do vírus da dengue em Alagoas”, que será realizada no(a) Hospital Escola Dr. Hélivio Auto, em Maceió, e no Minipronto-socorro Dr. João Fireman, em Maceió, recebi do(a) Sr(a) Dra. Alessandra Abel Borges, bioquímica e professora adjunta, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- 1) Que o estudo se destina a realizar diagnóstico do micróbio (vírus) causador da doença pesquisada (dengue);
- 2) Que a importância deste estudo é a de saber quais tipos de vírus da dengue estão presentes em Alagoas;
- 3) Que os resultados que se desejam alcançar são: levantar dados novos da doença em Alagoas e levar a um melhor conhecimento do vírus da dengue no Brasil.
- 4) Que este estudo começará em agosto de 2012 e terminará em dezembro de 2014;
- 5) Que eu participarei do estudo da seguinte maneira: na autorização aos pesquisadores em coletar e analisar o meu sangue, além de autorizar a análise dos meus dados pessoais e clínicos. Além disso, fui informado que não haverá custos ou despesas para a minha participação no projeto;
- 6) Que os desconfortos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: pequena dor ou incômodo no local onde o sangue será coletado;
- 7) Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: pequena dor ou incômodo no local onde o sangue será coletado;
- 8) Que os pesquisadores adotarão as seguintes medidas para minimizar os riscos: A coleta será feita por pessoas treinadas, que usarão equipamentos de proteção e materiais de coleta apropriados. Se ocorrer algum problema, como dor ou sangramento no local da coleta, eu poderei contar com a assistência dos profissionais do Hospital Escola Dr. Hélivio Auto, sendo responsável por ela a Dra. Luciana Maria de Medeiros Pacheco.
- 9) Que poderei contar com a assistência do Hospital Escola Dr Hélivio Auto, sendo responsável (is) por ela a Dra. Luciana Maria de Medeiros Pacheco;
- 10) Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação são: diagnóstico laboratorial da doença, que pode levar ao tratamento correto da mesma; e conhecer o tipo de vírus da dengue presente em Alagoas, conseguidos através da coleta do meu sangue que será analisado para o diagnóstico de dengue;
- 11) Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;
- 12) Que, a qualquer momento, em se tratando de questionário, eu terei o direito de não responder a alguma pergunta que não queira;

13) Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;

14) Que as informações conseguidas através de minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto;

15) Que eu deverei ser ressarcido por qualquer despesa que venha a ter com a minha participação nesse estudo e, também, indenizado por todos os danos que venha a sofrer pela mesma razão, sendo que, para estas despesas foi-me garantida a existência de recursos.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e, estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dela participar e, para tanto eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do(a) participante voluntário(a):

Domicílio: (rua, conjunto).....Bloco:
 Nº:, complemento: Bairro:
 Cidade:CEP.:..... Telefone:
 Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a). Alessandra Abel Borges

Endereço Praça Afrânio Jorge s/n
 Bloco: /Nº: /Complemento: Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia - LAPEVI
 Bairro: /CEP/Cidade: Prado/57010-020/Maceió
 Telefones p/contato: 3336-3444 ramal 223; 9336-5204

Nome e Endereço do Pesquisador Responsável: Dra. Alessandra Abel Borges

Endereço Praça Afrânio Jorge s/n, Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia – LAPEVI,
 Prado/57010-020/Maceió
 Telefones p/contato: 3336-3444 ramal 223; 9336-5204

Instituição: Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Endereço Praça Afrânio Jorge s/n
 Bloco: /Nº: /Complemento: Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia - LAPEVI
 Bairro: /CEP/Cidade: Prado/57010-020/Maceió
 Telefones p/contato: 3336-3444 ramal 223; 9336-5204

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas, dirija-se ao Comitê de Ética em Pesquisa e Ensino (COEPE), pertencente ao Centro Universitário Cesmac – FEJAL: Rua Cônego Machado, 918. Farol, CEP.: 57021-060. Telefone: 3215-5062. Correio eletrônico: cepcesmac@gmail.com

Maceió, _____ de _____ de _____

Assinatura ou impressão datiloscópica do(a) voluntário(a) ou responsável legal
 (rubricar as demais folhas)

Assinatura do responsável pelo Estudo
 (rubricar as demais folhas)

APÊNDICE B – Obtenção da cepa viral D3BR/RP1/2003 de DENV-3, utilizado na curva padrão para quantificação da carga viral

