

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Detecção e tipificação do vírus da dengue
por RT-PCR em tempo real**

Telma Regina Ramos Silva Poloni

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Deteção e tipificação do vírus da dengue
por RT-PCR em tempo real**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para Obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Telma Regina Ramos Silva Poloni

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Poloni, Telma Regina Ramos Silva

Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real.
Ribeirão Preto, 2009.

56p. : Il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Aquino, Victor Hugo

1. Dengue. 2. RT-PCR em tempo real. 3. Diagnóstico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Telma Regina Ramos Silva Poloni

Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. D. Victor Hugo Aquino Quintana

Aprovado em :

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Dedico este trabalho a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana por sua orientação neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo suporte financeiro.

Aos colegas e funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aos colegas de laboratório Alberto, Denise, Eric, Flávia, Helda, Harryson, Larissa, Natália, Rafael e Vanessa.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação Ana Lúcia Turatti, Carlos Armando Faustino, Henrique Theodoro, Rosana Florêncio e Rossana Minghelli Ribeiro.

A todos os meus amigos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“A ciência é uma profissão difícil.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Resumo histórico.....	1
1.2. A dengue no Brasil.....	2
1.3. Ciclo de transmissão da doença.....	4
1.4. Características gerais e ciclo de replicação do agente etiológico.....	6
1.5. Principais vetores.....	8
1.6. Quadro clínico.....	8
1.7. Patogenia das formas graves.....	9
1.8. Tratamento e profilaxia.....	10
1.9. Diagnóstico.....	11
1.9.1. Isolamento viral.....	11
1.9.2. Métodos sorológicos.....	12
1.9.2.1. Detecção de anticorpos antidengue.....	12
1.9.2.2. Detecção de antígenos virais.....	13
1.9.2.3. Métodos de biologia molecular.....	13
2. OBJETIVOS	17
2.1. Gerais.....	17
2.2. Específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Amostras clínicas.....	18
3.2. Vírus.....	18
3.3. Caracterização dos vírus.....	18
3.4. Purificação do RNA viral.....	20
3.5. Detecção de NS1 em amostras de soro.....	20
3.6. RT-PCR em tempo real gênero específica para dengue.....	20

3.7. Contabilidade de custos dos métodos de diagnóstico da dengue.....	21
3.8. RT-PCR utilizando <i>primers</i> sorotipo específicos para extremidade 5' do genoma viral	21
3.8.1. Desenho dos <i>primers</i>	21
3.8.2. RT-PCR convencional	23
3.8.3. RT-PCR em tempo real em única etapa.....	24
3.9. RT-PCR utilizando <i>primers</i> sorotipo específicos da região codificadora da NS5 do genoma viral	24
3.9.1. RT-PCR convencional	24
3.9.2. RT-PCR em tempo real em única etapa.....	25
3.10. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Comparação da sensibilidade da RT-PCR em tempo real gênero específica e do ELISA para detecção da proteína NS1	26
4.2. Contabilidade de custos	28
4.3. Padronização de uma RT-PCR em tempo real para detecção dos sorotipos virais utilizando <i>primers</i> para a extremidade 5' do genoma viral	28
4.3.1. Teste de funcionalidade dos <i>primers</i> desenhados para a extremidade 5' na RT-PCR convencional.....	28
4.3.2. Avaliação da especificidade dos <i>primers</i> para a extremidade 5'	29
4.3.3. Teste de funcionalidade dos <i>primers</i> desenhados para a extremidade 5' na RT-PCR em tempo real	30
4.3.4. Avaliação da especificidade de cada <i>primer</i> para a extremidade 5' na RT-PCR em tempo real.....	33
4.3.5. RT-PCR em tempo real sorotipo específica utilizando <i>primers</i> para a extremidade 5'	33
4.3.6. Sensibilidade da RT-PCR em tempo real sorotipo específica com <i>primers</i> para a extremidade 5'	36
4.4. Padronização de uma RT-PCR em tempo real sorotipo específica com <i>primers</i> para a região codificadora da proteína NS5.....	36
4.5. Comparação entre a RT-PCR em tempo real com <i>primers</i> para a extremidade 5' e a RT-PCR em tempo real com os <i>primers</i> para a região NS5	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES.....	45
7. BIBLIOGRAFIA	46

RESUMO

POLONI, T. R. R. S. **Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real.** 2009. 56f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A dengue é uma doença infecciosa de transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. O vírus da dengue (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, é atualmente um importante problema de saúde pública em todo o mundo. São reconhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, -2, -3 e -4). A doença causada por qualquer um dos sorotipos cursa de forma assintomática ou com quadro clínico que varia desde uma febre indiferenciada e autolimitada, passando pela febre clássica da dengue (FD) até quadros graves de febre hemorrágica da dengue (DHF). O diagnóstico clínico é difícil de ser realizado principalmente na fase aguda da doença em que os sintomas são muito similares aos de outras infecções febris agudas, ficando a cargo do laboratório o diagnóstico definitivo. Os métodos sorológicos para detecção de anticorpos IgM/IgG são os mais amplamente utilizados, mas inadequados para diagnóstico precoce uma vez que detectam anticorpos a partir do sexto dia do início dos sintomas. Os métodos moleculares estão sendo cada vez mais utilizados para o diagnóstico precoce por serem mais rápidos e sensíveis que a sorologia e o isolamento viral. Neste estudo comparamos a sensibilidade de uma RT-PCR em tempo real gênero específica com um ELISA para detecção da proteína NS1 comercialmente disponível analisando amostras de soro de pacientes com dengue. Também foram desenvolvidos dois protocolos de RT-PCR em tempo real para identificação do sorotipo viral, uma contendo *primers* para extremidade 5' do genoma viral e outra contendo *primers* para a região codificadora da proteína NS5. A RT-PCR em tempo real gênero específica mostrou-se mais sensível que o ELISA, principalmente nas amostras que apresentavam baixa carga viral. A RT-PCR em tempo real contendo os *primers* para a extremidade 5' apresentou uma sensibilidade baixa quando comparada com a RT-PCR genérica, porém foi mais sensível que aquela contendo os *primers* para a região codificadora da proteína NS5. Considerando os resultados obtidos, sugerimos uma estratégia de triagem dos casos suspeitos de dengue utilizando a RT-PCR genérica para posteriormente identificar o sorotipo viral com o protocolo que utiliza os *primers* da extremidade 5'. Embora este último protocolo tenha sido pouco sensível, a identificação do sorotipo infectante em algumas amostras é suficiente para definir qual o sorotipo circulante durante uma epidemia.

Palavras-chave: dengue, RT-PCR em tempo real, diagnóstico, sorotipo específico.

ABSTRACT

POLONI, T. R. R. S. **Detection and typing of dengue virus by real time RT-PCR assays.** 2009. 56f. Dissertation (master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Dengue is an infectious disease transmitted by the biting of mosquitoes of *Aedes* genus. Dengue virus (DENV), belonging to the *Flavivirus* genus, *Flaviviridae* family, is an important public health problem worldwide. Four antigenically distinct viruses are recognized (DENV-1, -2, -3, e -4). Infection with any of the virus serotypes causes a spectrum of the illness ranging from inapparent or mild viral syndrome to classic dengue fever (DF) and severe hemorrhagic disease (DHF). The clinical diagnosis is difficult especially in the acute phase of the disease when the symptoms are very similar to other febrile illness, corresponding to the laboratory the definitive diagnosis. Serological methods detecting antibodies IgM/IgG are the more widely used; however, they are inappropriate for early diagnosis since these methods detect antibodies after six days of the onset of symptoms. The molecular methods are more frequently used for the early diagnosis because they are faster and more sensitive than serological methods and virus isolation. In this study, we have compared the sensitivity of a generic real time RT-PCR with a commercial ELISA for the NS1 protein analyzing serum samples from patients with dengue virus infection. We have also developed two protocols of real time RT-PCR to identify dengue serotype, one of them containing primers to the 5' end and the other, primers to the NS5 coding region. The generic real time RT-PCR showed to be more sensitive than the ELISA, principally, between the samples with low viral load. The real time RT-PCR containing primers to the 5' end showed a lower sensitivity than the generic real time RT-PCR; however, it was more sensitive than that containing primers to the NS5 coding region. Considering these results, we suggest the use of the generic real time RT-PCR to screen the dengue suspected cases and then to identify the serotype using the protocol that include the primers to the 5' end. Although the last protocol has shown a low sensitive, the identification of the infecting serotype in some of the samples is enough to define which serotype is circulating during the epidemic period.

Keywords: dengue, real time RT-PCR, diagnosis, specific serotype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Etapas para infecção e transmissão do vírus da dengue pelo mosquito	5
Figura 2. Eletromicrografia de partículas dengue	7
Figura 3. Representação esquemática do ciclo de replicação viral	8
Figura 4. Principais vetores envolvidos na transmissão da dengue	8
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,8% de Dengue e outros flavivírus	20
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos <i>primers</i> sorotipo-específicos	29
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para verificar reações cruzadas	29
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose para verificar reações cruzadas (2)	30
Figura 9. Detecção de DENV-1 por RT-PCR em tempo real	31
Figura 10. Detecção do DENV-2 por RT-PCR em tempo real	31
Figura 11. Detecção do DENV-3 por RT-PCR em tempo real	32
Figura 12. Detecção do DENV-4 por RT-PCR em tempo real	32
Figura 13. Fluxograma das combinações dos <i>primers</i> específicos	34
Figura 14. RT-PCR em tempo real com a combinação H de <i>primers</i>	35
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose dos DENV-1 a -4 com <i>primers</i> NS5 separados	37
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose dos DENV-1 a -4 com <i>primers</i> NS5 juntos	37
Figura 17. T_m para os DENV-1 a -4 com <i>primers</i> NS5, 0,6 μ M, 54°C	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> usados na reação de <i>nested</i> -RT-PCR para flavivírus.....	19
Tabela 2 - Cepas representativas dos quatro sorotipos de dengue.....	22
Tabela 3 - <i>Primers</i> complementares sorotipo específicos	23
Tabela 4 - Amostras testadas por RT-PCR em tempo real e ELISA NS1 e IgM	27
Tabela 5 - Sensibilidade, especificidade e valores preditivos para RT-PCR em tempo real e ELISA NS1 e IgM	28
Tabela 6 - Despesas para realização do RT-PCR em tempo real e do ELISA	28
Tabela 7 - T_m dos produtos de amplificação da RT-PCR em tempo real utilizando os <i>primers</i> da extremidade 5'	33
Tabela 8 - T_m dos produtos de amplificação da RT-PCR em tempo real com diferentes concentrações de <i>primers</i>	34
Tabela 9 - T_m dos produtos de amplificação da RT-PCR em tempo real das combinações B, D, F e H com diferentes concentrações de <i>primers</i>	35
Tabela 10 - RT-PCR em tempo real sorotipo específica analisando diluições decimais seriadas do RNA dos quatro sorotipos virais.....	36
Tabela 11 - T_m e C_t das três concentrações de <i>primers</i> da NS5 testados.....	38
Tabela 12 - T_m obtidas para cada sorotipo viral com diferentes temperaturas de anelamento	38
Tabela 13 - Diluições decimais seriadas para testar a sensibilidade da multiplex <i>nested</i> -RT-PCR	39
Tabela 14 - Amostras testadas por RT-PCR em tempo real com <i>primers</i> da extremidade 5' e da região NS5	40

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por um vírus que recebe o mesmo nome (DENV). Trata-se de uma enfermidade de notificação compulsória (BRASIL, 2006), caracterizada por epidemias sazonais podendo apresentar, como ocorre atualmente no Brasil, comportamento endêmico com aumento da incidência nos períodos chuvosos do ano. A dengue é a única arbovirose humana (doença viral transmitida ao homem por vetores artrópodes) que pode ser causada por quatro vírus diferentes (HALSTEAD, 2007), pois qualquer um dos sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) é capaz de provocar infecção. Durante o século XIX, era considerada uma doença esporádica que causava epidemias com longos intervalos, refletindo a lentidão dos sistemas de transporte que limitava o deslocamento das pessoas naquele tempo. Hoje, a dengue figura como a mais importante arbovirose humana do mundo (GUBLER, 1995; DEEN et al., 2006). Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em mais de 100 países endêmicos e áreas onde há transmissão do vírus da dengue. Mais de 50 milhões de infecções ocorrem anualmente acarretando 500.000 casos de dengue hemorrágica e 22.000 mortes (WHO, 2008). A doença cursa de forma assintomática ou com quadro clínico que varia desde uma febre indiferenciada e autolimitada, passando pela febre clássica da dengue (FD) até quadros graves de febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD). Esta forma grave está intimamente relacionada à reinfeção e, por isto é de grande importância clínica e epidemiológica conhecer os sorotipos circulantes e evitar a co-circulação de mais de um sorotipo através de medidas de combate ao vetor, já que até o presente momento não há vacinas disponíveis. O desafio atual das autoridades sanitárias nacionais e internacionais é reverter a tendência de aumento das epidemias, bem como o aumento da incidência de dengue hemorrágica (WHO, 2008).

1.1. Resumo histórico

Os mais antigos relatos de uma doença possivelmente causada pelo vírus da dengue encontram-se em enciclopédias chinesas das dinastias Chin (265 a 420 D.C.), Tang (610 D.C) e Northern Sung (992 D.C.) (NOBUCHI, 1979). Este vírus também pode ter sido o causador de surtos de doença febril no século XVII na região das ilhas a oeste do oceano Pacífico e no Panamá, bem como das epidemias registradas em Jacarta, Indonésia e Egito no século XVIII, época em que a doença já apresentava uma distribuição global (CAREY, 1971; HOWE, 1977; MCSHERRY, 1982). Contudo, a primeira descrição detalhada da dengue em sua forma

epidêmica foi feita por Benjamim Rush em 1780 na Filadélfia, Estados Unidos da América (RUSH, 1780). Já no século XIX, inúmeras epidemias de dengue foram descritas em Zanzibar, Calcutá, Grécia e Japão (FIGUEIREDO, 2005). Na primeira metade do século XX, as alterações ambientais e o intenso deslocamento humano, somados ao acelerado crescimento populacional e urbanização descontrolada que ocorreu no pós-guerra, contribuíram para o aumento de epidemias da doença (GLUBER, 1998). A partir de 1954, a doença começou a exibir um novo padrão caracterizado por hemorragia grave e/ou choque provocando óbito em 40% dos enfermos: era a chamada febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue, descrita pela primeira vez por Hammon et al., em 1960, nas Filipinas. Após a década de 70, o problema das epidemias de dengue agravou-se, particularmente nos países tropicais de todos os continentes sendo que, atualmente, a dengue representa um sério problema de saúde pública em áreas tropicais da Ásia, África, América Latina e Caribe. A primeira grande epidemia de FHD nas Américas foi registrada no ano de 1981 em Cuba, com um total de 344.203 casos notificados, dos quais 10.312 foram classificados como FHD. Houve 116.143 hospitalizações, 158 óbitos e custos que excederam a cifra dos US\$ 103 milhões (MARTÍNEZ, 2006).

Entre os fatores que contribuíram para a emergência da FD/FHD destacam-se o rápido crescimento populacional e urbanização da América Latina e Caribe, o aumento do número de pessoas se deslocando geograficamente facilitando a disseminação da virose, a circulação dos quatro sorotipos nas Américas gerando um estado de hiperendemicidade que aumenta o risco de FHD e a pouca eficiência dos programas de controle do vetor (WHO, 1997).

Quanto à origem do nome dengue, Figueiredo (2005, p.345) escreveu

[...] segundo Vambéry, citado por Siler, em 1926, seria árabe arcaico, significa fraqueza (astenia). Nas línguas portuguesa e espanhola, que possuem influência moura, existe a palavra dengue significando efetação. Com ambos os sentidos, a palavra descreve sintomas da doença ou comportamento praticado em virtude dela. Uma outra origem para o nome é sugerida por Halstead, em que o nome teria surgido em Zanzibar, durante epidemia ocorrida em 1870, e estaria relacionado à frase nativa “Ki-denga Pepo”, que significa pancada ou golpe dado por um mau espírito, provocando ataque doloroso semelhante à cãibra.

1.2. A dengue no Brasil

Os primeiros surtos e epidemias de dengue datam de 1846 no Rio de Janeiro, 1896 em Curitiba, 1917 no Rio Grande do Sul e entre 1922 e 1923 no Rio de Janeiro e Niterói (Figueiredo, 2005). A campanha brasileira de erradicação do *Aedes aegypti* (também vetor da

dengue) no intuito de combater a febre amarela, que já vinha sendo empreendida por Emílio Ribas e Oswaldo Cruz desde 1903, ganhou impulso a partir da década de 1920 com o apoio da Fundação Rockefeller e da Organização Pan-Americana da Saúde, sendo tão bem sucedida que não houve relatos de outras epidemias até 1981. Com a expansão da dengue na América Central e Caribe somada à reinfestação do Brasil pelo mosquito, um surto veio a ocorrer em Boa Vista, Roraima, pelo DENV-1 e DENV-4 causando doença febril indiferenciada ou febre clássica da dengue em 11.000 indivíduos (OSANAI et al., 1983). Em 1986 o DENV-1 de genótipo do Caribe (RICO-HESSE, 1990; VORNDAM et al. 1994; MIAGOSTOVICH et al. 1998) atingiu Nova Iguaçu disseminando-se pela região metropolitana do Rio de Janeiro com cerca de 95.000 casos notificados de febre indiferenciada ou febre clássica da dengue (SCHATZMAYR et al., 1986; NOGUEIRA et al., 1988). A partir do Rio de Janeiro o DENV-1 se espalhou para outros estados transformando-se em um problema de saúde pública. As cidades de Niterói e Rio de Janeiro foram afetadas por um novo surto em 1990, desta vez relacionado ao DENV-2 do genótipo jamaicano (RICO-HESSE, 1990; VORNDAM et al., 1994; MIAGOSTOVICH et al., 1998), resultando em aumento das formas graves da doença com notificação de mais de 300 casos de dengue hemorrágica e número incerto de óbitos.

