

CÉLIA LUIZA DE LIMA RODRIGUES

**Avaliação da coleta de sangue em papel de filtro para
diagnóstico molecular da dengue**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Célia Luiza de Lima

Avaliação da coleta de sangue em papel de filtro para diagnóstico molecular da dengue / Célia Luiza de Lima Rodrigues. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: José Eduardo Levi.

Descritores: 1.Dengue/diagnóstico 2.Coleta de amostras sanguíneas 3.Reação em cadeia da polimerase 4.Corantes fluorescentes

USP/FM/DBD-241/10

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela confiança, carinho, apoio financeiro e pelo esforço de vir visitar-me todos os meses.

Ao meu marido Mauro pelo companheirismo, e por ter me entendido nos momentos em que precisei me dedicar a este trabalho.

Aos meus irmãos Patrícia, Alexandre, Adriana pela compreensão das minhas faltas nas datas importantes da nossa família.

Às minhas sobrinhas Maria Luiza, Victoria e Valentina que me fizeram sentir o verdadeiro significado de AMOR INCONDICIONAL.

À minha segunda família aqui em São Paulo, meus sogros e cunhada, pelos almoços de domingo e marmitas da semana.

Ao meu orientador Dr. José Eduardo Levi, minha imensa gratidão pelos ensinamentos, por ter me aceitado como aluna, pela confiança, dedicação e excelente relacionamento entre nós.

Ao Dr Cláudio Pannuti, por ter aberto as portas da Virologia, pela ajuda e compreensão que muito contribuíram e estimularam a realização deste projeto.

A Patrícia e ao Exedito pela ajuda nos meus cálculos estatísticos, esse auxílio final foi de extrema importância para conclusão desse trabalho.

À Synara pelo apoio e ajuda durante os anos em que aqui estive meu muito obrigada por tudo que você me ensinou.

À minha amiga Jaila que sempre esteve ao meu lado me escutando, me ajudando a compreender e agir melhor diante dos percalços da vida.

Às minhas amigas Alessandra, Ana Carolina Mamana, Cristina Oliveira, pela amizade, convívio e pelo enriquecimento do meu dia-a-dia.

À Lucy por ter me ensinando tanto de virologia clássica, minha gratidão a você.

À Dra Vanda, Clarisse Machado por me proporcionarem a trabalhar em projetos com vocês.

Pelas minhas três amigas, Cristina Fink, Laura e Chyntia por terem proporcionado tantos momentos de alegria juntando-se a nós alunos no nosso corredor.

Pelos meus amigos Marcelo, Paulo, Rodrigo Merlin, pelo companherismo e conversas jogadas fora.

À todos os amigos e colegas do Instituto de Medicina Tropical da USP, por fazerem do nosso laboratório um ambiente de trabalho prazeroso.

À Dra. Celina Martelli (Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Medicina Tropical, Saúde Coletiva e Dermatologia) e sua equipe pelo fornecimento de dados e materiais.

Não é o mais forte da espécie que sobrevive, nem o mais inteligente: é o que melhor se adapta a mudança.

Charles Darwin

Normalização adotada

Esta dissertação de mestrado está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Fredi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Gráficos	
Resumo	
Summary	

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biologia Viral.....	1
1.2 Transmissão.....	2
1.3 Patogenia.....	3
1.4 Epidemiologia da dengue	4
1.5 Importância da dengue.....	7
2.DIAGNÓSTICO.....	10
2.1 Isolamento viral.....	11
2.2 Métodos Sorológicos.....	11
2.3 Técnicas Moleculares.....	14
3. ALTERNATIVA DE COLETA PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO.....	16
4.JUSTIFICATIVA.....	18
5.OBJETIVOS.....	19
6.CASUÍSTICA e MÉTODOS.....	20
6.1 Definição de caso	20
6.2 Amostragem.....	20
6.3 Coleta de sangue das amostras de campo.....	21
6.3.1 Coleta por punção digital.....	21
6.3.2 Coleta por punção venosa.....	21
6.4 Padronização da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo	22
6.4.1 Preparo dos controles do vírus da dengue.....	22
6.4.1.1 Extração do material genético dos controles do vírus da dengue.....	24
6.4.1.2 Tipagem dos controles do vírus da dengue.....	25
6.4.1.3 Transcrição reversa por técnica “ <i>in-house</i> ” dos controles do vírus da dengue.....	25
6.4.1.4 Reação de RT-PCR em formato multiplex dos controles do vírus da dengue.....	27
6.4.1.5 Quantificação dos controles do vírus da dengue.....	28
6.4.2 Preparo do Controle Interno.....	31
6.4.2.1 Cultura e isolamento do Controle Interno.....	31
6.4.2.2 Extração do material genético do Controle Interno.....	32
6.4.2.3 Transcrição reversa por técnica “ <i>in-house</i> ” do controle interno.....	33
6.4.2.4 Reação de RT-PCR convencional para o controle	33