Para a construção da curva de quantificação da carga viral de DENV, utilizou-se RNA do vírus DENV-3, cepa D3BR/RP1/2003, o qual foi obtido por transfecção *in vitro*, técnica realizada no Laboratório de Virologia da FCFRP-USP e descrita a seguir. O RNA foi transcrito *in vitro* a partir de um clone plasmidial contendo um fragmento de 2500 pb, o qual corresponde à extremidade 5' deste DENV-3. A preparação deste plasmídeo foi realizada da seguinte forma: o fragmento de 2500 pb foi amplificado por RT-PCR e o mesmo foi inserido no plasmídeo PXL (Invitrogen, EUA), que foi utilizado para transformar bactérias *Escherichia coli*. Uma alíquota de 250 uL das bactérias contendo os plasmídeos foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo ampicilina, seguida de incubação a 37 ° C por 14 h com agitação. Posteriormente, purificou-se o plasmídeo utilizando o *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) conforme especificações do fabricante. Em seguida, o plasmídeo foi linearizado por digestão com enzima de restrição Bam HI, e foi submetido a eletroforese num gel de agarose a 1% e purificado a partir do gel utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Para a preparação de RNA, 1 pg do plasmídeo linearizado foi transcrito utilizando o *RNAMaxx™ High Yield Transcription Kit* (Stratagene, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA foi digerido utilizando RQ DNase (Promega, EUA) por 20 minutos a 37 ° C. Após isto, o RNA foi purificado utilizando o *QIAamp viral RNA Kit* (QIAGEN, Alemanha) e a concentração foi determinada por espectrofotometria a 260 nm. Com base na concentração e no tamanho do produto de RNA (2500 pb) do número de cópias do equivalente ao RNA genômico foi calculada (AQUINO et al., 2006).

ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CESMAC



Comitê de Ética em Pesquisa e Ensino do Centro Universitário Cesmac (COEPE)

Registro nº 25000.198371/2011-70 – CONEP/CNS/SIPAR/MS – 10/11/2011.

Maceió, 24 de agosto de 2012.

PARECER CONSUBSTANCIADO

I) IDENTIFICAÇÃO:

Protocolo nº: 1384/12 **Título:** Detecção molecular e genotipagem do vírus da dengue em Alagoas

Grupo III Área de conhecimento: Ciências biológicas **Código:** 2.12

Pesquisador Responsável: Alessandra Abel Borges

Instituição Responsável: Universidade Federal De Alagoas

Data de Entrada: 08/05/2012

Analisado na 131ª Reunião Ordinária

Data da Reunião: 11/07/2012

II) SUMÁRIO GERAL DO PROTOCOLO:

A dengue é a arbovirose de maior importância em termos de incidência no mundo, e hoje se encontra em situação de hiperendemicidade no Brasil. Tal situação é fator de risco conhecido para o aumento da gravidade dos casos e das manifestações hemorrágicas. O surgimento da Febre hemorrágica da dengue (FHD) em uma localidade está associado à co-circulação dos vários sorotipos do vírus em uma comunidade. Nos últimos anos vêm ocorrendo no Estado de Alagoas surtos e epidemias de dengue, em número crescente, a cada ano. Só em 2012, 376 casos da doença já foram confirmados no Estado. No entanto, os genótipos virais circulantes nos municípios de Alagoas são desconhecidos até o momento. Análises moleculares sobre os vírus dengue circulantes numa dada região são importantes, na medida em que permitem o conhecimento do perfil epidemiológico para esta enfermidade em cada região, detectando sorotipos e genótipos mais frequentes, verificando precocemente a introdução de um novo sorotipo, e ainda, na tentativa de se encontrar fatores prognósticos, numa possível associação de genótipo e gravidade da doença. Desse modo, um estudo que vise definir os sorotipos e genótipos de dengue circulantes em Alagoas e que busque descrever o perfil clínico-epidemiológico da população afetada pela doença traria resultados inéditos na região e seria de grande relevância para a melhor compreensão da epidemiologia da dengue, não só em Alagoas, mas também no Brasil. Sendo assim o objetivo geral desta pesquisa é realizar a detecção molecular e genotipagem das infecções humanas por vírus dengue em Alagoas e o estudo clínico-epidemiológico dos casos. O presente estudo é do tipo analítico observacional transversal. O cálculo do N (tamanho da população) foi realizado a partir da média dos meses de 2011 dos atendimentos de pacientes no Pronto-atendimento de um Hospital Escola de Maceió, incluindo primeiro atendimento e retorno. Portanto, o número mínimo de participantes incluídos neste estudo, considerando-se uma margem de erro de 5% e índice de confiabilidade de 95%, será 345 pacientes. Considerando os critérios para Aquisição do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, será realizada uma busca ativa por casos de dengue em pacientes que apresentem diagnóstico clínico da doença, atendidos no referido Hospital. No caso dos procedimentos serão coletadas amostras de pacientes que apresentem doença febril aguda, atendidos em um Minipronto-socorro de Maceió, e já devidamente autorizado. No caso de pacientes que foram incluídos nos critérios de suspeita diagnóstica de dengue, após explicação sobre o trabalho e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo paciente, será realizada coleta de amostras sanguíneas em tubo sem anticoagulante e uma entrevista, utilizando um questionário anexo, onde constam perguntas sobre sintomas da doença, antecedentes morbidos e profissionais, local de habitação. O pesquisador explicará aos pacientes todas as informações necessárias quanto à realização do estudo em todas as suas etapas. O paciente ficará ciente de que a sua participação será de acordo com sua vontade, podendo desistir a qualquer momento. Neste estudo, serão incluídos pacientes de ambos os sexos, sem exclusão por faixa etária, que apresentarem quadro clínico compatível com dengue, e que concordarem em participar do estudo assinando o TCLE. No caso dos pacientes menores de idade, a autorização através do TCLE ocorrerá através da assinatura do seu responsável. Como critério de exclusão está a não assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o que é de fundamental importância para o desenvolvimento do projeto. Razão para usar grupos vulneráveis: Serão incluídos no presente projeto indivíduos menores de 18 anos, pois se pretende entender como a dengue age em todas as faixas etárias, e isso poderá levar a um maior entendimento da doença no estado. Além do mais, o estudo trará benefício ao paciente (seja maior ou menor de idade) uma vez que fornecerá o diagnóstico laboratorial etiológico (de dengue), dado extremamente útil ao clínico que acompanha o paciente. Não acarretará em prejuízo de qualquer natureza para esses indivíduos ou seus

responsáveis (pais). O estudo utilizará amostras de sangue coletadas para o exame diagnóstico. A coleta é um procedimento minimamente invasivo que será realizada por indivíduos treinados, que utilizarão todos os equipamentos de proteção individuais possíveis e materiais de coleta adequados. O projeto não acarretará em prejuízo de qualquer natureza para esses indivíduos ou seus responsáveis (pais), pelo contrário, oferecerá um benefício, uma vez que ele se propõe a fazer um diagnóstico laboratorial molecular que não está disponível em nenhum serviço público de saúde em Alagoas. A participação no projeto não modificará de forma negativa nem prejudicial o atendimento rotineiro desses pacientes nas unidades de saúde participantes. Os critérios para suspender ou encerrar a pesquisa são: A não liberação de verba para a compra dos reagentes por agência financiadora e a ocorrência de dificuldades técnicas que forem consideradas insuperáveis, na etapa de padronização das reações.

III) TCLE (linguagem adequada, descrição dos procedimentos, identificação dos riscos e desconfortos esperados, endereço do responsável, ressarcimento, sigilo, liberdade de recusar ou retirar o consentimento, entre outros):

Apresentado com identificação das diretrizes definidas na Resolução 196/96 CNS/MS.

IV) CONCLUSÃO DO PARECER

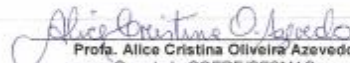
APROVADO

V) CONSIDERAÇÕES

Ilma. Profa. Dra. **Alessandra Abel Borges**, lembre-se que, segundo a res. CNS 196/96:

- Sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinado, a não ser em estudo com autorização de declínio;
- V.S.^a deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade por este CEP, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata;
- O CEP deve ser imediatamente informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É responsabilidade do pesquisador, assegurar medidas imediatas adequadas a evento adverso ocorrido e enviar notificação a este CEP;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas;
- Seus relatórios parciais e final devem ser apresentados a este CEP, inicialmente em 18/10/2012 e ao término do estudo. A falta de envio de, pelo menos, o relatório final da pesquisa implicará em não recebimento de um próximo protocolo de pesquisa de vossa autoria.

Atenciosamente,


 Profa. Alice Cristina Oliveira Azevedo
 Coord. do COEPE/CESMAC