Na década de 80 a atividade da dengue no Brasil esteve associada aos DENV-1 e DENV-2, mas em 1998 o DENV-3 foi isolado no estado de São Paulo, de um indivíduo que havia viajado para a Nicarágua sugerindo que este sorotipo poderia ingressar em nosso país a qualquer momento (ROCCO et al., 2001). De fato, o primeiro caso autóctone de DENV-3 foi detectado em 2000 no Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 2001; MIAGOSTOVICH, 2002; DE SIMONE et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2005) e, de lá, disseminou-se por todo o país contribuindo para que em 2002 fossem notificados quase 800.000 casos de dengue clássica e 270 casos de dengue hemorrágica, os quais resultaram em 150 óbitos (FIGUEIREDO, 2005). Desde então, grandes epidemias têm sido verificadas por estes três sorotipos, causando infecções humanas de alta morbimortalidade.

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou, de janeiro a novembro de 2008, 787.726 casos suspeitos de dengue, 4.137 casos confirmados de febre hemorrágica da dengue (FHD) e a ocorrência de 223 óbitos por FHD (taxa de letalidade por FHD de 5,39%). A análise das taxas de incidência acumulada por região demonstra alta incidência nas regiões norte (497,3), nordeste (497,9), centro-oeste (474,8) e sudeste (458,0) e baixa incidência na região sul (65,3).

O DENV-3, apesar de ainda ser o mais frequentemente isolado no país (50,7% das amostras isoladas), vem sendo substituído pelo DENV-2 (45,7%). O DENV-2 está associado

ao relato de maior gravidade dos casos, sendo predominante nos estados do Rio de Janeiro (82,7%), Rio Grande do Norte (80%), Ceará (75%), São Paulo (41,7%); Bahia (40%) e Roraima (37%). O DENV-1 foi isolado em 3,6% das amostras. Até o presente momento, no sistema de monitoramento implantado pelo Ministério da Saúde, em conjunto com as Secretarias Estaduais e Municipais da Saúde, não foi isolado o DENV-4, assim como não há evidência epidemiológica de sua circulação no Brasil (BRASIL, 2009). Entretanto, Figueiredo et al. (2008) descreveram o isolamento do DENV-4 do soro de três pacientes na cidade de Manaus, Amazonas.

A região centro-oeste notificou 64.715 casos de dengue até novembro de 2008, sendo confirmados 247 casos de FHD, com 13 óbitos e 1.222 casos de dengue com complicação (DCC), com 21 óbitos. A região norte registrou 76.306 casos suspeitos de dengue. Dentre os 414 casos confirmados de FHD, 27 evoluíram para óbito e houve registro de 319 casos de DCC, com 3 óbitos. A região nordeste registrou 259.880 casos suspeitos de dengue, sendo confirmados 1.544 casos de FHD, com 76 óbitos e 2.139 casos de DCC, com 62 óbitos. A região sul notificou 18.056 casos de dengue, com transmissão autóctone somente no estado do Paraná; não houve casos de FHD confirmados na região, sendo o sorotipo DENV3 o único identificado no monitoramento viral. A região sudeste registrou 369.309 casos de dengue, sendo confirmados 1.932 casos de FHD, com 107 óbitos e 13.797 casos de DCC, com 139 óbitos. Comparando com o mesmo período de 2007, houve redução do número de casos no estado de São Paulo e aumento no Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais (BRASIL, 2009).

No estado de São Paulo foram notificados 6.948 casos confirmados por critério clínico-laboratorial (incidência de 16,7 casos por 100.000 habitantes), sendo 1.181 (17,07%) no município de Araraquara, 1.008 (14,5%) em Ribeirão Preto e 571 (8,2%) em Moji-Guaçu. Um total de 14 casos de FHD foram confirmados, todos com evolução para cura e 9 casos de DCC, com 2 óbitos. Os sorotipos circulantes são o DENV-2 e o DENV-3, detectados, respectivamente, em 41,7% e 58,3% das amostras positivas no isolamento viral (BRASIL, 2009).

1.3. Ciclo de transmissão da doença

O cientista australiano Thomas Lane Bancroft descobriu, em 1905, que a doença era transmitida pelo mesmo vetor da febre amarela, o mosquito *Aedes aegypti*, na época conhecido como *Stegomyia fasciata* (DOHERTY, 1993). Ao longo de suas adaptações, de

ciclo ancestral no Sudeste Asiático envolvendo provavelmente primatas e mosquitos da mata, o vírus da dengue evoluiu para um ciclo urbano no qual o homem virêmico infecta o vetor que transmitirá o vírus a outros seres humanos (FIGUEIREDO, 2006). Transmissão sem envolvimento de vetor foi descrita por Chen e Wilson (2005), principalmente em indivíduos de equipes de saúde que se acidentaram com materiais perfurocortantes contaminados com sangue de pacientes doentes. Os mesmos autores também relatam casos de transmissão em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. A transmissão vertical do vírus da dengue em humanos foi relatada por vários grupos de estudo, principalmente na Ásia (THAITHUMYANON et al., 1994; BOUSSEMART et al. 2001). DHF adquirida por transfusão de sangue foi demonstrada por Tambyah et al. (2008) em Singapura.

A necessidade da fêmea do mosquito sugar sangue humano para sua alimentação e maturação de seus ovos provê o mecanismo para a transmissão do vírus da dengue. Quando o mosquito ingere sangue de um hospedeiro virêmico ocorre infecção das células epiteliais do intestino médio (Figura 1). Carreado pela hemolinfa, o vírus infecta as glândulas salivares e, posteriormente, é secretado na saliva durante o repasto do inseto em outro hospedeiro vertebrado susceptível, fechando o ciclo de transmissão da doença. O intervalo de tempo entre a ingestão do sangue infectado e a secreção salivar do vírus é de 8 a 11 dias (período de incubação extrínseco) podendo ser diminuído por aumentos na temperatura ambiente. (RUFFINO-NETTO; PONTES, 1994).

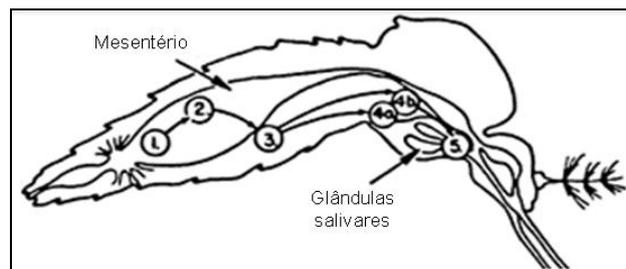


Figura 1. Desenho esquemático das etapas necessárias para infecção e transmissão do vírus da dengue pelo mosquito vetor. **1.** Sangue infectado ingerido, **2.** Multiplicação viral no epitélio mesentérico, **3.** Saída dos vírus do epitélio mesentérico, **4a e 4b.** Infecção das glândulas salivares, **5.** Liberação de vírus pelo epitélio das glândulas salivares que serão transmitidos a outro hospedeiro susceptível durante o repasto. (Modificado de Lindenbach et al., 2007, *In: Fields Virology*, 5ª ed.)

Após a picada do mosquito, as células dendríticas da pele (células de Langerhans) são as primeiras a serem infectadas e, algumas delas, podem migrar para linfonodos regionais de onde o vírus se dissemina através dos vasos linfáticos para o ducto torácico e daí para a circulação sanguínea (MAROVICH et al., 2001). É importante notar que a replicação viral inicial que ocorre nos tecidos (células musculares estriadas, lisas e fibroblastos), bem como

em linfonodos locais, serve como fonte de disseminação do vírus para a circulação onde estes podem circular livres no plasma ou no interior de monócitos/ macrófagos (viremia). Sabe-se que os vírus da dengue têm tropismo por essas células fagocitárias, as quais são os maiores sítios de replicação viral (FIGUEIREDO, 1999).

1.4. Características gerais e ciclo de replicação do agente etiológico

Desde 1906, Ashburn e Craig, oficiais das forças armadas dos EUA, já haviam mostrado que a dengue era causada por um agente etiológico filtrável (designação anteriormente dado aos vírus), descartando o envolvimento de protozoários e bactérias (ASHBURN; CRAIG, 1907). O vírus da dengue veio a ser isolado pela primeira vez em 1943 por Susumo Hotta durante epidemia ocorrida em Nagasaki, Japão, (KIMURA; HOTTA, 1944). O dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e sorogrupo DENV. A inclusão do DENV neste gênero é baseada na sua reatividade antigênica com outros flavivírus bem como na organização do genoma. Embora os vírus do sorogrupo DENV sejam, do ponto de vista epidemiológico, praticamente idênticos, são reconhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (SABIN, 1952; SWEET;SABIN, 1954; SABIN,1954; SCHERER, 1968). O vírus apresenta morfologia esférica com 40 a 60 nm de diâmetro, contendo um core de simetria icosaédrica elétron denso de 30 nm envolto por envelope lipídico (Figura 2). O genoma viral é constituído por RNA de fita simples com aproximadamente 11.000 pares de base e polaridade positiva. Este genoma codifica três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína pré-M/M associada à membrana e proteína E do envelope, além de sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. As extremidades 5' e 3' são compostas de regiões não codificadoras (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 450 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de amplificação genômica, tradução e empacotamento viral (BURKE; MONATH, 2001).

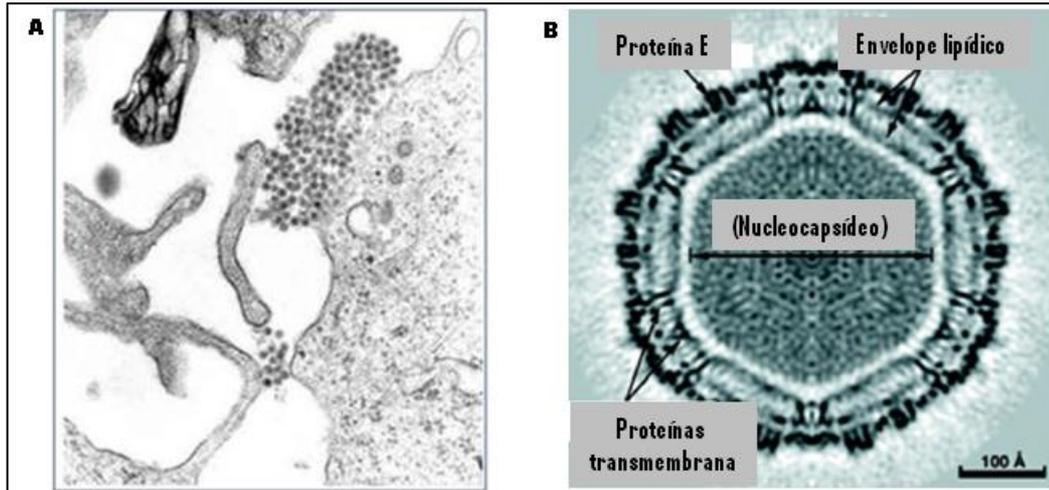


Figura 2. A: Eletromicrografia de partículas de DENV-2 replicando em cultura celular em aumento de 123.000 vezes (Retirado de <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/electron-micrograph.htm>, 2009). B: Detalhe de uma seção obtida por crioletromicrografia mostrando a arquitetura da partícula viral (Retirado de ZHANG, W. et al., 2003).

O ciclo de replicação inicia-se com a adsorção da partícula viral à célula-alvo através da ligação da proteína E ao receptor celular (Figura 3). Interações entre a proteína E e a molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) são essenciais para a infecção destas células e para internalização eficiente da partícula viral por endocitose mediada por clatrina (LOZACH et al., 2005). Uma vez que o vírus foi endocitado para o citoplasma celular, a queda de pH dentro do endossomo contendo a partícula viral provoca mudanças estruturais na proteína E que culminam na fusão do envelope viral com a membrana endossomal. Esta fusão libera o genoma no citoplasma para dar início à tradução de uma poliproteína que é direcionada para o retículo endoplasmático rugoso (RER). Uma combinação de proteases virais e do hospedeiro cliva a poliproteína dando origem às proteínas virais. As proteínas prM, E e NS1 são direcionadas para o lúmen do RER, em cuja membrana permanecem ancoradas, enquanto que a proteína C e as outras proteínas não estruturais são liberadas no citoplasma da célula. A proteína C reconhece o genoma viral replicado pela RNA polimerase/RNA dependente (NS5/NS3) formando uma ribonucleoproteína que se liga à porção citoplasmática das glicoproteínas ancoradas no RER. Posteriormente, a partícula viral é montada por brotamento para dentro do lúmen do RER adquirindo, neste momento, seu envelope. Esta partícula viral é então direcionada para complexo de Golgi, onde sofre um processo de maturação que consiste na clivagem da proteína “prM”, resultando na liberação da “pr” e formação da proteína M no envelope viral. O processo de maturação termina com a dimerização da glicoproteína E do envelope viral para finalmente a progênie viral ser liberada pela via exocítica (LINDENBACH; RICE, 2003).

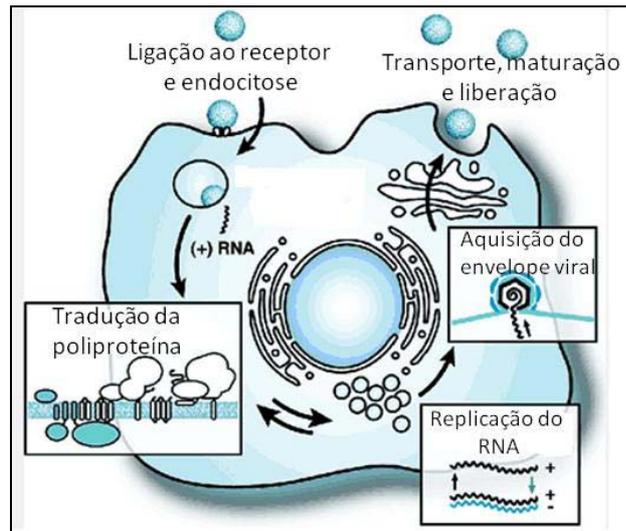


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de replicação viral. Após ligação a receptores celulares a partícula viral é endocitada. Com a liberação no genoma viral no citoplasma, iniciam-se os processos de replicação, montagem e maturação da nova progênie viral que será liberada da célula por exocitose. (Modificado de Lindenbach et al., 2007, *In*: Fields Virology, 5ª ed.).

1.5. Principais vetores

Os vetores do vírus da dengue são mosquitos domésticos, antropofílicos e com atividade hematofágica diurna (Figura 4). O *Aedes aegypti*, espécie hematófaga originária da África que chegou ao continente americano na época da colonização, é o principal vetor. Outras espécies como *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes africanus* são também implicados na transmissão.

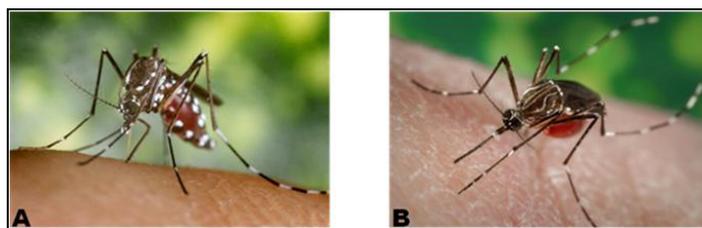


Figura 4. Principais vetores (A- *Aedes albopictus*, B- *Aedes aegypti*) envolvidos na transmissão do vírus da dengue durante o repasto sanguíneo. (Retirado de <http://www.phil.cdc.gov/phil/home.asp>, fotos de número 2164 e 9534 respectivamente).

1.6. Quadro clínico

Na forma clássica da doença os sintomas se instalam de modo abrupto 2 a 8 dias após a picada (período de incubação intrínseco), quando surgem febre alta que dura de 2 a 7 dias, calafrios, cefaléia intensa, dor retro-orbitária e astenia importante de onde deriva o nome dengue (RIGAU-PÉREZ, 1998), além de dor musculoesquelética e abdominal intensas, fato

que levou a doença a ser inicialmente conhecida como “febre quebra-ossos”. Anorexia, náuseas e vômitos também são frequentes. Exantema generalizado, de caráter transitório costuma aparecer no primeiro ou segundo dia de evolução. A contagem total de leucócitos está diminuída, pode ocorrer trombocitopenia e fenômenos hemorrágicos leves. A dengue clássica é usualmente autolimitada, porém a convalescença é prolongada com persistência das queixas de fadiga e prostração. No momento de defervescência, alguns pacientes desenvolvem a FHD/SCD cuja principal característica é a permeabilidade capilar aumentada com conseqüente extravasamento de plasma para o interstício. Este extravasamento pode resultar numa diminuição do volume plasmático que compromete o sistema circulatório levando ao choque hipovolêmico e morte. Pacientes com FHD/SCD não apresentam sangramentos de grande monta devido a distúrbios de coagulação. Quando este tipo de hemorragia ocorre, ela está associada com o choque profundo, pois a combinação de trombocitopenia, hipóxia e acidose leva à falência múltipla de órgãos e à coagulação intravascular disseminada (WILLS et al., 2002).

1.7. Patogenia das formas graves

Quando um indivíduo se infecta não é possível saber se ele desenvolverá formas mais leves ou evoluirá para FHD/SCD, pois a patogênese da doença grave ainda não está totalmente esclarecida. Tem sido observado que o risco de FHD é cerca de quinze vezes maior na infecção secundária que na primária. As altas taxas de infestação pelo *Aedes aegypti*, a cocirculação de mais de um sorotipo do vírus, as altas densidades populacionais e o intenso deslocamento geográfico das pessoas também estão relacionados à ocorrência de casos graves. Entre os fatores do hospedeiro podemos citar a idade, susceptibilidade genética, infecção prévia e imunidade heteróloga. A infecção pelo DENV produz imunidade duradoura sorotipo específica, mas nunca imunidade cruzada. Halstead et al. (1970), propuseram a teoria de que indivíduos que sofrem infecção secundária por sorotipo diferente do envolvido na primo-infecção, têm uma exacerbação da infecção imunologicamente mediada (*antibody-dependent enhancement* ou ADE), e desenvolvem uma resposta paradoxal que leva a quadros mais graves da doença. Durante a infecção secundária, anticorpos não neutralizantes pré-existentes opsonizam o vírus e aumentam sua entrada e replicação nos macrófagos. Acredita-se que as manifestações da FHD sejam devidas à exacerbada replicação viral, a qual induz monócitos/macrófagos infectados a liberarem mediadores vasoativos envolvidos no aumento da permeabilidade capilar (HALSTEAD, 1989). Embora a teoria do ADE não explique

completamente a patogênese da FHD, mostra que a resposta imune tem um papel central. Alguns autores têm sugerido que a doença pode ser causada por ativação de células T, uma vez que os níveis de citocinas como TNF- α , assim como a magnitude da resposta de células T, têm sido correlacionados com a gravidade da doença (MONGKOLSAPAYA et al., 2003). Diferenças de virulência entre os genótipos virais também são implicadas na patogênese da doença grave. Estudo conduzido por Cologna et al. (2005) com o sorotipo 2 do vírus da dengue aponta para evidências de que os vírus pertencentes ao genótipo do Sudeste Asiático são responsáveis pelas formas mais graves da doença, enquanto aqueles pertencentes ao genótipo Americano respondem por formas leves como a FD.