interno.....	
6.4.2.4.1 Escolha dos <i>primers</i>	33
6.4.2.4.2 Protocolo da reação.....	34
6.4.3 Parâmetros para a padronização da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo.....	35
6.4.3.1 Seleção dos <i>primers</i>	36
6.4.3.2 Sistema de detecção SYBR Green	37
6.4.3.3 Adequação das características dos <i>primers</i> ao sistema de detecção SYBR Green.....	38
6.4.3.4 Reagentes e protocolo para a reação de Q-PCR em tempo real de um passo.....	38
6.4.3.5 Temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	40
6.4.3.6 Concentração final dos <i>primers</i>	40
6.4.3.7 Quantidade de <i>template</i>	40
6.4.3.8 Número de ciclos.....	40
6.4.4 Construção da curva padrão para a reação Q-PCR em tempo real de um passo.....	41
6.5 Aplicação da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo utilizando as amostras de campo.....	42
6.5.1 Extração das amostras.....	42
6.5.1.1 Punção venosa.....	42
6.5.1.2 Punção digital.....	43
6.5.2 Reação Q-PCR em Tempo Real de um passo utilizando as amostras de campo.....	44
6.6 Considerações éticas.....	44
6.7 Dados estatísticos.....	44
7.0 RESULTADOS.....	46
7.1 Resultado da padronização da reação de Q-PCR em tempo real de um passo.....	46
7.1.1 Seleção dos <i>primers</i>	46
7.1.2 Reagentes e protocolo para a reação de Q-PCR em tempo real de um passo.....	47
7.1.3 Curva da reação de Q-PCR em Tempo Real padronizada.....	49
7.2 Resultado da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo nas amostras de campo.....	50
7.2.1 Critérios de positividade para as amostras de campo.....	50
7.2.2 Adequação das amostras ao controle interno.....	51
7.2.3 Comparação das coletas de sangue por punção digital e por punção venosa quanto à positividade.....	52
7.2.4 Sorotipos da dengue nas amostras de campo.....	53
7.2.5 Comparação das coletas de sangue por punção digital e por punção venosa quanto às cargas virais	55
8. DISCUSSÃO.....	58
9. CONCLUSÃO.....	66
10. ANEXOS.....	67
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

BVDV	Vírus da diarreia bovina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	DNA complementar
CP	Controle positivo
CI	Intervalo de confiança
CMV	Citomegalovirus
CT	Cycle treshold
CN	Controle negativo
DENV	Dengue vírus
DENV-1	Dengue vírus 1
DENV-2	Dengue vírus 2
DENV-3	Dengue vírus 3
DENV-4	Dengue vírus 4
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DC	Dengue clássica
FHD	Febre Hemorrágica da dengue
DMIPP	Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DSS	Dengue shock syndrom
DTT	DI-ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay e outros
et al.	
FRET	Fluorescence Ressonance Energy Transfer
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
g	Gravidade
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IMT	Instituto de Medicina Tropical
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
KCl	Cloreto de potássio
L-15	Leibovitz-15
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MS	Ministério da Saúde
NC	Não-codificante
Nm	Nanômetros

NS1	non-structural 1
NS2a	non-structural 2 ^a
NS2b	non-structural 2b
NS3	non-structural 3
NS4a	non-structural 4 ^a
NS4b	non-structural 4b
NS5	non-structural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase chain reaction
PDN	Random primer
PFU	Unidade formadora de placa
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa Polymerase chain reaction
Q-PCR	Quantitative Polymerase chain reaction
RNA	Ácido ribonucléico
RNAsin	Inibidor de RNAses
SN	Sobrenadante
SCD	Síndrome do choque da dengue
SVS	Secretaria de Vigilância e Saúde
TAE	Tris-acetato EDTA
Taq Polimerase	Thermus aquaticus polimerase
T _m	Temperatura de melting
UFG	Universidade Federal de Goiás