1.8. Tratamento e profilaxia

Atualmente não existe droga antiviral disponível para uso clínico com ação efetiva contra o vírus da dengue. Nos casos de febre indiferenciada e FD procede-se ao tratamento sintomático da febre, cefaléia, mialgias e artralgias, bem como se cuida da reposição hidroeletrólítica por via oral (na ausência de vômitos frequentes). Embora não exista um tratamento antiviral específico, nos casos suspeitos de FD e FHD sem choque, (aumento agudo da permeabilidade vascular com extravasamento de líquidos para o interstício) a precocidade na reposição hídrica e de eletrólitos por via oral ou intravenosa tem um papel crucial na redução da mortalidade (MARTINEZ, 2006). Nos pacientes com SCD (letargia, extremidades frias, cianose perioral, pulso fino e rápido, hipotensão) a hemocentração mantém-se apesar da reidratação. Trata-se de uma emergência médica que requer observação contínua e imediata expansão plasmática até que as condições hemodinâmicas se normalizem. A evolução para a cura depende da disponibilidade dos cuidados intensivos e do tratamento precoce das alterações hemodinâmicas (FIGUEIREDO, 2005)

Até o momento, a prevenção e o controle da dengue dependem do combate ao *Aedes aegypti* nos grandes centros urbanos dos trópicos. Infelizmente, os métodos atuais de controle dos mosquitos adultos são ineficazes contra esta espécie (GUBLER, 2004). Ênfase tem sido dada ao controle das larvas, mas com a rápida expansão das áreas urbanas esta tarefa torna-se impossível sem a colaboração efetiva da população que vive nestas cidades, em ações integradas de controle (GUBLER, 1989). Trabalhos recentes mostram que a prevenção por meio da vacinação seria a abordagem de melhor custo-benefício para prevenir a dengue hemorrágica (SHEPARD et al., 2004). Infelizmente uma vacina contra dengue ainda não está disponível para uso. Infecções prévias aumentam as chances de desenvolvimento de doença

grave e por isso uma vacina efetiva e segura deve ser tetravalente protegendo contra os quatro sorotipos simultaneamente. Este fato, somado à escassez de recursos para pesquisa, torna difícil e lento o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue. Recentemente, várias vacinas potenciais têm sido desenvolvidas, mas ainda é precipitado dizer que tais esforços resultarão em uma vacina segura, efetiva e economicamente viável para ser futuramente usada na prevenção da dengue (HALSTEAD, 2002).

1.9. Diagnóstico

Clinicamente, o diagnóstico da dengue é difícil de ser realizado, pois os sintomas são muito similares aos de outras infecções febris agudas como malária, tifo, leptospirose, sarampo, rubéola, gripe e várias arboviroses, todas incluídas no diagnóstico diferencial com a dengue. O diagnóstico definitivo da infecção pelo DENV somente pode ser realizado laboratorialmente. Os métodos de isolamento viral permanecem como padrão ouro para diagnóstico definitivo, todavia os testes sorológicos para detecção de anticorpos dos tipos IgM e/ou IgG são os mais amplamente utilizados. Além destes, vem sendo observado um aumento de laboratórios que utilizam técnicas de biologia molecular para detecção do RNA viral.

1.9.1. Isolamento viral

O principal método utilizado para o isolamento viral é a inoculação da amostra suspeita em mosquitos, em cultura de células ou em camundongos recém-nascidos. Como a viremia coincide com o período febril, o índice de isolamento é significativamente maior naquelas amostras coletadas até o sexto dia de instalação da doença (KAO et al., 2005). O vírus da dengue normalmente não apresenta bom crescimento *in vitro* e, até o momento, um dos mais sensíveis métodos de isolamento é *in vivo* através da inoculação em mosquitos. Quatro espécies nas quais machos e fêmeas são igualmente susceptíveis têm sido usadas para isolamento viral: *Aedes Aegypti*, *Aedes Albopictus*, *Toxorhynchites amboinensis* e *Toxorhynchites splendens*. Para diminuir o risco de infecção laboratorial, podem ser usados mosquitos *Aedes* machos ou mosquitos não hematofágicos como o *Toxorhynchites*. Após dez dias de incubação, a presença do vírus é avaliada nas glândulas salivares dos mosquitos através de imunofluorescência direta. O isolamento viral por inoculação em mosquitos tem como desvantagens, além do risco de infecção laboratorial, o fato de ser uma técnica excessivamente laboriosa e de necessitar da criação e manutenção de um insetário para

produção de um grande número de mosquitos, o que não está disponível na maioria dos laboratórios de virologia (SAMUEL; TYAGI, 2006). Em relação à inoculação em culturas de células, método mais utilizado para isolamento viral, são comumente empregadas células tais como C6/36 (*Aedes albopictus*), AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*) e RA-284 (*Toxorhynchites amboinensis*) derivadas de mosquitos, além de células de rim de macaco verde africano (VERO). Após período de incubação de uma semana, o vírus pode ser detectado por métodos sorológicos (imunofluorescência) ou moleculares. A inoculação em cultura celular é um método de alta especificidade, porém não é usado rotineiramente porque demanda longo período de tempo (usualmente mais que sete dias) para se completar o teste. Finalmente, o isolamento viral por inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos é mais sensível que a cultura celular, entretanto, este é um método laborioso, caro e de difícil implementação na rotina.

1.9.2. Métodos sorológicos

1.9.2.1. Detecção de anticorpos antidengue

Os métodos sorológicos que detectam anticorpos antidengue são os mais usados para diagnóstico da doença. Os cinco principais métodos sorológicos para detecção de anticorpos antidengue são inibição da hemaglutinação (IH), de fixação do complemento (FC), neutralização e ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). A IH, foi o método padrão durante muitos anos devido sua alta sensibilidade, fácil execução e boa reprodutibilidade. Detecta anticorpos após vários anos de infecção sendo ferramenta útil em inquéritos epidemiológicos e na diferenciação das infecções primárias e secundárias com base nos títulos de IH. As principais desvantagens que limitam o uso da reação de IH são a necessidade de pré-tratamento das amostras para remover inibidores inespecíficos da IH e aglutininas não específicas, a pouca especificidade devido a reações cruzadas, a necessidade de amostras pareadas (aguda e convalescente) e a incapacidade de identificar o sorotipo viral envolvido (KAO et al., 2005). O teste de FC é baseado no princípio de que o complemento será consumido pela reação antígeno-anticorpo. Os anticorpos detectados são específicos na infecção primária contribuindo para determinação do sorotipo, porém aparecem tardiamente e permanecem por curtos períodos limitando o uso deste teste para inquéritos epidemiológicos. A neutralização é o mais sensível e específico método sorológico para detecção de anticorpos antidengue, podendo ser usada para identificar infecção primária durante a fase de

convalescência, mas não é viável em infecções secundárias e terciárias. As desvantagens do método são o alto custo, o longo tempo necessário para a realização e a complexidade técnica. O ELISA é considerado, nos dias atuais, o mais útil teste de detecção de anticorpos antidengue devido sua alta sensibilidade e facilidade técnica. ELISA clássico e ELISA de captura de anticorpos são os dois formatos mais comumente utilizados. Os anticorpos podem ser detectados tanto na fase aguda, a partir do quinto dia do início dos sintomas (anticorpos da classe IgM), quanto na fase de convalescência (anticorpos da classe IgG). Os títulos de IgM são significativamente mais altos na infecção primária do que nas infecções secundária e terciária, quando sua produção é muito baixa e transitória; deste modo o índice dado pela razão entre as leituras ópticas dos títulos de IgM/IgG pode ser usado para diferenciação entre infecção primária e secundária (SHU et al., 2003). A especificidade na detecção de IgM pode ser prejudicada pela presença de fator reumatoide no soro do paciente (JELINEK et al., 2000). Este método torna-se inviável para a proposta de diagnóstico precoce uma vez que detecta anticorpos a partir do quinto dia de instalação dos sintomas.

1.9.2.2. Detecção de antígenos virais

A presença de antígenos do vírus da dengue em soro ou células mononucleares periféricas de pacientes pode ser determinada por ELISA. Em células mononucleares esta técnica geralmente mostra maior índice de detecção em relação às amostras de soro (KITIGUL et al., 1997). Biopsias de tecidos ou autopsias podem ser analisadas através da técnica de imunohistoquímica para confirmar a presença do vírus (JESSIE et al., 2004; MIAGOSTOVICH et al., 1997). Em amostras de soro, durante a fase aguda da doença, pode ser detectado o antígeno chamado NS1. Trata-se de uma das glicoproteínas não estruturais do vírus altamente conservada e que, durante a fase aguda da infecção, passa a ser expressa na superfície das células infectadas bem como é secretada para a circulação sanguínea podendo ser detectada. Recentemente, altos níveis de NS1 foram demonstrados por ELISA em pacientes na fase aguda da doença (ALCON et al., 2002; LIBRATY et al., 2002).

1.9.2.3. Métodos de biologia molecular

As técnicas moleculares, cujo objetivo é a detecção do genoma viral, têm importante papel no diagnóstico da dengue uma vez que são capazes de identificar o vírus na fase aguda da doença e, em algumas metodologias, quantificar a carga viral. Entre os métodos mais

utilizados podemos citar a hibridação e a transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional e em tempo real. A hibridação de ácidos nucleicos é aplicável tanto para amostras clínicas quanto para tecidos fixados provenientes de biopsias ou autopsias. Devido sua complexidade técnica, a hibridação é de difícil aplicação na rotina sendo mais utilizada como ferramenta de pesquisa (GUBLER, 1998). A RT-PCR convencional é um método que possibilita a amplificação de sequências genômicas específicas de RNA delimitadas por iniciadores (*primers*). Uma alíquota deste produto de amplificação deve ser submetida à eletroforese em gel de agarose para posterior coloração com brometo de etídeo e então visualizado sob iluminação ultravioleta para confirmação da detecção do genoma viral. Vários protocolos de RT-PCR foram desenvolvidos para diagnóstico da dengue (LANCIOTTI et al., 1992; GUZMAN; KOURI, 1996; BARKHAM et al., 2006). Este método apresenta alta sensibilidade e especificidade, mas as múltiplas etapas necessárias para sua realização fazem com que, além de excessivamente laborioso, ele seja passível de contaminação com o próprio produto de amplificação gerando resultados falsos positivos. A aplicação de técnicas de fluorescência à RT-PCR, juntamente com instrumentação adequada, capaz de combinar amplificação, detecção e quantificação levou ao desenvolvimento de uma variação deste método denominado RT-PCR em tempo real. A RT-PCR em tempo real, assim como a convencional, possibilita a amplificação de fragmentos genômicos, contudo a detecção dos produtos é feita diretamente na plataforma de instrumentação, utilizando marcadores fluorescentes e métodos sensíveis de mensuração da fluorescência emitida. O método não requer manipulação após a amplificação, sendo por isso chamado de sistema fechado ou homogêneo. As principais vantagens deste sistema homogêneo são: redução do tempo necessário para a realização do teste e baixo risco de contaminação com o produto amplificado, além disso, este método permite a quantificação da carga viral por comparação com uma curva padrão (NIESTERS, 2002). Durante a fase exponencial de amplificação é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência, no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado *threshold* ou limiar e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado por cada amostra é significativamente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este limiar pré-estabelecido é chamado de *cycle threshold* (C_t), o qual é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação. A fluorescência emitida é captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador onde o *software* faz a análise final dos dados. A RT-PCR em tempo real

apresenta sensibilidade maior que o isolamento e a RT-PCR convencional e equivalente à *nested* RT-PCR convencional (POERSCH et al., 2005; MACKAY et al., 2002). Várias estratégias de marcação vêm sendo utilizadas para detecção do fragmento amplificado, algumas usam substâncias fluorescentes que se ligam ao DNA dupla fita como SYBR green, e outros usam sondas marcadas. As estratégias que utilizam sondas marcadas são altamente sensíveis e específicas. As três metodologias mais utilizadas são ensaio fluorogênico da atividade 5' nuclease (TaqMan®), sonda de hibridação *molecular beacons* (oligonucleotídeos que formam uma estrutura secundária entre as extremidades 5' e 3') e sonda de hibridação FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) (UHL; COCKERILL, 2004). Estas sondas são desenhadas com base na sequência do fragmento alvo a ser amplificado e contêm um corante fluorescente ligado ao seu terminal 5' (*reporter*) e um inibidor da fluorescência (*quencher*) ligado ao seu terminal 3'. Durante o processo de amplificação a sonda hibrida numa região específica do produto amplificado; após a hibridação o *reporter* e o *quencher* são separados ocorrendo assim a emissão de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade do DNA alvo presente na amostra. Trabalhos usando TaqMan® descrevem sua capacidade de detectar e quantificar a carga viral por RT-PCR numa única etapa (WANG et al., 2002; CHAO et al., 2006). Porém, a grande desvantagem das estratégias que utilizam sondas marcadas é o seu elevado custo. As estratégias que utilizam fluoróforos como o SYBR Green são baseadas na ligação deste corante com o DNA de dupla fita amplificado na reação, o que garante sua sensibilidade, mas com uma especificidade inferior ao daqueles que usam sondas marcadas. A especificidade do produto amplificado é determinada pela análise da curva de dissociação, a qual permite calcular a temperatura de desnaturação (temperatura de *melting* - T_m) do produto amplificado que depende do tamanho e da sequência da mesma. Nosso grupo de pesquisa descreveu recentemente uma RT-PCR, com base no SYBR Green, simples e altamente sensível para detecção gênero específica do vírus da dengue (DOS SANTOS et al., 2008). Considerando que existem quatro sorotipos do vírus da dengue, é de suma importância, principalmente do ponto de vista epidemiológico, a tipificação do vírus circulante. Chutinimitkul et al. (2005), desenvolveram um método de RT-PCR em tempo real, baseado no SYBR Green, capaz de detectar o sorotipo viral, porém tal método é realizado em duas etapas, síntese de cDNA seguida de PCR em tempo real o que torna mais laborioso seu uso na rotina. O problema de se realizar duas etapas foi eliminado na RT-PCR em uma única etapa realizada por Chien et al. (2006) e Shu et al. (2003). Entretanto, apesar de realizarem o ensaio em uma única etapa, detectam em um tubo de reação apenas o sorogrupo dengue, enquanto que outros quatro tubos devem ser utilizados para determinar os sorotipos. Este problema foi

minimizado por Yong et al. (2007) que desenvolveram uma RT-PCR em tempo real com SYBR Green com *primers* para os quatro sorotipos em uma única etapa em um único tubo de reação.

A vantagem do uso do SYBR Green em lugar da sonda marcada é o menor custo. Num estudo conduzido por Lai et al., (2007) demonstrou-se que o uso do SYBR Green reduziu os custos com o diagnóstico em cerca da metade quando comparado com outros métodos que usam sondas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

1. Comparar a sensibilidade e especificidade da RT-PCR em tempo real gênero específica com um método de detecção de antígeno do vírus da dengue.
2. Desenvolver uma técnica de RT-PCR em tempo real para diagnóstico sorotipo específico do vírus da dengue.

2.2. Específicos

1. Comparar a sensibilidade e especificidade da RT-PCR em tempo real gênero específica com um ELISA para detecção de NS1 analisando amostras de soro positivas para dengue.
2. Padronizar uma RT-PCR em tempo real em uma única etapa utilizando *primers* específicos para cada um dos sorotipos virais.
3. Avaliar a sensibilidade RT-PCR em tempo real sorotipo específica, analisando amostras de soro positivas para dengue.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras clínicas

As amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue coletadas até o quinto dia de instalação dos sintomas da doença foram selecionadas entre aquelas utilizadas por Dos Santos et al. (2008) e que se encontram estocadas a -70°C no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP ($n=110$). Com base nos testes de ELISA de captura para IgM/IgG, isolamento viral, RT-PCR convencional, RT-PCR em tempo real e detecção de NS1, 104 pacientes foram classificados como infectados por dengue e 6 não infectados por dengue. Este projeto de pesquisa obteve aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (CONEP- parecer nº 929/2007) e do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Processo nº 4921/2007).

3.2. Vírus

As cepas virais de dengue utilizadas neste estudo foram: DENV-1 cepa Mochizuki com título de 1×10^6 PFU/ml, DENV-2 cepa NGC com título de $2,34 \times 10^6$ PFU/ml, DENV-3 cepa H87 com título de 1×10^7 PFU/ml e DENV-4 cepa BV com título de $3,5 \times 10^6$ PFU/ml. Também foram utilizados os flavivírus Bussuquara (BSQV), Ilhéus (ILHV), Rocio (ROCV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e vírus vacinal da febre amarela (YFV 17-D). Todos estes vírus encontram-se estocados a -70°C em fluido de células C6/36 no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

3.3. Caracterização dos vírus

As sementes virais foram caracterizadas utilizando a *nested*-RT-PCR para flavivírus descrita por Bronzoni et al. (2005), com algumas modificações. A mistura de reação para a síntese de cDNA continha 10 μ l de RNA, 0,125mM de dNTP e 50ng de *random primers*. A mesma foi incubada a 95°C por um minuto e rapidamente resfriada em gelo para em seguida, adicionar-se 200U da transcriptase reversa M-MLV (USB™, EUA), 4 μ l do tampão 5X (20mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1M NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 0,01% Igepal CA-630 e 50% glicerol), 37,7U de

inibidor de RNase (Amersham Biosciences®, EUA) e água livre de DNase/RNase até um volume de 20µl. Foi então incubada a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 2 horas e a 85°C por 5 minutos. A mistura de reação da PCR contendo 2µl deste cDNA, 0,1mM de dNTP, 0,3µM do *primer* FG1, 0,3µM do *primer* FG2, 2,5U de DNA polimerase (Patinum® *Taq* DNA polymerase, Invitrogen), 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl) e 2mM de MgCl₂ num volume final de 50µl foi amplificada em termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, USA) como segue: 95°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos a 95°C por 20 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A mistura de reação da *nested*-PCR continha 0,5µl do produto da primeira etapa, 2mM de MgCl₂, 2,5U de DNA polimerase (Patinum® *Taq* DNA polymerase, Invitrogen), 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl), 0,05mM de dNTP, 0,3µM do *primer* FG1 e 0,3µM de cada *primer* sorotipo específico para flavivírus (Tabela 1) num volume final 50µl. A mistura foi submetida à temperatura inicial de 94°C por 2 minutos e em seguida a 25 ciclos a 94°C por 20 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos, no Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA). Com este produto foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,8% seguida de coloração com brometo de etídeo e análise sob luz ultravioleta (LUV) (Figura 5). A primeira etapa desta reação gerou produtos amplificados de 958pb característicos de flavivírus e a segunda etapa gerou produtos de 472pb, 316pb, 659pb e 222pb para os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente; e de 388pb, 230pb, 232pb e 253pb para BSQV, ROCV, SLEV e YFV, respectivamente.

Tabela 1. *Primers* usados na reação de *nested*-RT-PCR para flavivírus*.

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
Primeira etapa		
FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	958
FG2	GTGTCCCATCCTGTGTGTCATCAGCATACA	
Segunda etapa		
FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	
nDEN-1	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472
nDEN-2	GAACCAGTTTGTTRTTTCATAGCTGCC	316
nDEN-3	TTCCTCGTCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659
nDEN-4	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222
nILH	TCCACCGTGATCTGAGCCCCTGA	474
nBUS	AAGTGACACCTGTTCAAGGGTA	388
nROC	TCACTCTTCAGCCTTTCG	230
nSLE	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT	232
nYF	TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT	253

*(Bronzoni et al., 2005)

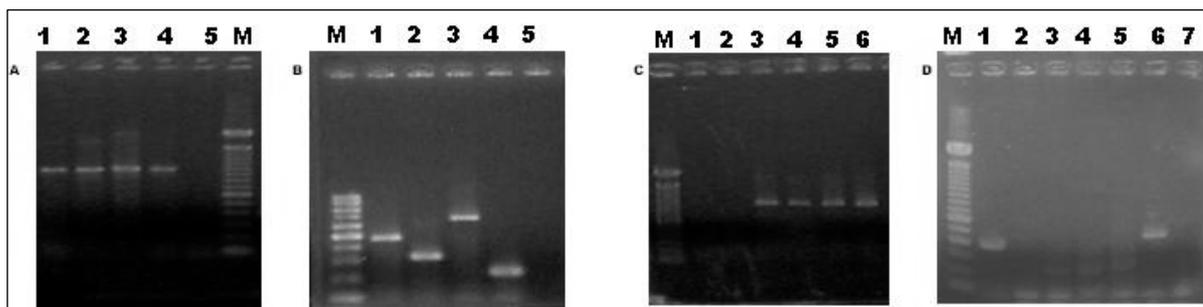


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,8% mostrando os produtos de amplificação da *nested*-RT-PCR para flavivírus. A: Primeira etapa da PCR utilizando os *primers* para o gênero *Flavivirus*, detectando-se um produto de 958pb para DENV-1 (1), DENV-2 (2), DENV-3 (3), DENV-4 (4). Controle negativo (5). B: Segunda etapa utilizando *primers* específicos para DENV-1 (1) de 472pb, DENV-2 (2) de 316pb, DENV-3 (3) de 659pb, DENV-4 (4) de 222pb. Controle negativo (5). C: Primeira etapa utilizando os *primers* para o gênero *Flavivirus*, detectando-se um produto de 958pb para BUSV (3), ROCV (4), SLEV (5) e YFV (6). Controle negativo (1), ILHV (2) não foi amplificado. D: Segunda etapa utilizando *primers* específicos para BUSV (1) de 388 pb, ILHV (2) de 474pb não foi amplificado, ROCV (3) de 230 pb, SLEV (4) de 232 pb e YFV (5) de 253 pb, DENV-1 como controle positivo (6). Controle negativo (7). M: marcador de peso molecular de 100 pb Invitrogen e Fermentas, EUA).

3.4. Purificação do RNA viral

O RNA viral foi purificado a partir de 140 μ l do sobrenadante da cultura de células C6/36 ou do soro de pacientes utilizando o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN®, Alemanha), conforme protocolo recomendado pelo fabricante, eluído com um volume de 80 μ l de água livre de DNase/RNase e armazenado a -70°C até o uso.

3.5. Detecção de NS1 em amostras de soro

Para detecção da proteína NS1 em amostras de soro (n= 92) foi utilizado o *kit* comercial para diagnóstico da dengue PLATELIA DENGUE NS1 AG (BIO-RAD, França), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. O valor de *cutoff* corresponde à média da densidade ótica (DO) da duplicata dos controles de *cutoff* do *kit*. Os resultados das amostras foram expressos como o quociente da razão entre a DO da amostra e a média da DO dos *cutoff*. A amostra foi considerada negativa se a razão foi menor que 0,5, duvidosa quando a razão foi $\geq 0,5$ e < 1 , e positiva quando a razão foi ≥ 1 . A tabela com o valor das densidades óticas encontra-se no Apêndice A.

3.6. RT-PCR em tempo real gênero específica para dengue

Esta RT-PCR foi utilizada para analisar retrospectivamente 92 amostras de soro seguindo especificações descritas por Dos Santos et al. (2008).

3.7. Contabilidade de custos dos métodos de diagnóstico da dengue

O custeio de um exame laboratorial corresponde ao acúmulo de custos em todas as fases de sua execução. Para apurar adequadamente o custo unitário de um exame laboratorial para diagnóstico da dengue seria necessário um levantamento complexo e detalhado dos processos envolvidos desde a fase pré-analítica até a liberação final do exame. Para isso leva-se em conta o valor dos insumos (mão de obra, materiais de consumo, equipamentos e outros) utilizados para produzi-lo em um determinado tempo e o número de exames realizados neste período. Considerando que quaisquer dos métodos utilizados incluem processos pré-analíticos similares, optamos por calcular a despesa média de cada exame obtida pelo quociente da razão entre o valor dos reagentes em reais e o número de análises realizadas.

3.8. RT-PCR utilizando *primers* sorotipo específicos para extremidade 5' do genoma viral

3.8.1. Desenho dos *primers*

Os *primers* para detecção específica dos sorotipos foram desenhados com base na extremidade 5' do genoma viral. Os primeiros nucleotídeos desta extremidade são altamente conservados entre os quatro sorotipos, por este motivo, optou-se por utilizar como *primer sense* o 5'UTR-S (5'-AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA-3') que reconhece os primeiros 23 nucleotídeos dos quatro sorotipos (AQUINO et al., 2006). Os *primers* complementares, específicos para cada sorotipo, foram desenhados com base na região localizada entre os nucleotídeos 303 e 791, a qual é variável entre os sorotipos. Para isto, foram comparadas sequências nucleotídicas correspondentes a vírus representativos dos quatro sorotipos (Tabela 2) depositadas na base de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/).

Tabela 2. Cepas representativas dos quatro sorotipos de dengue.

Vírus	Cepa	Número de acesso no <i>GenBank</i>
DENV-1	Argentina-ARG0048	AY277666
	Argentina-ARG0028	AY277665
	Argentina-297arg00	AF514889
	Paraguai-259par00	AF514883
	Paraguai-280par00	AF514878
	Tailândia-ThD1_0673_80	AY732474
	Tailândia-ThD1_0008_81	AY732483
	Japão-D1/hu/Yap/NIID27/2004	AB204803
	Brasil_BR/01-MR	AF513110
	Singapura-8114/93	AY762084
Singapura-S275/90	M87512	
DENV-2	C0390	AF100462
	16681	U87411
	Tailândia-ThD2_0038_74	DQ181806
	Tailândia-ThNH54/93	AF169682
	Colômbia- I348600	AY702040
	Colômbia- COL-789	EF090730
	Cuba- Cuba89/97	AY7020370
	Austrália- TSV01	AY037116
	China-China-43	AF204178
	China-China44	AF204177
	China-FJ11/99	AF359579
	China-FJ-10	AF276619
	China-China 04	AF119661
	China-ZS01/01	EF051521
	Venezuela-Ven2	AF100465
	Jamaica-Jamaica/N.1409	M20558
	Indonésia-TB16i	AY858036
	República Dominicana-DR59/01	AB122022
	Brasil-BEL63650	AY775307
	Brasil-GOI4191	AY775306
Brasil-BR64022	AF489932	
México-BC134-Merida-94	AY466449	
DENV-3	Tailândia-C0331/94	AY876494
	Tailândia-C0360/94	AY923865
	Indonésia-PI64	AY858046
	Indonésia-TB55i	AY858048
	Brasil- BR74886/02	AY679147
	China-80-2	AY317645
	Filipinas-H87	M93130
	Martinica- D3/H/IMTSSA- MART/1999/1243	AY099337
	Polinésia Francesa- PF92/4190	AY744686
	SriLanka- D3/H/IMTSSA-SRI/2000/1266	AY099336
DENV-4	Filipinas-H241	AY947539
	República Dominicana-814669	AF326573
	Tailândia- ThD4_0087_77	AY618991
	Singapura-Singapore8976/95	AY762085

Estas sequências nucleotídicas foram alinhadas utilizando o programa Clustal X (JEANMOUGIN et al, 1998) e posteriormente, o alinhamento foi usado para seleção dos *primers* sorotipo específicos com o programa SCPrimer (www.scprimer.cpmc.columbia.edu). Dois *primers* para DENV-4 e três para DENV-1, DENV-2 e DENV-3, sugeridos por este

programa (Tabela 3), foram analisados por RT-PCR convencional e tempo real para escolha de um *primer* complementar de cada sorotipo. *Primers* complementares sorotipo específicos, que reconhecem a extremidade 5', descritos por YONG et al., (2007) também foram utilizados neste trabalho.

Tabela 3. *Primers* complementares sorotipo específicos.

Vírus	Primer	Sequência	Posição genômica
DENV-1	cD1-325	5'-CGC TCC ATT CTT CTT GAA TGA GC-3'	303-325
DENV-1	cD1-465	5'-GGCTCTCCC CCT CG(GT) GT(AG) GTC A-3'	465-444
DENV-1	cD1-701	5'-C(CT)C GTC GGT G(CT)T C(AG)C C(AG)G TTT-3'	701-681
DENV-2	cD2-288	5'-CCC TGC TGT TGG (CT)GG GAT (AT)GT-3'	288-267
DENV-2	cD2-370	5'-GCA TCC TTC CAA TCT CTT TCC TGA A-3'	370-346
DENV-2	cD2-480	5'-(AG)AC GAT GAT GTG TGG TTC TCC (AG)TT (AG)CG T-3'	480-457
DENV-3	cD3-398	5'-CCG TTT GTT GAT AAT GCT CAG CA-3'	398-366
DENV-3	cD3-692	5'-GCT CTC C(AG)G CTT GAT TGC A(CT)G TT-3'	692-670
DENV-3	cD3-745	5'-GTC CCA TGC GCA CAT GGG GAG CTA A-3'	745-721
DENV-4	cD4-440	5'-CGC CAT TAC GGT GGG AAT CAA-3'	440-420
DENV-4	cD4-791	5'-CCA AGC CCC TTC CGA TGA CAT-3'	791-771
DENV-1	D1 ^a	5'-CCCCGTAACACTTTGATCGCTCCATT-3'	342-317
DENV-2	D2 ^a	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	251-231
DENV-3	D3 ^a	5'-GCACATGTTGATTCCAGAGGCTGTC-3'	538-514
DENV-4	D4 ^a	5'-GTTTCCAATCCCATTCCTGAATGTGGTGT	754-726

^a = fonte: YONG et al., 2007.

3.8.2. RT-PCR convencional

O cDNA foi preparado como mencionado no item 3.3. Na PCR foram usados o *primer* 5'UTR-S juntamente com os complementares correspondentes a cada sorotipo (Tabela 3). A mistura de reação da PCR contendo 2µl de cDNA, 0,1mM de dNTP, 0,3µM de 5'UTR-S, 0,3µM dos *primers* complementares específicos para cada sorotipo (separados ou juntos em um único tubo), 1,5U de DNA polimerase (Patinum® *Taq* DNA polymerase, Invitrogen), 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl) e 2mM de MgCl₂ em um volume final de 50µl, foi amplificada em termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, USA) como segue: 95°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos a 95°C por 20 segundos, 53 ou 60°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,8% seguida de coloração com brometo de etídeo e análise sob luz ultravioleta (LUV).

3.8.3. RT-PCR em tempo real em única etapa

Para a realização do teste foi utilizado o aparelho MiniOpticon™ System (BIO-RAD USA). A mistura de reação continha: 12,5µl 2X SYBR green, 0,5µl SuperScript™ III RT/Platinum® *Taq* Mix, 5µl de RNA, 0,3µM, 0,4µM ou 0,6µM do *primer* 5'UTR-S e de cada um dos *primers* complementares sorotipo específicos selecionados neste trabalho ou aqueles descritos por Yong et al., 2007 (Tabela 3) (separados ou juntos em um único tubo) e água destilada livre de DNase/RNase até volume final de 25µl. A amplificação foi realizada a 50°C por 1200 segundos (RT) seguida de uma incubação de 95°C por 300 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 30 segundos (PCR). Para determinar a especificidade do produto amplificado foi calculada a temperatura de *melting* (T_m) através da análise da curva de dissociação. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para confirmação do tamanho.

3.9. RT-PCR utilizando *primers* sorotipo específicos da região codificadora da NS5 do genoma viral

A *nested*-RT-PCR para flavivírus descrita por Bronzoni et al., (2005) foi modificada com o objetivo de ser utilizada na detecção dos sorotipos do vírus da dengue numa única etapa.

3.9.1. RT-PCR convencional

A síntese de cDNA foi realizada como descrito no item 3.3. A mistura de reação da PCR contendo 2µl de cDNA, 0,1mM de dNTP, 0,3µM do *primer* FG1, 0,3µM dos *primers* sorotipo específico para dengue (Tabela 1) (separados ou juntos em um único tubo), 2,5U de DNA polimerase (Patinum® *Taq* DNA polymerase, Invitrogen), 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl), e 2mM de MgCl₂ num volume final de 50µl, foi amplificada em termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, USA) como segue: 95°C por 2 min seguido de 45 ciclos a 95°C, 20 seg; 53°C, 45 seg; e 72°C, 2 min, com uma extensão final a 72°C por 5 min. Com este produto foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,8% seguida de coloração com brometo de etídeo e análise sob luz ultravioleta (LUV).

3.9.2. RT-PCR em tempo real em única etapa

A mistura de reação continha: 12,5µl 2X SYBR green, 0,5µl SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix, 5µl de RNA, 0,2µM, 0,4µM ou 0,6µM do *primer* FG1 e de cada um dos *primers* sorotipo específicos para dengue (Tabela 1) (separados ou juntos em um único tubo) e água destilada livre de DNase/RNase até volume final de 25µl. A amplificação foi realizada a 50°C por 1200 segundos (RT), seguida de uma incubação de 95°C por 300 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C a 60 °C por 40 segundos e 72°C por 30 segundos (PCR). Para determinar a especificidade do produto amplificado foi calculada a temperatura de *melting* (T_m) através da análise da curva de dissociação. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8% para confirmação do tamanho.

3.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Bio-Estat 5.0 (AYRES, M. et al., 2007). Significância foi definida como p-valor $\leq 0,05$. A sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos métodos de diagnóstico foram calculados pelo teste exato de Fisher. A diferença das sensibilidades foi calculada pelo teste de qui-quadrado com um grau de liberdade. (IC 95%).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Comparação da sensibilidade da RT-PCR em tempo real gênero específica e do ELISA para detecção da proteína NS1

A sensibilidade para detecção do vírus da dengue da RT-PCR em tempo real gênero específica descrita por Dos Santos et al. (2008) foi comparada com aquela do *kit* comercial de ELISA para detecção da proteína NS1 (PLATELIA DENGUE NS1 AG, BIO-RAD, França). Para tal, foram analisadas 92 amostras de soro das quais 86 amostras eram provenientes de pacientes com infecção por dengue e 6 amostras de pacientes sem infecção por dengue (Tabela 4). Dentre aquelas com infecção por dengue (n=86), o ELISA foi positivo em 60 (70%), negativo em 11 (12,7%) e duvidoso em 15 (17,4%); enquanto que a RT-PCR em tempo real foi positiva em 77 (89,5%) e negativa em 9 (10,5%). O ELISA e a RT-PCR em tempo real foram negativos nas 6 amostras de pacientes sem infecção por dengue. O valor preditivo positivo (VPP) para ambos os testes foi de 100% e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 18,7% para o ELISA e 40% para a RT-PCR em tempo real. Deste modo, a sensibilidade para diagnóstico da infecção por dengue na fase aguda foi de 70% para o ELISA e 89,5% para RT-PCR em tempo real, sendo esta diferença estatisticamente significativa (p=0,0013). Todas as amostras negativas ou duvidosas (n=26) no ELISA NS1 foram aquelas que apresentaram uma carga viral ≤ 60 PFU/ml, com exceção da amostra 0613313 que apresentava uma carga viral de 639 PFU/ml e era proveniente de um paciente infetado com o DENV-2. Por outro lado, quando comparado com o teste sorológico de detecção de anticorpos IgM, o ELISA para detecção do antígeno NS1 mostrou-se muito mais sensível para amostras coletadas até o quinto dia de instalação dos sintomas (p<0,0001) (Tabela 5).

Tabela 4. Resultado das amostras testadas por RT-PCR em tempo real, ELISA para NS1 e IgM (n=92).