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Ciclo de transmissão do vírus da dengue pelo *Aedes aegypti*.....3
- Figura 2- Sorotipos circulantes no Brasil por estado entre janeiro e novembro de 2007.....7
- Figura 3- Representação da coleta digital em papel FTA card classic.....21
- Figura 4- Efeito citopático do vírus da dengue 2 cultivados em cultura de células C6/36 do *Aedes albopictus*. A) Células não-infectadas. B) células infectadas com o vírus da dengue 2. Foto obtida no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical.....24
- Figura 5- Gel de agarose com as culturas dos quatro sorotipos da dengue. DENV 2 = dengue 2, 119pb; DENV 1= 482pb; DENV 3=290pb; DENV 4= 389pb.....28
- Figura 6- Curva de quantificação, com diluições seriadas, do sobrenadante de cultura do vírus da dengue 3.....29
- Figura 7- Efeito citopático do vírus da diarreia bovina em cultura de células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK). A) Células não-infectadas. B) células infectadas com o vírus BVDV. Foto obtida de cultura do BVDV no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical.....32
- Figura 8- Gel de agarose com a cultura de BVDV. cp = controle positivo; cn = controle negativo (água).....35
- Figura 9- Teste dos *primers* Pan dengue com as quatro culturas do vírus da dengue DENV 1 = Dengue 1, DENV 2 = dengue 2; DENV 3 = dengue 3; DENV 4 = dengue 4) para o tamanho do amplicon.....46
- Figura 10-. Reação de Q-PCR em tempo real para teste de especificidade do par de *primers* “Pan dengue”.....47

Figura 11. Curva de dissociação de controle do dengue 3 e 4 com uma T_m = 86°C e 85°C respectivamente.....49

Figura 12. Curva de dissociação de controle do dengue 1 e 2 com uma T_m = 81°C e 82°C respectivamente.....49

Figura 13- Curva padrão da reação Q-PCR em Tempo Real de um passo padronizada, com diluições seriadas do sobrenadante de cultura do vírus da dengue 3.....50

Figura 14- Gel de agarose com amostras que apresentaram uma Temperatura de melting (T_m) discrepante. A amostra de dengue 3 na concentração de 10^3 tem uma T_m de 77,4°C já a amostra 1041 apresenta uma T_m de 72°C na primeira banda e 83,8°C na segunda. A amostra 1037 apresenta uma T_m 86,1°C na primeira banda e 83,4°C na segunda.....51

Figura 15- Foto de gel de agarose utilizando produtos de amplificação da reação de PCR convencional para o vírus BVDV. cp=controle positivo e cn= controle negativo (água).....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na primeira fase da reação de RT PCR.....	26
Tabela 2- Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na segunda fase da reação de RT-PCR.....	27
Tabela 3- Quantificação dos controles de dengue com o Kit Real Art TM Dengue TM RT.....	30
Tabela 4- Seqüência de <i>primers</i> usados na reação de RT-PCR para o BVDV.....	33
Tabela 5- Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de RT PCR para o BVDV.....	34
Tabela 6- Seqüência dos <i>primers</i> usados na reação de real time-PCR para os vírus da dengue.....	36
Tabela 7- Concentrações e volumes dos reagentes descritas pelo fabricante Qiagen.....	39
Tabela 8- Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de Q-PCR em Tempo Real padronizada para o vírus da dengue.....	48
Tabela 9- Distribuição dos resultados obtidos para carga viral de indivíduos com suspeita de dengue segundo tipo de coleta. Goiânia (GO), 2007-2008.....	55
Tabela 10- Análise descritiva dos valores de log das cargas virais detectáveis de indivíduos com suspeita de dengue segundo tipo de coleta. Goiânia (GO), 2007-2008.....	56
Tabela 11- Estatística descritiva do log das cargas virais detectáveis de indivíduos com suspeita de dengue segundo tipo de punção e dias de sintomas. Goiânia(GO), 2007-2008.....	56

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Representação gráfica das amostras positivas e negativas para a coleta por punção venosa (plasma) e para a coleta por punção digital (FTAcad).....53

Gráfico 2- Representação gráfica das amostras positivas para a técnica de Q-PCR em Tempo Real e para a técnica de PCR multiplex.....54

Gráfico 3- Representação gráfica da tipagem dos vírus da dengue pela técnica de PCR multiplex para as amostras positivas pela técnica de Q-PCR em Tempo Real.....54