Amostra	Doença	IgM*	ELISA NS1	RT-PCR genérica	Carga viral PFU/mL	Amostra	Doença	IgM*	ELISA NS1	RT-PCR genérica	Carga viral PFU/mL
1652	FD	N	P	P	27.285	2598	FD	P	D	P	37
2090	FD	N	P	P	12.59	2581	FD	N	D	N	
1498	FD	N	N	P	6	2595	FD	N	P	P	13
1568	FD	N	P	P	538.518	2603	FD	N	P	P	13
1570	FD	N	D	P	8	2604	FD	N	P	P	299.695
1573	FD	N	P	P	1.378,605	2046	FD	N	P	P	187
1604	FD	N	P	P	148.511	2253	FD	N	P	P	28
1690	FD	N	P	P	520.092	2273	FD	N	P	P	104.848
2040	FD	N	P	P	1.059	2275	FD	N	P	P	895
2127	FD	N	P	P	2.774	2292	FD	N	D	P	22
2404	FD	N	P	P	140.139	2320	FD	N	N	P	14
2408	FD	N	D	P	8	2346	FD	N	P	P	23
2535	FD	N	P	P	28	2353	FD	N	D	P	9
2065	FD	N	P	P	107.934	2418	FD	P	P	P	22
2089	FD	N	N	N		2436	FD	N	N	P	6
2121	FD	N	P	P	9.007	2497	FD	P	P	N	
2131	FD	N	P	P	55.060	2513	FD	N	P	P	28
2179	FD	N	D	N		2520	FD	P	P	P	85
2183	FD	N	P	P	3.861	2533	FD	P	P	P	22
2333	FD	N	P	N		1877	FD	N	P	P	106.689
1567	FD	N	D	P	7	2254	FD	N	P	P	141
1661	FD	N	P	P	1.410,977	2259	FD	P	P	N	2.186
1667	FD	N	P	P	39	2263	OUTRA	N	N	N	
2039	FD	N	P	N		2291	FD	N	P	P	62
2068	FD	N	P	P	1.022	2294	FD	N	D	P	4
2078	FD	N	P	P	71	2295	OUTRA	N	D	N	
2128	FD	N	P	P	3.750	2297	OUTRA	N	N	N	
2174	FD	N	P	P	3.998	2409	FD	N	N	P	3
2177	FD	N	N	P	60	2424	OUTRA	N	N	N	
2198	FD	N	P	P	4.622	2430	FD	N	D	P	9
2340	FD	N	D	P	8	2443	FD	N	P	P	446
2401	OUTRA	N	D	N		2546	OUTRA	N	N	N	
2417	FD	N	P	P	2.225	2044	FD	N	P	N	
2514	FD	N	N	P	20	2251	FD	P	N	P	13
1610	FD	N	P	P	18	2279	FD	N	P	P	1.645
1666	FD	N	N	P	32	2284	FD	N	P	P	24
2154	FD	N	P	P	287.766	2308	FD	P	D	P	20
2167	FD	N	P	P	10.908	2318	FD	P	P	P	25
2170	FD	N	P	P	892.154	2325	FD	P	P	P	13
2410	FD	N	P	P	484	2381	FD	N	D	P	25
2425	FD	P	P	P	28	2389	FD	N	P	P	377.990
2580	FD	P	N	N		2451	FD	N	P	P	32
2591	FD	N	P	P	2.186	0613313	FHD	P	D	P	639
2593	FD	N	N	P	4	0809154	FD	P	P	P	160
2419	FD	N	P	P	2.161	0809322	FD	N	P	P	358
2586	FD	P	D	P	18	130407	FD	N	P	P	24

*IgM: Cutoff= 0,50. N: negativo, P: positivo, D: duvidoso, FD: febre clássica da dengue, FHD: febre hemorrágica da dengue.

Tabela 5. Sensibilidade, especificidade, valores preditivos da RT-PCR em tempo real, ELISA NS1 e IgM.

Teste	Amostras (n=)	Dengue (n=)	Positivas (n=)	Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)
RT-PCR	92	86	77	89,5 (81,1-95,1) ^a	100% (54,1-100)	100 (95,3-100)	40 (16,7-67,7)
ELISA NS1	92	86	60	70,0 (59,0-79,2) ^b	100% (54,1-100)	100 (94,0-100)	18,7 (7,2-36,4)
ELISA IgM	92	86	15	17,4 (10,1-27,1)	100% (54,1-100)	100 (78,2-100)	8 (3,0-16,0)

^a diferença de sensibilidade da RT-PCR e ELISA NS1, p=0,0013.

^b diferença de sensibilidade do ELISA NS1 e ELISA IgM, p<0,0001.

4.2. Contabilidade de custos

As despesas dos métodos de detecção de antígeno viral por ELISA e do genoma viral por RT-PCR em tempo real foram calculados considerando o preço dos reagentes e número de testes realizados (Tabela 6).

Tabela 6. Despesas (R\$) para realização da RT-PCR em tempo real e do ELISA.

	RT-PCR			ELISA
	<i>Kit para purificação do RNA viral (QIAGEN, EUA)</i>	<i>Kit Super RT-PCR (Invitrogen, EUA)</i>	<i>Par de Primers (Invitrogen, EUA)</i>	<i>Platelia Dengue NS1 AG (BIO-RAD, França)</i>
Preço (nº de testes)	4000 (250)	1400 (200)	120 (8000)	3000 (96)
Preço por reação	16	7	0,015	31
Total		23		31

4.3. Padronização de uma RT-PCR em tempo real para detecção dos sorotipos virais utilizando *primers* para a extremidade 5' do genoma viral

4.3.1. Teste de funcionalidade dos *primers* desenhados para a extremidade 5' na RT-PCR convencional

Os *primers* desenhados por análise de bioinformática (Tabela 3) foram avaliados quanto a sua capacidade de detecção dos sorotipos virais por RT-PCR convencional. Cada um dos *primers* complementares sorotipo específico foram utilizados juntamente com o *primer sense* 5'UTR-S. Considerando que a nossa estratégia de seleção dos *primers* complementares foi similar àquela descrita por YONG et al. (2007), *primers* complementares descritos por

estes autores foram também testados nesta RT-PCR. O tamanho dos produtos amplificados indica que todos os *primers* funcionaram apropriadamente (Figura 6).

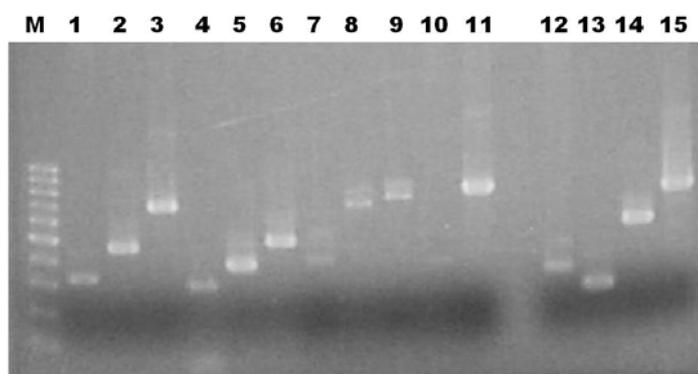


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos da RT-PCR utilizando os *primers* complementares sorotipo-específicos para DENV-1: cD1-325 (1), cD1-465 (2) e cD1-701(3); para DENV-2: cD2-288(4), cD2-370(5) e cD2-480(6); para DENV-3: cD3-398(7), cD3-692(8) e cD3-745(9); e para DENV-4: cD4-440(10) e cD4-791(11). O nome do *primer* indica o tamanho esperado do produto de amplificação. As colunas de 12 a 15 mostram os produtos de amplificação gerados pelos *primers* descritos por Yong et al., (2007) quando testados com os quatro sorotipos: DENV-1(12) com 342pb, DENV-2(13) com 251pb, DENV-3(14) com 538pb e DENV-4 (15) com 754pb. M: marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas, EUA).

4.3.2. Avaliação da especificidade dos *primers* para a extremidade 5'

Para verificar a especificidade de amplificação, cada um dos *primers* sorotipo específico foi testado contra os outros três sorotipos virais. A maioria dos *primers* gerou produtos de amplificação inespecíficos e alguns reconheceram cruzadamente outros sorotipos, além daquele para o qual foram desenhados (Figura 7).

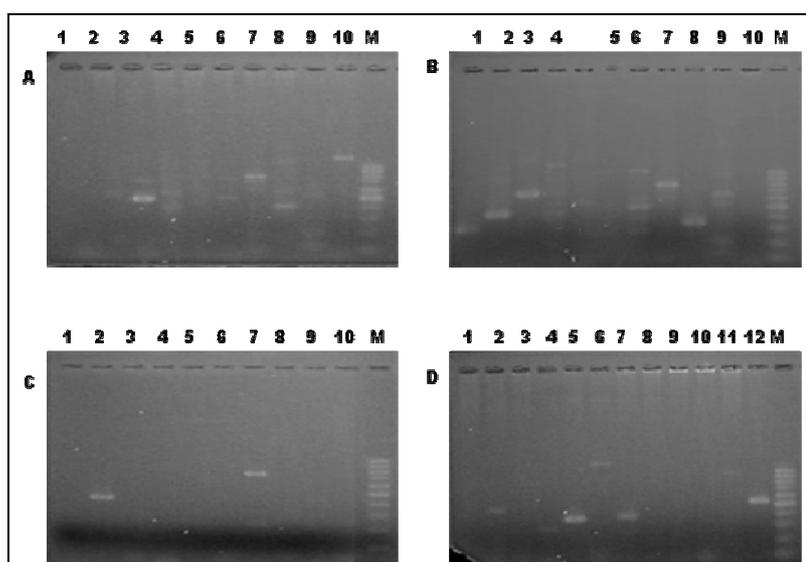


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos amplificados obtidos na RT-PCR para A) DENV-1 com cD3-745 (6), cD4-791(7) e D3(9); B) DENV-2 com cD1-325(1), cD1-465(2), cD1-701(3), cD4-791(7), D1(8) e D3(9); C) DENV-3 com cD1-465(2) e cD4-791(7); e D) DENV-4 com cD1-465(2), cD2-288(4), cD3-398(7) e D3(7). M: marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas, EUA).

Na tentativa de melhorar a especificidade da reação, a temperatura de anelamento dos *primers* foi aumentada de 53°C para 60°C, mantendo-se as demais condições da PCR (Figura 8). Com esta alteração, a maioria das amplificações inespecíficas foi eliminada, entretanto algumas reações cruzadas permaneceram.

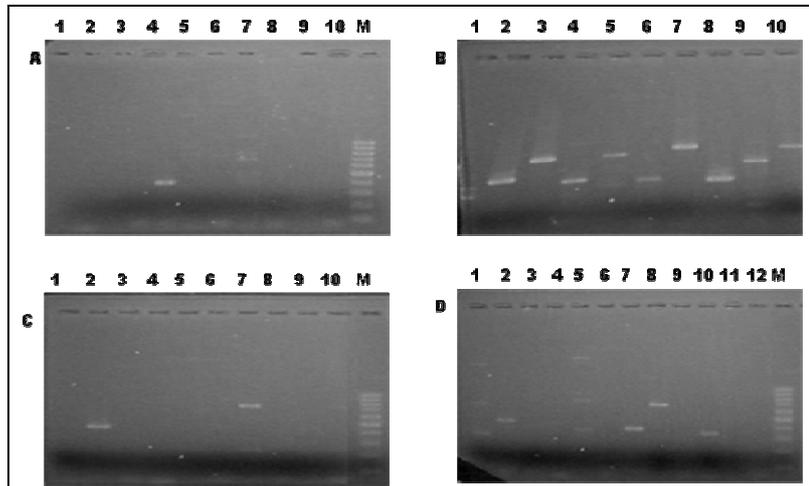


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos amplificados obtidos na RT-PCR com uma temperatura de anelamento de 60°C para A) DENV-1 com cD3-398(4) e cD4-791(7); B) DENV-2 com cD1-325(1), cD1-465(2), cD1-701(3), cD3-398(4), cD3-692(5), cD4-791(7), D1(8), D3(9) e D4(10); C) DENV-3 com cD1-465(2) e cD4-791(7); D) DENV-4 com cD1-325(1), cD1-465(2), cD2-370(5), cD3-398(7), cD3-692(8) e D1(10). M: marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas, EUA).

Considerando que não foi possível selecionar a combinação ideal de *primers* para detecção dos quatro sorotipos virais, todos os *primers* foram avaliados novamente na RT-PCR em tempo real.

4.3.3. Teste de funcionalidade dos *primers* desenhados para a extremidade 5' na RT-PCR em tempo real

Todos os *primers* da Tabela 3 foram testados na RT-PCR em tempo real com os vírus para os quais foram desenhados (Figuras 9-12). Cada um dos *primers* foi capaz de detectar o genoma do sorotipo correspondente, exceto o *primer* cD4-440 (Figura 12A).

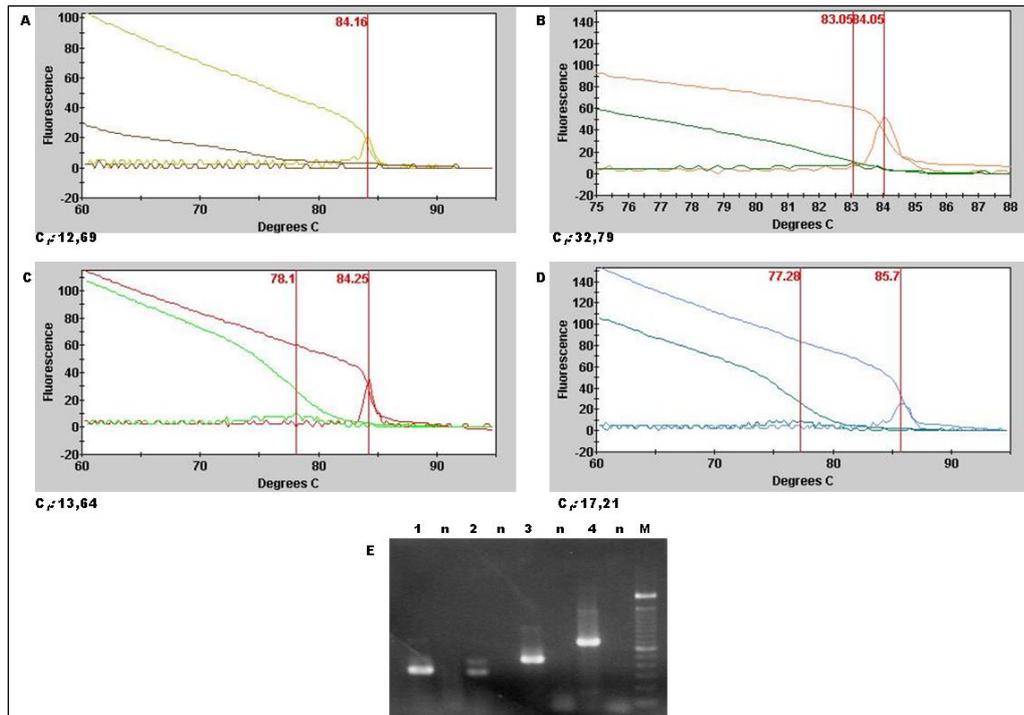


Figura 9. Detecção de DENV-1 por RT-PCR em tempo real mostrando as temperaturas de *melting* obtidas com os *primers* complementares cD1-342 (A), cD1-325 (B), cD1-465 (C), e cD1-701 (D), e eletroforese em gel de agarose 1,8% (E) dos produtos amplificados com os *primers* cD1-342 (1), cD1-325 (2), cD1-465 (3), cD1-701 (4). Controle negativo (n). M) Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen, EUA). O C_t está indicado abaixo de cada gráfico de curva de dissociação.

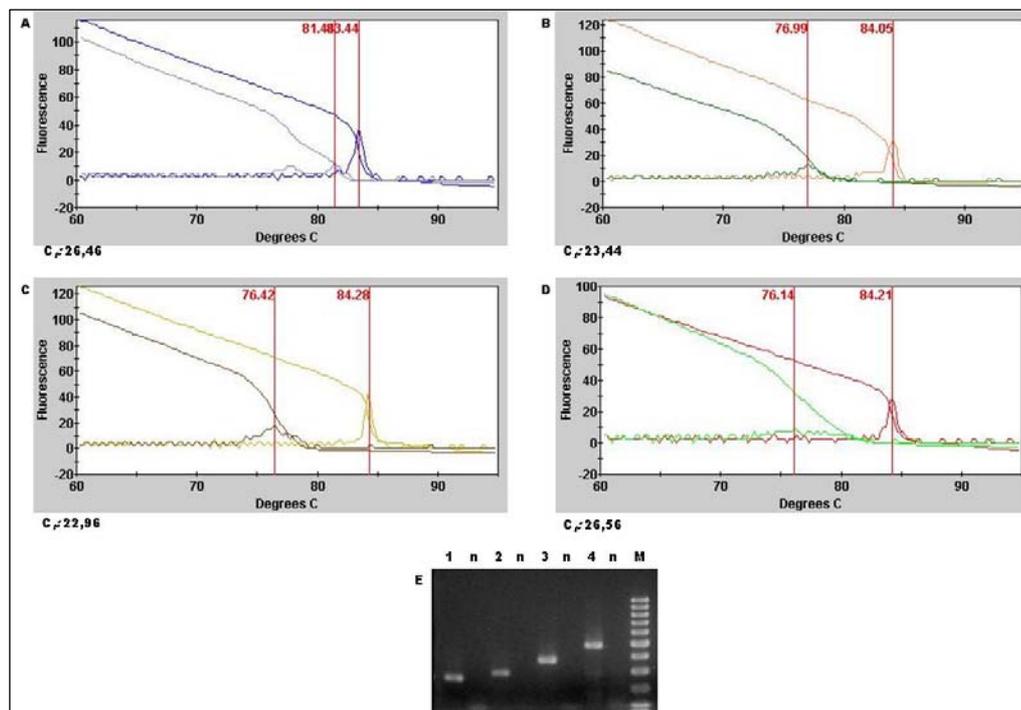


Figura 10. Detecção de DENV-2 por RT-PCR em tempo real mostrando as temperaturas de *melting* obtidas com os *primers* complementares cD2-251 (A), cD2-288 (B), cD2-370 (C), cD2-480 (D) e eletroforese em gel de agarose 1,8% (E) dos produtos amplificados com os *primers* cD2-251 (1), cD2-288 (2), cD2-370 (3), cD2-480 (4). Controle negativo (n). M) Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Fermentas, EUA). O C_t está indicado abaixo de cada gráfico de curva de dissociação.

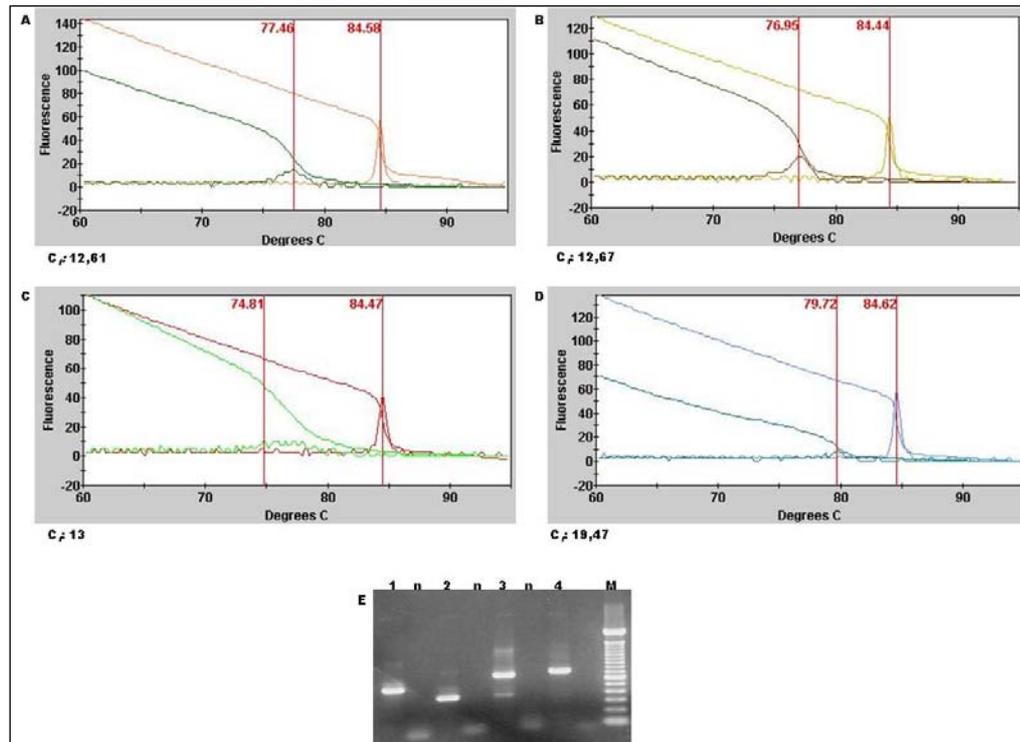


Figura 11. Detecção de DENV-3 por RT-PCR em tempo real mostrando as temperaturas de *melting* obtidas com os *primers* complementares o cDp3-538 (A), cD3-398 (B), cD3-692 (C), cD3-745 (D) e eletroforese em gel de agarose 1,8% (E) dos produtos amplificados com os *primers* cDp3-538 (1), cD3-398 (2), cD3-692 (3), cD3-745 (4). Controle negativo (n). M) Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen, EUA). O C_t está indicado abaixo de cada gráfico de curva de dissociação.

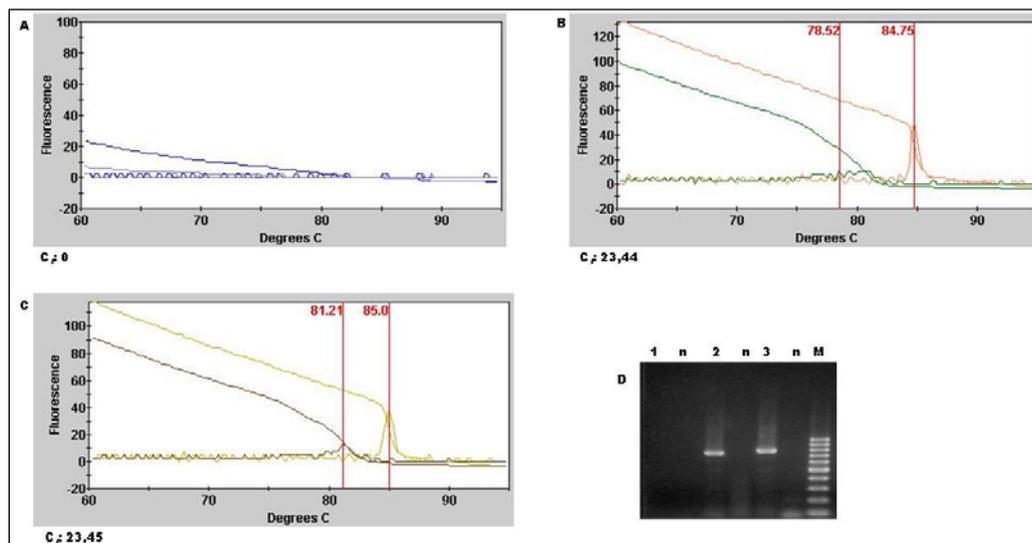


Figura 12. Detecção de DENV-4 por RT-PCR em tempo real mostrando as temperaturas de *melting* obtidas com os *primers* complementares cD4-440 (A), cDp4-754 (B), cD4-791 (C) eletroforese em gel de agarose 1,8% (D) dos produtos amplificados com os *primers* cD4-440 (1), cDp4-754 (2), cD4-791(3). Controle negativo (n). M) Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Fermentas, EUA). O C_t está indicado abaixo de cada gráfico de curva de dissociação.

4.3.4. Avaliação da especificidade de cada *primer* para a extremidade 5' na RT-PCR em tempo real

A especificidade de cada *primer* foi avaliada testando os mesmos contra sorotipos virais diferentes daqueles para os quais foram desenhados. Na Tabela 7 são indicados os valores de T_m dos produtos amplificados utilizando os diferentes *primers* para a extremidade 5' do genoma viral. Aqueles *primers* que amplificaram o genoma de outro sorotipo, apresentando T_m similar àquela do próprio sorotipo, foram considerados inespecíficos. Sete *primers* foram considerados específicos, isto é, não detectaram outro sorotipo ou apresentaram produtos de amplificação com T_m diferente da esperada para o próprio sorotipo (cD1-325 e cD1-701 para DENV-1; cD2p-251 para DENV-2; cD3-692 e cD3-745 para DENV-3; cD4p-754 e cD4-791 para DENV-4). Todos os *primers* foram aqueles desenhados neste trabalho, exceto cD2p-251 que foi descrito por Yong et al. (2007).

Tabela 7. T_m dos produtos de amplificação da RT-PCR em tempo real utilizando *primers* para a extremidade 5'.

<i>Primer</i>	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
	T_m	T_m	T_m	T_m
cD1-325	84,16	ND	ND	ND
cD1p-342*	84,05	84,07	84,36	83,55
cD1-465	84,25	ND	84,51	84,16
cD1-701	85,70	ND	84,77	ND
cD2p-251*	ND	83,44	ND	84,38
cD2-288	84,09	84,05	83,42	ND
cD2-370	84,04	84,28	84,40	83,97
cD2-480	84,38	84,21	84,29	80,53
cD3-398	81,37	83,81	84,44	84,00
cD3p-538*	84,43	84,28	84,58	83,99
cD3-692	84,34	ND	84,74	83,97
cD3-745	ND	81,86	84,62	82,22
cD4-440	ND	ND	ND	ND
cD4p-754*	83,93	ND	ND	84,75
cD4-791	86,42	84,14	84,74	85,00

* Yong et al., (2007).

ND= não detectado.

Em vermelho está indicado o T_m dos *primers* que reconheceram cruzadamente outros sorotipos.

Em azul está o T_m dos *primers* com seus respectivos sorotipos virais.

4.3.5. RT-PCR em tempo real sorotipo específica utilizando *primers* para a extremidade 5'

Para padronização da RT-PCR em tempo real sorotipo específica, foram utilizados *primers* dos quatro sorotipos em um único tubo. Para escolha dos *primers* ideais, diferentes

combinações dos sete *primers* específicos para seus respectivos sorotipos foram testadas (Figura 13).

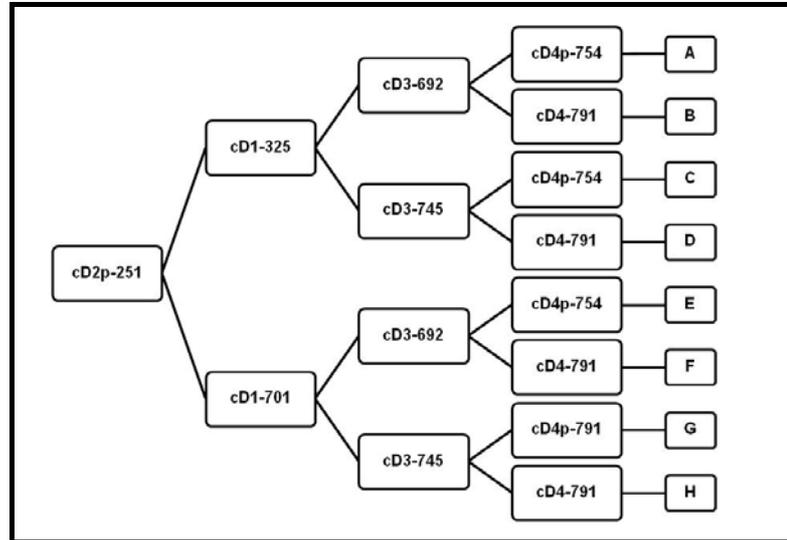


Figura 13. Fluxograma ilustrando as oito possíveis combinações dos sete *primers* específicos.

As combinações A, C, E, G e aquela incluindo os *primers* descritos por Yong et al. (2007) não permitiram a diferenciação entre a maioria dos sorotipos (Tabela 8). As combinações B, D, F e H foram as que apresentaram melhores diferenças de T_m entre os sorotipos, porém não permitiram uma clara diferenciação entre os DENV-3 e -4.

Tabela 8. T_m dos produtos de amplificação da RT-PCR em tempo real com diferentes combinações de *primers*.

Sorotipo	Combinações								Yong et al. (2007)
	A	B	C	D	E	F	G	H	
DENV-1	84,08	86,74	84,16	86,52	85,15	86,24	85,36	85,83	84,16
DENV-2	83,61	83,63	83,56	83,38	84,1	83,54	84,29	83,40	83,50
DENV-3	84,46	84,59	84,63	84,54	84,17	84,81	84,19	84,51	84,80
DENV-4	84,76	84,89	84,64	84,68	84,26	84,80	84,59	84,51	84,66

A concentração dos *primers* foi de 0,6 μ M

Na tentativa de melhorar a diferenciação dos DENV-3 e DENV-4, as combinações B, D, F e H foram novamente testadas utilizando concentrações menores dos *primers* (Tabela 9).

Tabela 9. T_m dos produtos de amplificação da RT-PCR em tempo real das combinações B, D, F e H com diferentes concentrações de *primers*.

Sorotipo	Combinação							
	B		D		F		H	
	0,3 μ M	0,4 μ M						
DENV-1	86,23	86,52	86,53	86,50	85,98	86,15	86,21	86,60
DENV-2	83,33	83,50	83,20	83,40	83,67	83,45	83,57	83,81
DENV-3	84,70	84,85	84,60	84,70	84,94	84,92	84,60	84,76
DENV-4	84,53	84,75	84,90	84,95	84,98	84,99	85,05	85,11

A combinação H com ambas as concentrações de *primers*, apresentando produtos de amplificação com o tamanho esperado para cada sorotipo viral (Figura 14), foi a que permitiu diferenciar claramente os quatro sorotipos virais. A combinação de *primers* com a concentração de 0,4 μ M foi escolhida para utilização na RT-PCR em tempo real para detecção dos quatro sorotipos virais. Este protocolo foi utilizado para analisar outros flavivírus como BUSV, ROCV, SLEV e YFV resultando negativo para todos eles.

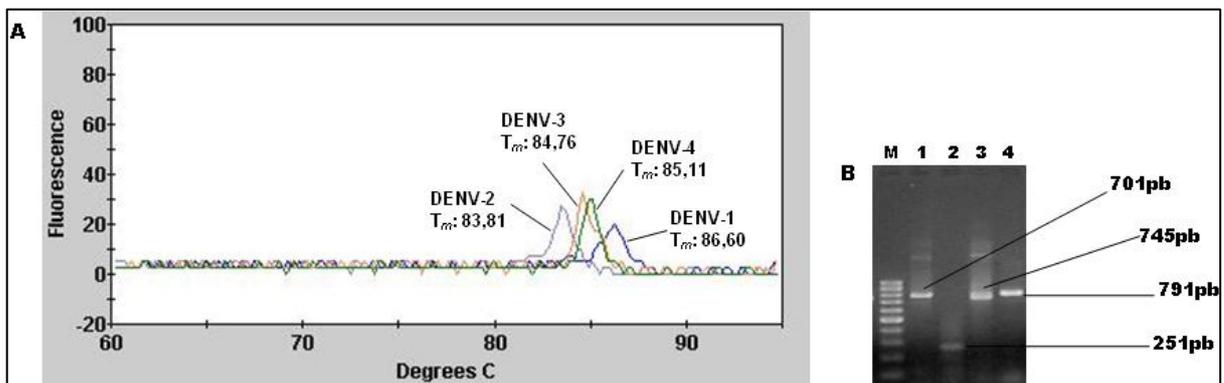


Figura 14. RT-PCR em tempo real utilizando a combinação H de *primers* na concentração de 0,4 μ M. A) Curva de dissociação mostrando as T_m para cada sorotipo. B) Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos amplificados de DENV-1 (1), DENV-2 (2), DENV-3 (3) e DEV-4 (4). M: Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas, EUA).

4.3.6. Sensibilidade da RT-PCR em tempo real sorotipo específica com *primers* para a extremidade 5'

O limite de detecção desta RT-PCR foi avaliado analisando diluições decimais seriadas do RNA dos quatro sorotipos. A RT-PCR foi capaz de detectar até 10^3 PFU/ml para os quatro sorotipos virais (Tabela 10).

Tabela 10. RT-PCR em tempo real sorotipo específica com *primers* para extremidade 5' analisando diluições decimais seriadas do RNA dos quatro sorotipos virais

Diluição	DENV-1 (1×10^6 PFU/ml)		DENV-2 ($2,34 \times 10^6$ PFU/ml)		DENV-3 (1×10^7 PFU/ml)		DENV-4 ($3,5 \times 10^6$ PFU/ml)	
	C_t	T_m	C_t	T_m	C_t	T_m	C_t	T_m
10^{-1}	23,89	86,60	27,80	83,81	26,90	84,76	26,5	85,11
10^{-2}	31,62	86,55	32,99	83,96	32,69	84,78	31,77	85,13
10^{-3}	39,50	86,48	37,94	85,35	37,44	84,55	34,43	85,15
10^{-4}	-	-	-	-	42,12	84,63	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-

4.4. Padronização de uma RT-PCR em tempo real sorotipo específica com *primers* para a região codificadora da proteína NS5

A *nested*-RT-PCR para flavivírus descrita por Bronzoni et al. (2005) foi modificada para ser utilizada na RT-PCR no formato de única etapa para detecção dos quatro sorotipos de dengue. Esta técnica, como descrita originalmente, inclui o uso de *primers* (FG1 e FG2) genéricos para flavivírus na primeira etapa da PCR e novamente o *primer sense* FG1 juntamente com uma mistura de *primers* complementares específicos para cada flavivírus na segunda etapa da PCR. Nossa estratégia foi utilizar na RT-PCR o *primer sense* FG1 juntamente com os *primers* complementares para os quatro sorotipos de dengue de modo a detectar o genoma em uma única etapa de reação.

Primeiramente, a RT-PCR convencional foi realizada utilizando os *primers* complementares individualmente para testar a funcionalidade dos mesmos. A Figura 15 mostra produtos de amplificação dos DENV-1 a DENV-4 com tamanhos idênticos àqueles obtidos quando realizada a *nested*-RT-PCR (Figura 5).

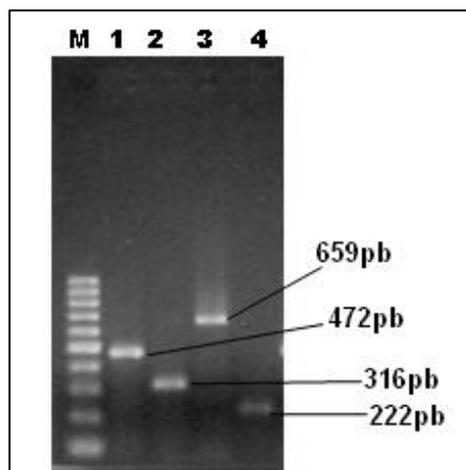


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos de amplificação de DENV-1 (1), DENV-2 (2), DEN-3 (3) e DENV-4 (4) obtidos na RT-PCR. M: marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas, EUA).

Após a confirmação da funcionalidade dos *primers*, a RT-PCR foi realizada misturando no mesmo tubo os *primers* FG1 e os quatro complementares sorotipo específico. A Figura 16 mostra a detecção específica dos quatro sorotipos virais quando utilizada esta RT-PCR.

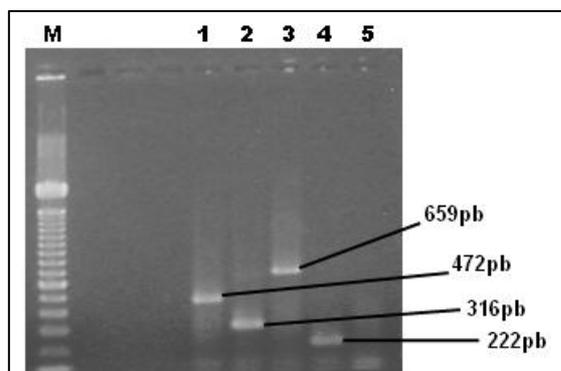


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos de amplificação de DENV-1 (1), DENV-2 (2), DEN-3 (3) e DENV-4 (4) obtidos na RT-PCR contendo a mistura de *primers* para todos os sorotipos. M: marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, EUA).

Considerando que a RT-PCR convencional contendo a mistura de *primers* foi capaz de detectar especificamente os quatro sorotipos, este formato foi utilizado no tempo real avaliando três concentrações de *primers* (0,2 μ M, 0,4 μ M, 0,6 μ M). A concentração de *primers* que se mostrou mais sensível (menor valor de C_t) foi a de 0,6 μ M, porém as T_m para DEV-1 e DENV-4 resultaram muito próximas (Tabela 11).

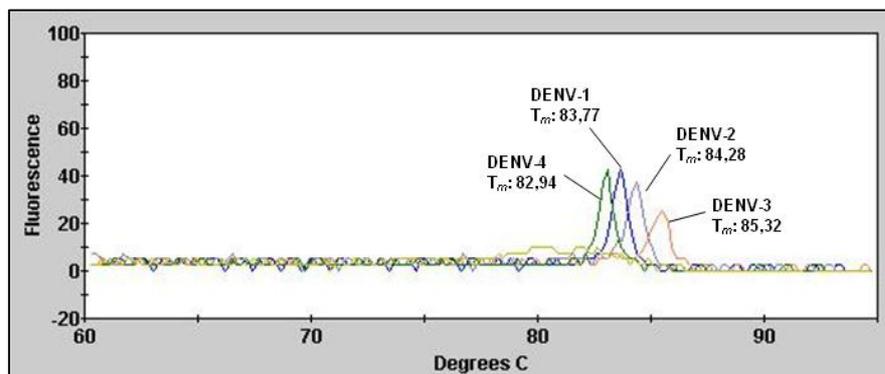
Tabela 11. T_m e C_t das três concentrações de *primers* para NS5.