RESUMO

O diagnóstico rotineiro da dengue é realizado com amostra de sangue dos casos suspeitos. A coleta tradicional de sangue (por punção venosa) é um procedimento que dificulta a realização de exames e pesquisas por ser um procedimento invasivo que nem sempre é prático para crianças e bebês, requer pessoal especializado e necessita de um local para armazenamento da amostra sob refrigeração ou congelamento. O propósito deste estudo foi coletar amostras por punção digital com uma nova tecnologia (FTA Card) e compará-la com amostras coletadas por punção venosa, avaliando-as através de uma técnica molecular de PCR em tempo real. Sendo o PCR em Tempo Real a técnica molecular atualmente disponível de maior rapidez, sensibilidade e especificidade, padronizamos uma metodologia de passo único de PCR em Tempo Real com SYBR green baseando-se na região 3' não codificante do vírus e utilizando *primers* degenerados, capazes de detectar os quatro sorotipos de uma só vez. A avaliação das técnicas de coleta e amplificação foram feitas com amostras suspeitas de dengue, obtidas em Goiânia durante surto ocorrido no ano de 2008. O limite de detecção da reação padronizada no presente estudo foi de aproximadamente 100 cópias/ml e uma especificidade de 100%. Para tipagem das amostras positivas a técnica empregada foi o PCR multiplex.

Dentre as 89 amostras coletadas 60 (67%) foram positivas para àquelas coletadas por punção venosa e 14 (16%) para àquelas coletadas por punção digital. Dentre as 89 amostras para o PCR em Tempo Real, apenas 29 (32%), foram tipadas pelo método de PCR multiplex, sendo 3 casos do vírus da dengue 1 (10%), 16 casos do vírus da dengue 2 (55%), e 10 casos do vírus da dengue 3 (35%).

Descritores: Dengue/diagnóstico, coleta de amostras sanguíneas, reação em cadeia da polimerase, corantes fluorescentes.

SUMMARY

The collection by venipuncture is a procedure that is difficult to carry out in diagnosis and research because it is an invasive procedure that is not always practical for children and babies, requires specialized staff, needs a place to store the sample under refrigeration or frozen. This study aimed to collect samples by fingerstick puncture with a new technology named FTA card and compare it with samples collected by venipuncture, using a real-time PCR to evaluate if FTA card collection would have a similar performance to standard blood sampling. Towards that, we obtained viral load values in order to estimate the differences not only qualitatively (e.g. pos or neg) but also in numbers. We used an one-step SYBR Green I Real-Time PCR based on the region 3' noncoding virus using degenerate *primers* which was able to detect all four serotypes of dengue virus. Among the 89 samples collected 60 (67%) were positive for those collected by venipuncture and 14 (16%) to those collected by fingerstick, Only 29 (32%) were possible to be typed by PCR multiplex. Three cases were dengue virus 1 (10%), 16 cases were dengue virus 2 (55%) and 10 cases were dengue virus 3 (35%). The limit of detection obtained was approximately 100 copies / ml and a specificity of 100% was observed.

Keywords: Dengue / diagnosis, collection of blood samples, polymerase chain reaction, fluorescent dyes

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia Viral

O vírus da dengue é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, de formato esférico, medindo de 50-60 nm de diâmetro, envolto por um envelope lipídico e cujo material genético é composto por RNA de fita positiva (Figueiredo e Fonseca, 1997; Barth, 1999; Barth, 2000).

O genoma viral possui aproximadamente, 11.000 nucleotídeos organizados em uma única fase de leitura aberta que codifica apenas uma única poliproteína que posteriormente é clivada e forma três proteínas estruturais (capsídeo, C, proteína da membrana, M, glicoproteína envelope, E) e, sete não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, e NS5) (Deubel et al., 1993; Chang, 1997; Knipe et al., 2007).

Existem 4 sorotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 que têm entre si epítomos antigênicos diferentes e têm reações cruzadas de anticorpos com outros vírus da família, dificultando assim, o diagnóstico sorológico. Os quatro sorotipos podem causar a doença, entretanto, no Brasil todos os casos relatados excluem o sorotipo 4 (Holmes e Twiddy, 2003). Recentemente, descreveu-se a presença deste sorotipo no Brasil, em 2008, Figueiredo et al. isolaram-no em amostra de soro de 3 pacientes atendidos num centro de referência no Amazonas mas este achado foi refutado pelas autoridades brasileiras.

1.2 Transmissão

A dengue é transmitida ao homem principalmente, pela picada da fêmea dos mosquitos *Aedes aegypti*, ocorrendo também casos, menos freqüentes, pelo mosquito *Aedes albopictus* (Teixeira et al., 1999). Recentemente foram encontradas proteínas virais do vírus da dengue em glândulas salivares do *Aedes Polynesiensis* (Cao-Lormeau, 2009)

Uma vez que o indivíduo é picado por um mosquito infectado, o vírus alcança a corrente sanguínea e se replica nas células de linhagem mononucleares (macrófagos, monócitos e células B), havendo um período de incubação intrínseco que pode variar de 3 a 14 dias. Esse período é assintomático e precede os primeiros episódios de febre inerentes à doença (FUNASA, 1996; Bielefeldt-Ohmann et al., 2001).