Concentração de <i>primers</i>	Sorotipo							
	DENV-1 (1×10^6 PFU/ml)		DENV-2 ($2,34 \times 10^6$ PFU/ml)		DENV-3 (1×10^7 PFU/ml)		DENV-4 ($3,5 \times 10^6$ PFU/ml)	
	C_t	T_m	C_t	T_m	C_t	T_m	C_t	T_m
0,2 μ M	18,95	83,71	18,93	84,24	23,99	85,57	19,86	83,01
0,4 μ M	17,28	83,73	15,72	84,34	20,89	85,53	18,59	82,91
0,6 μ M	15,48	83,66	14,76	84,31	19,67	85,49	17,57	83,04

Na tentativa de diferenciar melhor os quatro sorotipos analisando a T_m , seis temperaturas de anelamento (50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C e 60°C) foram testadas na RT-PCR em tempo real com 0,6 μ M de *primers*. A temperatura que permitiu uma melhor caracterização dos sorotipos virais foi a de 54°C (Tabela 12, Figura 17).

Tabela 12. T_m obtidas para cada sorotipo viral com diferentes temperaturas de anelamento.

Temperatura de anelamento	T_m para cada sorotipo			
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
50° C	83,78	84,21	85,37	83,01
52° C	83,69	84,24	85,21	83,26
54° C	83,77	84,28	85,32	82,94
56° C	83,63	84	84,93	82,92
58° C	83,86	84,12	85,18	82,92
60° C	83,87	84,18	84,78	83,02

**Figura 17.** Curva de dissociação mostrando a T_m dos produtos de amplificação obtidos na RT-PCR para os DENV-1 a DENV-4 utilizando *primers* na concentração de 0,6 μ M e temperatura de anelamento de 54°C.

A sensibilidade deste protocolo foi avaliada analisando diluições decimais seriadas do RNA das sementes virais (Tabela 13). Em geral, este método se mostrou com sensibilidade variável entre os sorotipos, sendo mais baixa para os DENV-2 e DENV-3: $2,34 \times 10^4$ PFU/ml e 1×10^6 PFU/ml, respectivamente.

Tabela 13. RT-PCR em tempo real sorotipo específica com *primers* para NS5 analisando diluições decimais seriadas do RNA dos quatro sorotipos virais.

Diluição	DENV-1 (1×10^6 PFU/ml)		DENV-2 ($2,34 \times 10^6$ PFU/ml)		DENV-3 (1×10^7 PFU/ml)		DENV-4 ($3,5 \times 10^6$ PFU/ml)	
	C_t	T_m	C_t	T_m	C_t	T_m	C_t	T_m
10^{-1}	18,93	83,71	15,99	84,59	20,84	85,37	19,18	83,38
10^{-2}	22,40	83,89	19,91	84,49	-	-	21,95	83,16
10^{-3}	26,29	83,81	-	-	-	-	24,68	83,28
10^{-4}	23,30	83,16	-	-	-	-	26,15	83,15
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-

4.5. Comparação entre a RT-PCR em tempo real com *primers* para a extremidade 5' e a RT-PCR em tempo real com os *primers* para a região NS5

A sensibilidade de ambas as RT-PCR contendo os *primers* para a extremidade 5' e da região NS5 foi comparada analisando 96 amostras de soro provenientes de pacientes com infecção por dengue confirmada por RT-PCR em tempo real (Tabela 14). RT-PCR com *primers* para a extremidade 5' foi positiva em 32 amostras (33%) enquanto que com *primers* para a região NS5 foi positiva em apenas 9 (9,3%). Embora a sensibilidade da RT-PCR com *primers* para a extremidade 5' tenha sido baixa, mostrou-se significativamente maior do que aquela obtida com os *primers* da região NS5 ($p=0,0001$).

Tabela 14. Amostras testadas por RT-PCR em tempo real com *primers* para a extremidade 5' e para a região NS5

Amostra Sorotipo		RT-PCR		PFU/ml	Amostra Sorotipo		RT-PCR		PFU/ml
		5'	NS5				5	NS5	
1652	3	N	N	27.285	2275	3	P	P	895
2090	3	P	N	12.759	2292	3	P	N	22
1498	3	N	N	6	2320	3	N	N	14
1568	3	P	N	538.518	2346	3	N	N	23
1570	3	N	N	8	2353	3	N	N	9
1573	3	P	P	1.378.605	2418	3	N	N	22
1604	3	N	N	148.511	2436	3	N	N	6
1690	3	N	P	520.092	2513	3	N	N	28
2040	3	P	N	1.059	2520	3	N	N	85
2127	3	P	N	2.774	2533	3	N	N	22
2404	3	P	P	140.139	1877	3	P	P	106.689
2408	3	N	N	8	2254	3	P	P	141
2535	3	N	N	28	2291	3	N	N	62
2065	3	P	N	107.934	2294	3	P	N	4
2121	3	P	N	9.007	2355	3	N	N	27
2131	3	P	P	55.060	2409	3	N	N	3
2183	3	P	N	3.861	2430	3	N	N	9
1567	3	N	N	7	2443	3	N	N	446
1661	3	P	N	1.410.977	1893	3	N	N	7
1667	3	N	N	39	2251	3	N	N	13
2068	3	P	N	1.022	2279	3	P	N	1.645
2078	3	N	N	71	2284	3	N	N	24
2128	3	N	N	3.750	2308	3	N	N	20
2174	3	N	N	3.998	2318	3	N	N	25
2177	3	N	N	60	2325	3	N	N	13
2198	3	N	N	4.622	2381	3	N	N	25
2340	3	N	N	8	2389	3	N	N	377.990
2417	3	P	N	2.225	2409	3	N	N	1.016
2514	3	N	N	20	2451	3	N	N	32
1610	3	N	N	18	RN E	3	N	N	27
1666	3	N	N	32	RN G	3	N	N	14
2138	3	P	N	93.903	0613313	2	P	N	639
2154	3	P	N	287.766	0809154	3	N	N	160
2167	3	P	N	10.908	0809322	3	N	N	358
2170	3	P	P	892.154	130407	3	N	N	24
2331	3	N	N	9	POR1164	1	N	N	34.613
2410	3	N	N	484	MAR3818	1	N	N	14.750
2425	3	N	N	28	BEL78824	1	N	N	365.056
2591	3	N	N	2.186	BEL78921	1	P	N	7.503.778
2593	3	P	N	4	ROR5861	2	P	N	65.151
510	3	N	N	104	597	3	P	N	473.980
544	3	N	N	93	599	3	P	N	5
549	3	N	N	7.882	2419	3	N	N	2.161
550	3	P	N	49	2586	3	P	N	18
554	3	N	N	3.043	2598	3	N	N	37
2595	3	N	N	13	2046	3	P	P	187
2603	3	N	N	13	2253	3	N	N	28
2604	3	N	N	299.695	2273	3	N	N	104.848

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A dengue, nas suas formas de febre clássica da dengue e febre hemorrágica da dengue, representa atualmente um importante problema de saúde pública (WHO, 2005; BRASIL, 2009). As principais dificuldades para combater esta virose são a falta de vacina e de tratamento antiviral específico, a impossibilidade de eliminação do vetor e o desconhecimento das causas que levam ao aparecimento dos casos mais graves. Cuidados precoces como hidratação apropriada (ambulatorial e/ou hospitalar) estão associados à diminuição do número de casos fatais (MARTÍNEZ, 2006). Portanto, diagnóstico rápido e precoce dos casos suspeitos de infecção pelo vírus da dengue é de suma importância, tanto para um melhor atendimento ao paciente quanto para auxiliar as autoridades sanitárias na elaboração e efetivação dos planos de contingência das epidemias. Neste sentido, Eric Martínez Torres (2005, p. 276), ressalta que:

[...] Sem confirmação da infecção por dengue e sem vigilância apoiada pelo laboratório, nenhum programa de prevenção e controle pode avançar. O diagnóstico laboratorial do dengue permite a clínicos e epidemiologistas fazer seu trabalho com qualidade e orienta os especialistas de controle de vetores para onde dirigir seus esforços. O investimento que cada instituição ou cada governo possa fazer em laboratórios para o diagnóstico sorológico e virológico do dengue será recuperado pela economia de gastos de hospitalização, medicamentos e inseticidas, bem como com a diminuição do custo social de doença e morte.

Os métodos sorológicos que visam a detecção, principalmente, de IgM são os mais utilizados no diagnóstico da dengue, porém não são apropriados para diagnóstico precoce da doença já que a maioria dos indivíduos não apresenta quantidades detectáveis de IgM específica contra a infecção viral durante a fase febril. Nesta fase, os métodos moleculares são os mais apropriados para o diagnóstico definitivo da doença (SHU; HUANG, 2004). Como alternativa para diagnóstico precoce, foi descrito um ELISA para detecção de NS1 em soro de pacientes na fase aguda da doença (ALCON et al., 2002; XU et al., 2006). Comparação de diferentes *kit* de ELISA para NS1 disponíveis no mercado mostrou que o PLATELIA NS1 DENGUE AG (BIO-RAD, França) é o mais sensível deles (BESSOFF et al., 2008; TY HANG et al., 2009).

Recentemente nosso grupo descreveu uma RT-PCR em tempo real simples, baseada no uso de um corante fluorescente que se liga à dupla fita de DNA (SYBR Green), com potencial para ser utilizada na rotina laboratorial para diagnóstico precoce da infecção pelo vírus da dengue (DOS SANTOS et al., 2008). Esta metodologia mostrou maior sensibilidade e especificidade que métodos como sorologia (IgM/IgG), isolamento viral e RT-PCR

convencional. No presente trabalho, esta técnica de RT-PCR em tempo real foi comparada com o ELISA comercial PLATELIA DENGUE NS1 AG (BIO-RAD, França) mostrando-se significativamente mais sensível na identificação de soros de pacientes infectados com dengue, principalmente em amostras com baixa carga viral. Esta maior sensibilidade da RT-PCR em tempo real quando comparada com o ELISA para NS1 também foi observada por outros autores (BESSOFF et al., 2008; TY HANG et al., 2009). Além disto, o *kit* da BIO-RAD tem se mostrado menos sensível nas infecções secundárias devido, provavelmente, ao sequestro da NS1 em imunocomplexos impedindo que os epítomos-alvo se liguem à placa ou sejam reconhecidos pelo anticorpo monoclonal utilizado no teste (TY HANG et al., 2009; DUSSART et al., 2008; KUMARASAMY et al., 2007). Este inconveniente é eliminado na RT-PCR em tempo real já que a detecção do genoma viral, realizada após extração do RNA das amostras de soro, não sofre este tipo de interferência. Ainda, o ELISA para NS1 mostrou uma sensibilidade variável dependendo do sorotipo; Tay Hang et al. (2009), observaram uma menor sensibilidade para os indivíduos infectados com DENV-2, enquanto que Bessoff et al. (2008), para indivíduos infectados com DENV-4. Esta menor sensibilidade provavelmente está relacionada com a presença de anticorpos pré-existentes nas infecções secundárias ou com o anticorpo monoclonal utilizado no *kit*, o qual reconheceria melhor epítomos de alguns dos sorotipos. A RT-PCR em tempo real descrita por nosso grupo mostrou sensibilidade similar para os quatro sorotipos devido à utilização de um par de *primers* desenhados com base na extremidade 5' do genoma viral, a qual é altamente conservada nos quatro sorotipos (DOS SANTOS et al., 2008). Embora a especificidade da RT-PCR tenha sido de 100%, esta deve ser melhor avaliada utilizando um número maior de amostras negativas para dengue.

Tradicionalmente, os métodos sorológicos são considerados mais simples que os moleculares, entretanto este paradigma está mudando com o desenvolvimento da PCR em tempo real. A RT-PCR em tempo real descrita pelo nosso grupo requer, após a purificação do RNA viral, a simples preparação de uma mistura de reação que é processada e analisada automaticamente em aproximadamente 2 horas. Por outro lado, o *kit* da BIO-RAD inclui várias etapas de manipulação tais como mistura de reagentes, incubações e lavagens. Os métodos sorológicos são considerados também mais econômicos que os moleculares, entretanto a despesa da nossa RT-PCR em tempo real mostrou-se similar à do *kit* da BIO-RAD. O uso da PCR em tempo real ainda é muito limitado devido ao custo elevado do equipamento, entretanto a tendência com a popularização do seu uso é a diminuição do custo. Uma futura implementação desta RT-PCR em tempo real garantirá o diagnóstico rápido, preciso e definitivo de um número maior de pacientes, auxiliando o médico na tomada das

medidas terapêuticas precocemente e assim melhorando o prognóstico do paciente sem onerar excessivamente o sistema de saúde. Mesmo com o atual custo, a sua implementação em centros de referência com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e o Instituto Adolfo Lutz está plenamente justificada, sendo que o mesmo equipamento pode ser utilizado no diagnóstico molecular de outras doenças.

Embora o diagnóstico de infecção por dengue seja suficiente para o atendimento adequado do paciente e para tomada de medidas de controle da epidemia, a identificação do sorotipo circulante é também muito importante do ponto de vista epidemiológico. Vaughn et al. (2000) relataram que a gravidade da doença tem correlação tanto com a carga viral quanto com o sorotipo. A mudança do sorotipo circulante em uma região pode ser um indicador de uma iminente epidemia já que a população não apresenta imunidade protetora contra este novo sorotipo. Tal identificação é usualmente realizada por métodos sorológicos, os quais apresentam alto índice de reações cruzadas entre flavivírus e, principalmente, entre os diferentes sorotipos de dengue (JOHNSON et al., 2000; MARTIN et al., 2002; MARTIN et al., 2000). Além disso, na infecção secundária, a resposta de anticorpo pode ser maior contra o vírus da infecção primária que contra o sorotipo infectante e isto pode interferir no resultado do teste sorológico. Também, a resposta de IgM pode ser baixa e assim não detectável nos ensaios sorológicos. Como resultado, a identificação do sorotipo infectante não é possível em muitos casos em regiões onde múltiplos flavivírus estão circulando, como é o caso de Brasil (FIGUEIREDO, 2000). Isolamento do vírus a partir de soro na fase aguda seguido de testes sorológicos permanece como o método de identificação do sorotipo, contudo os métodos moleculares estão sendo cada vez mais utilizados por serem mais rápidos e sensíveis que o isolamento viral (SHU; HUANG, 2004). Dentre os métodos moleculares, a RT-PCR em tempo real vem sendo utilizada para identificação do sorotipo viral, entretanto a maioria dos métodos utiliza sondas específicas para cada sorotipo, as quais são de alto custo (CALLAHAN et al., 2001; LAI et al., 2007). Neste trabalho descrevemos uma RT-PCR em tempo real em única etapa para identificação do sorotipo viral baseada no uso de SYBR Green. Nossa estratégia foi selecionar *primers* direcionados para a extremidade 5' e para a região codificadora da proteína NS5 por serem regiões conservadas entre membros do mesmo sorotipo.

Para a extremidade 5' foram utilizados *primers* desenhados por análise de bioinformática e aqueles descritos por Yong et al. (2007). Estes *primers* foram analisados para seleção da combinação ideal a ser utilizada na RT-PCR em tempo real de única etapa para identificação dos quatro sorotipos. O conjunto de *primers* que se mostrou mais adequado para

identificação dos sorotipos foi o seguinte: cD1-701, cD2p-251, cD3-745 e cD4-791 (Figura 14), sendo que o *primer* cD2p-251 foi descrito por Yong et al. (2007). Estes autores descreveram uma RT-PCR em tempo real baseada no SYBR Green para diferenciação entre os sorotipos utilizando também *primers* para a extremidade 5'. Porém, quando analisados em nosso estudo, estes *primers* não permitiram a diferenciação entre a maioria dos sorotipos com base na análise de T_m (Tabela 8). Esta inespecificidade pode estar relacionada com o baixo número de sequências (uma para cada sorotipo) utilizadas por estes autores no desenho dos *primers*. Em nosso trabalho utilizamos 11 sequências de DENV-1, 22 de DENV-2, 11 de DENV-3 e 4 de DENV-4 para o desenho dos *primers* obtendo maior especificidade.

Os *primers* da região codificadora da proteína NS5 utilizados em nosso estudo foram os descritos por Bronzoni et al. (2005) para identificação de diversos flavivírus numa *nested*-RT-PCR. Estes *primers* mostraram-se apropriados para identificação dos quatro sorotipos virais na RT-PCR em tempo real de única etapa, embora com sensibilidade muito baixa.

Duas RT-PCR em tempo real, uma contendo *primers* da extremidade 5' e outra contendo *primers* da região codificadora da proteína NS5, foram avaliadas testando amostras de soro sabidamente positivas para dengue. Os resultados mostraram que o protocolo contendo os *primers* da extremidade 5' foi mais sensível na detecção das amostras positivas, entretanto este protocolo foi muito menos sensível que a RT-PCR genérica.

Considerando os resultados obtidos, sugerimos uma estratégia de triagem dos casos suspeitos utilizando a RT-PCR genérica para posteriormente identificar o sorotipo viral com o protocolo que utiliza os *primers* da extremidade 5'. Embora este último protocolo tenha sido pouco sensível, a identificação do sorotipo infectante em algumas amostras é suficiente para definir qual o sorotipo circulante durante uma epidemia. Estratégias similares têm sido propostas por outros autores, entretanto estes realizam a diferenciação entre os sorotipos utilizando sondas específicas, o que torna o custo do teste mais elevado do que o apresentado em nosso trabalho (LAI et al., 2007; CALLAHAN et al., 2001).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A RT-PCR genérica mostrou-se mais sensível que o PLATELIA DENGUE NS1 AG (BIO-RAD, França).
2. As despesas dos testes RT-PCR em tempo real e ELISA para NS1 foram similares.
3. Dois protocolos de RT-PCR em tempo real para diagnóstico sorotipo específico da dengue foram desenvolvidos.
4. O melhor protocolo de RT-PCR para identificação do sorotipo viral foi aquele que continha os *primers* da extremidade 5'.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMANA, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol**, 40:376-81, 2002.

AQUINO, V.H.; ANATRIELLO, E.; GONÇALVES, P.F.; SILVA, E.V.; VASCONCELOS, P.F.C.; VIEIRA, D.S.; BATISTA, W.C.; BOBADILLA, M.L.; VAZQUEZ, C.; MORAN, M.; FIGUEIREDO, L.T.M. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002–2004. **Am J Trop Med Hyg**, 75(4): 710–715, 2006.

ASHBURN, P.M.; CRAIG, C.F. In: GUBLER, D.J. Commentary: Ashburn PM, Craig CF. Experimental investigations regarding the etiology of dengue. **J Infect Dis**, 4:440–475, 1907.

AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, L.D.; SANTOS, A.D. Distribuição de probabilidades. In: AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, L.D.; SANTOS, A.D. **Bio-Estat 5.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. 5ª ed, Belém – Pará, Brasil: Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2007. P. 95-110, 2007.

BARKHAM, T.M.; CHUNG, Y.K.; TANG, K.F.; OOI, E.E. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 100(2):142-8, 2006.

BESSOFF, K.; DELOREY, M.; SUN, W.; HUNSPERGER E. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. **Clinical and vaccine immunology**, Vol. 15, No. 10, p. 1513–1518, 2008.

BOUSSEMART, T.; BABE, P.; SIBILLE, G.; NEYRET, C.; BERCHEL, C. Prenatal transmission of dengue: two new cases. **Journal of Perinatology**, 21:255-257, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim_15_jan_2009JaneiroNovembro. Disponível em: < <http://www.combatadengue.com.br/img/down/.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2009.

BRASIL. Portaria 5, de 21 de fevereiro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2006. Seção 1, p.34.

BRICKS, L.F. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatrics** (São Paulo), 26(4):268-81, 2004.

BRONZONI, R.V.M.; BALEOTTI, F.G.; NOGUEIRA, R.M.R.; NUNES, M. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian *Alphaviruses* and *Flaviviruses*. **Journal of Clinical Microbiology**, 696-702, 2005.

BURKE, D.S.; MONATH, T.P. Flaviviruses. In: KNIPE, D.M. and HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, vol 1, p 1102-1252.

CALLAHAN, J.D.; WU, S.J.L.; DION-SCHULTZ, A; MANGOLD, B.E.; PERUSKI, L.F.; WATTS, D.M.; PORTER, K.R.; MURPHY, G.R.; SUHARYONO, W.; KING, C.C.; HAYES, C.G.; TEMENAK, J.J. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 39, No. 11, p. 4119–4124, 2001.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **J. Hist. Med.**, Allied Sci. 26:243–262, 1971

CHAO, D.Y.; DAVIS, B.S.; CHANG, G.J.J. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. **JCM**, 00842-06, 2006.

CHEN, L.H.; WILSON, M.E. Non-vector transmission of dengue and other mosquito-borne flaviviruses. WHO, **Dengue Bulletin**, v. 29, 2005.

CHIEN, L.J.; LIAO, T.L.; SHU, P.Y.; HUANG, J.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44: 1295–1304, 2006.

CHUTINIMITKUL, S.; PAYUNGPORN, S.; THEAMBOONLERS, A.; POOVORAWAN, Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. **Journal of Virological Methods**, 129 (8.15), 2005.

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

DEEN, J.L.; HARRIS, E.; WILLS, B.; BALMASEDA, A.; HAMMOND, S.N.; ROCHA, C.; DUNG, N.M.; HUNG, N.T.; HIEN, T.T.; FARRAR, J. J. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **The Lancet**, 368: 170–73, 2006.

DE SIMONE, T.S.; NOGUEIRA, R.M.; ARAÚJO, E.S.; GUIMARÃES, F.R.; SANTOS, F.B.; SCHATZMAYR, H.G.; SOUZA, R.V.; TEIXEIRA FILHO, G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 98(9):553-62, 2004.

DOHERTY, R. Australia's contribution to tropical health: past and present. **The Medical Journal of Australia**, Apr 19;158(8):552-7, 1993.

DOS SANTOS, H.W.G.; POLONI, T.R.R.S.; SOUZA, K.P.; MÜLLER, V.D.M.; TREMESCHIN, F. et al. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis dengue virus infection. **Journal of Medical Virology**, 80:1426 – 1433, 2008.

DUSSART, P.; LABEAU, B.; LAGATHU, G.; LOUIS, P.; NUNES, M .R. T.; RODRIGUES, S.G.; STORCK-HERRMANN, C.; CESAIRE, R.; MORVAN, J.; FLAMAND, J.; BARIL, L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13(11): 1185-1189, 2006.

ESPY M.J.; UH, J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER, E.A.; YAO, J.D.C.; WENGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL, F.R.; SMITH, T.F. real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19(1): 165–256, 2006.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J. et al. *Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. London: Elsevier, 2005.

FIGUEIREDO, L.T.M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina, Ribeirão Preto**, 32: 15-20, 1999.

FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection*, 1643–1649, 2000.

FIGUEIREDO, L.T.M.; FONSECA, B.A.L. Dengue. In: Roberto Focaccia. **Tratado de infectologia**. 3^a Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 345-358.

FIGUEIREDO, L.T.M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(2):203-210, 2006.

FIGUEIREDO, R.M.; NAVECA, F.G.; BASTOS, M.S.; MELO, M.N.; VIANA, S.S.; MOURÃO, M.P.; COSTA, C.A.; FARIAS, I.P. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 14(4):667-9. 2008.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, N^o. 3: 480–496, 1988.

GUBLER, D.J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*–borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. **Am J Trop Med Hyg**, 40: 571–8, 1989.

GUBLER, D.J.; CLARK, G.G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerg Infect Dis**, 1:55-57, 1995.

GUBLER, D.J. Commentary: Ashburn PM, Craig CF. Experimental investigations regarding the etiology of dengue. *J Infect Dis*, 1907, 4:440-75. **The Journal of Infectious Diseases**, 189:1744-83, 2004

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**, 3:621–627, 1996.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale J Biol Med**, 42:350±362, 1970.

HALSTEAD, S.B.; NIMMANITYA, S.; COHEN, S.N. Observations related to pathogenesis of dengue haemorrhagic fever: I, relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **Yale Journal Biol Med**, 42: 311-28, 1970.

HALSTEAD, S.B.; DEEN, J. The future of dengue vaccines. **The Lancet**, 360:1243–5, 2002.

HALSTEAD, S. B. Seminar. **The Lancet**, v 370, 2007.

GLASER, V. Interview with Scott B. Halstead, M.D. **Vector-borne and zoonotic diseases**. v 7, Number 1, 2007.

HAMMON, W.M.; RUDNICK, A.; SATHER, G.E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. **Science**, 131:1102-1103, 1960. In: KNIPE, D.M. and HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, p 1172-1173.

HOWE, G.M. A world geography of human diseases. Academic Press, Inc., New York, N.Y. 1977.

JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J.D.; GOUY, M.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends Biochem Sci**, 23(10):403-5, 1998.

JELINEK, T.; WASTLHUBER, S.P.; SCHATTENKIRCHNER, M.; LÖSCHER, T. Influence of rheumatoid factor on the specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosing dengue infection. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 19:555-556, 2000.

JESSIE, K.; FONG, M.Y.; DEVI, S.; LAM, S.K.; WONG, K.T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **J Infect Dis**, 189:1141-8, 2004.

JOHNSON, A. J.; MARTIN, D. A.; KARABATSOS, N.; ROEHRIG, J.T. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal anti-body-based capture enzyme-linked immunosorbent assay . **J. Clin. Microbiol**. 38:1827–1831. 2000.

KAO, C.L.; KING, C.C.; CHAO, D.Y.; WU, H.L.; CHANG, G.J.J. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **J Microbiol Immunol Infect**, 38:5-16, 2005.

KIMURA, R.; HOTTA, S. On the inoculation of dengue virus into mice. **Nippon Igaku**. 3379: 629-633, 1944.

KITTIGUL, L.; MEETHIEN, N.; SUJIRARAT, D.; KITTIGUL, C.; VASANAVAT, S. Comparison of dengue virus antigens in sera and peripheral blood mononuclear cells from dengue infected patients. **Asian Pac J Allergy Immunol**, 15:187-91, 1997.

KUMARASAMY, V.; CHUA, S.K.; HASSAN, Z.; WAHAB, A.H.A.; CHEM, Y.K.; MOHAMAD, M.; CHUA, K.B. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen- capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. **Singapore Med J**, 48 (7): 669, 2007.

LAI, Y.L.; CHUNG, Y.K.; TAN, H.C.; YAP, H.F.; YAP, G.; OOI, E.E.; NG, L.C. 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**, 45 (3):935-941, 2007.

LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, N^o. 3: 545-551, 1992.

LAOPRASOPWATTANA, K.; LIBRATY, D.H.; ENDY, T.P.; NISALAK, A.; CHUNSUTTIWAT, S.; VAUGHN, D.W.; REED, G.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L.; GREEN, S. Dengue virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. **The Journal of Infectious Diseases**, 192:510–9, 2005.

LAI, Y.L.; CHUNG, Y.K.; TAN, H.C.; YAP, H.F.; YAP, G.; OOI, E.E.; NG, L.C. 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**, Vol. 45, No. 3, p. 935–941, 2007.

LIBRATY, D.H.; YOUNG, P.R.; PICKERING, D.; ENDY, T.P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, 186:1165-8, 2002.

LINDENBACH, B.D. AND RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D.M. and HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, vol 1, p 1102-1148.

LOZACH, P.Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J.L.; REY, F.A.; DESPRE'S, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; AMARA, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280: 23698–23708, 2005.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, V. 30, N^o 6, 2002.

MALERGUE, F.; CHUNGUE, E. Rapid and sensitive streptavidine-biotine amplified fluoregenic enzyme-linked immunosorbent-assay for detection and identification of dengue viral antigens in serum. **J Med Virol**, 47:43-7, 1995.

MAROVICH, M.; GROUARD-VOGEL, G.; LOUDER, M.; ELLER, M.; SUN, W.; WU, S.J.; PUTVATANA, R.; MURPHY, G.; TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T.; BIRX, D.; HAYES, C.; SCHLESINGER-FRANKEL, S.; MASCOLA, J. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. **jid symposium proceedings**, v. 6, N^o. 3, 2001.

MARTIN, D.A.; MUTH, D.A.; BROWN, T.; JOHNSON, A.J.; KARABATSOS, N.; ROEHRIG, J.T. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. **J. Clin. Microbiol.** 38:1823–1826. 2000.

MARTIN, D.A.; BIGGERSTAFF, B.J.; ALLEN, B.; JOHNSON, A.J.; LANCIOTTI, R.S.; ROEHRIG, J.T. Use of immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:544–549. 2002.

MARTÍNEZ, E. Dengue. Tradução Rogério Dias. Rio de Janeiro: Fiocruz. 344 p., 2005.

MARTÍNEZ, E. Temas de actualidad. Current topics. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, 20(1), 2006.

MCSHERRY, J. A. Some medical aspects of the Darien schema: was it dengue? **Scot. Med. J.**, 27:183–184, 1982.

MIAGOSTOVICH, M.P.; RAMOS, R.G.; NICOL, A.F.; NOGUEIRA, R.M.; CRUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V. et al. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol**, 16:204-8, 1997.

MIAGOSTOVICH, M.P.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; LANCIOTTI, R.S. Molecular epidemiology of Den- 2 virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93: 625- 626, 1998.

MIAGOSTOVICH, M.P.; DOS SANTOS, F.B.; DE SIMONE, T.S.; COSTA, E.V.; FILIPPIS, A.M.; SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Braz J Med Biol Res.**, 35(8):869-72, 2002.

MONGKOLSAPAYA, J.; DEJNIRATTISAI, W.; XU, X.N.; VASANAWATHANA, S.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; CHAIRUNSRI, A.; SAWASDIVORN, S.; DUANGCHINDA, T.; DONG, T.; ROWLAND-JONES, S.; YENCHITSOMANUS, P.T.; MCMICHAEL, A.; MALASIT, P.; SCREATON, G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, 9: 921-7, 2003.

NIESTERS, H. G. Clinical virology in real time. **J Clin Virol**, 25(Suppl.3):S3–12, 2002.

NOBUCHI, H. The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. **Kanpo Rinsho**, 26:422–425, 1979. In: Gubler, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, N^o. 3: 480–496, 1988.

NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMAYR, H.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FARIAS, M.F.; FARIAS FILHO, J.D. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 83(2):219-25, 1988.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FILIPPIS, A.M.B.; PEREIRA, M.A.S.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMAYR, H.G.; DE FILIPPIS, A.M.; DOS SANTOS, F.B.; DA CUNHA, R.V.; COELHO, J.O.; DE SOUZA, L.J.; GUIMARÃES, F.R.; DE ARAÚJO, E.S.; DE SIMONE, T.S.; BARAN, M.; TEIXEIRA, G. JR; MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**, 11(9):1376-81, 2005.

OSANAI, C.H.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; TANG, A.T.; DO AMARAL, R.S.; PASSOS, A.D.; TAUIL, P.L. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 25(1):53-4, 1983.

POERSCH, C.O.; PAVONI, D.P.; QUEIROZ, M.H.; BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; SANTOS, C.N.D.; KRIEGER, M.A. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, 32: 272–277, 2005.

PONTES, R.J.S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue in urban locality of Southeastern, Brazil: epidemiological aspects. **Rev. Saúde Pública**, v. 28, N^o.3:218-227, 1994.

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

RIGAU-PÉREZ, J.G. The early use of break-bone fever (*quebranta huesos*, 1771) and dengue (1801) in Spanish. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 59(2): 272–274, 1998.

RIGAU-PÉREZ, J.G. Severe dengue: the need for new case definitions. **Lancet Infect Dis**, 6: 297–302, 2006.

ROCCO, M.I.; KAVAKAMA, B.B.; SANTOS, C.L.S. Brief communication first isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 43 (1): 55-57, 2001.

RUSH, A.B. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. **Medical enquiries and observations**, p. 104.117, Prichard and Hall, Philadelphia, Pa.1789.

SABIN, A. B. RESEARCH ON DENGUE DURING WORLD WAR II. **Am J Trop Med Hyg.** 1(1):p30-50, 1952.

SABIN, A. RECENT ADVANCES IN OUR KNOWLEDGE OF DENGUE AND SANDFLY FEVER. The Nineteenth Annual Charles Franklin Craig Lecture. **Am J Trop Med Hyg.** 4(2): p 198-207, 1954.

SAMUEL, P.P.; TYAGI; B.K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian J Med Res**, 123, pp 615-628, 2006.

SCPrimer. www.scprimer.cpmc.columbia.edu.

SHEPARD, D.S.; SUAYA, J.A.; HALSTEAD, S.B.; et al. Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine. **Vaccine**, 22:1275–80, 2004.

SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 81(2):245-6, 1986.

SCHERER, W.F. The complexity of arbovirus nomenclature: a proposal to simplify it. **Am. J. Epidemiology**, 88, p.145-146, 1968.

SHU, P.Y.; CHANG, S.F.; KUO, Y.C.; YUEH, Y.Y.; CHIEN, L.J.; SUE, C.L.; LIN, T.H.; HUANG, J.H. 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, N^o. 6: 2408–2416, 2003.

SHU, P.Y.; CHEN, L.K.; CHANG, S.F.; YUEH, Y.Y.; CHOW, L.; CHIEN, L.J.; CHIN, C.; LIN, T.H.; HUANG, J.H. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. **Clin Diagn Lab Immunol**, 10:622–630, 2003a.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 11:642–650. 2004.

SWEET, B.H.; SABIN, A. PROPERTIES AND ANTIGENIC RELATIONSHIPS OF HEMAGGLUTININS ASSOCIATED WITH THE DENGUE VIRUSES. **J Immunol.** 73(5) p 363-373, 1954.

THAITHUMYANON, P.; THISYAKORN, U.; DEEROJNAWONG, J.; INNIS, B., L. Dengue infection complicated by severe hemorrhage and vertical transmission in a parturient women. **Clin Infect Dis**, 18 (2):248-9, 1994.

TY HANG, V.; MINH NGUYET, N.; THE TRUNG, D.; TRICOU, V.; YOKSAN, S. ET AL. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue. Sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **PLoS Negl Trop Dis** 3(1):360, 2009.

UHL, J. R. AND COCKERILL F. R. III. The fluorescence resonance energy transfer system. In: D. H. PERSING; F. C. TENOVER; J. VERSALOVIC; Y. W. TANG; E. R. UNGER; D. A. RELMAN; and T. J. WHITE (ed.), **Molecular microbiology diagnostic principles and practice**, 295–306, 2004.

VAUGHN, D.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J Infect Dis**, 181:2±9, 2000.

VORNDAM, V.; NOGUEIRA, R.M.R.; TRENT, D.W. Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. **Arch Virol**, 136: 191-196, 1994.

WANG, W.K.; SUNG, T.L.; TSAI, Y.C.; KAO, C.L.; CHANG, S.M.; KING, C.C. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. **J Clin Microbiol.** 40(12):4472-8, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue, dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome in the context of the integrated management of childhood illness, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en, acesso em 23 mar. 2009.

WILLS, B.A.; ORAGUI, E.E.; STEPHENS, A.C.; DARAMOLA, O.A.; DUNG, N.M.; LOAN, H.T.; CHAU, N.V.; CHAMBERS, M.; STEPNIIEWSKA, K.; FARRAR, J.J.; LEVIN, M. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: Serial investigations in 167 Vietnamese children with dengue shock syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, 35: 277-85, 2002.

XU, H.; DI, B.; PAN, YU-XIAN; QIU, LI-WEN; WANG, YA-DI; HAO, W.; HE, LI-JUAN; YUEN, KWOK-YUNG; CHE, XIAO-YAN. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 44,(8), 2872-78, 2006.

YONG, Y.K.; THAYAN, R.; CHONG, H.T.; TAN, C.T.; SAKARAN, S.D. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. **Singapore Med J**, 48(7):662-668, 2007.

ZHANG, W.; CHIPMAN, P.R.; CORVER, J.; JOHNSON, P.R.; ZHANG, Y.; MUKHOPADHYAY, S.; BAKER, T.S.; STRAUSS, J.H.; ROSSMANN, M.G.; KUHN, R. J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, vol 10, n° 11, p. 907-912, 2003.