A viremia, ou seja, o período no qual o vírus pode ser isolado do sangue é a fase em que o RNA viral pode ser detectado por técnicas de biologia molecular (Richman et al., 1997). Esse período tem uma duração de 5-15 dias.

A incubação extrínseca ocorre no mosquito e é o período em que o vírus se multiplica, por período de oito a doze dias e, a seguir, migra para as glândulas salivares. A partir de então, o vetor torna-se competente para transmitir a doença, até o final da vida, que é de seis a oito semanas para o *Aedes aegypti*. A figura 1 ilustra o ciclo de transmissão da dengue (MS, 1996).

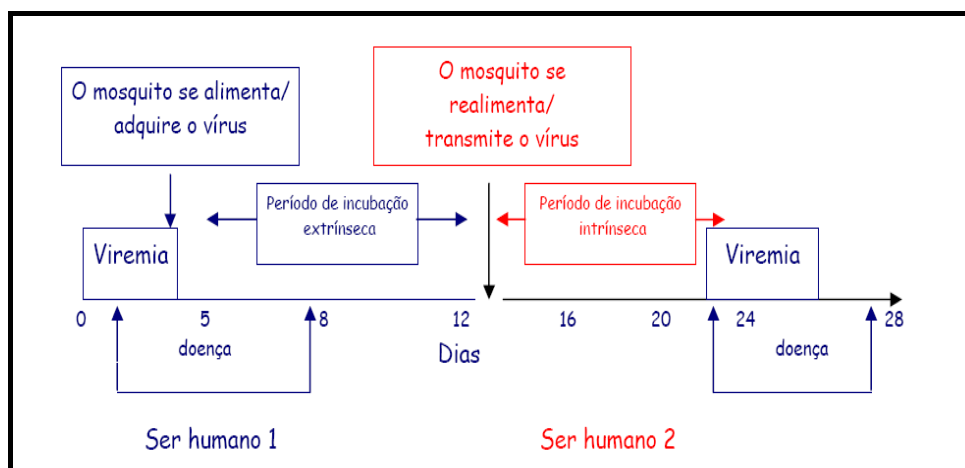


Figura 1. Ciclo de transmissão do vírus da dengue pelo *Aedes aegypti*

1.3 Patogenia

A dengue é uma doença febril aguda que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresente: Infecção inaparente, Dengue Clássico, Febre Hemorrágica da Dengue, ou Síndrome do Choque da Dengue (SCD).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 1997) define como dengue clássica ou febre dengue (DF), "doença febril aguda, com duração máxima de 7 dias, acompanhada por cefaléia e dores musculares e articulares" podendo também ocorrer pequenas manifestações hemorrágicas como petéquias e epistaxes.

A forma hemorrágica (FHD) apresenta sinais e sintomas semelhantes às da forma clássica somados a alguns "sinais de alerta" tais como: dor abdominal, hepatomegalia e sangramentos importantes.

Não há tratamento específico nem vacina disponível para a dengue. O tratamento é sintomático, consistindo em hidratação e emprego de antitérmicos. A recomendação é que não sejam utilizados medicamentos

contendo ácido acetilsalicílico, que podem aumentar o risco de sangramento. Nos casos mais graves, é importante a reposição de fluidos e eletrólitos, administração de plasma e concentrado de plaquetas (Romanos, 2002).

A co-circulação de vários sorotipos do vírus da dengue tem sido considerada fator de risco para o desenvolvimento da doença dengue (Halstead, 1997). Loroño-Pino et al. (1999) determinaram a frequência de infecções recorrentes onde havia circulação simultânea de sorotipos, e demonstrou que 5,5% dos pacientes em três epidemias tiveram infecções múltiplas.

Existem várias teorias que relacionam a introdução de um segundo sorotipo com o agravamento da doença (FHD ou choque). A teoria do “antibody enhancement” postula que a infecção natural por um dos 4 sorotipos do vírus dengue produz uma imunidade duradoura contra uma re-infecção pelo sorotipo específico, mas a proteção heterotípica é temporária e parcial. Estes anticorpos heterotípicos não neutralizam o vírus de outro sorotipo e ligam-se aos monócitos e macrófagos pela porção Fc da molécula de anticorpo, levando à exacerbação do quadro (Seema e Jain, 2005).

1.4 Epidemiologia da dengue

A dengue é, na atualidade, uma das maiores causas de morbimortalidade no mundo, aproximadamente 40% da população mundial encontra-se sob risco de contrair o vírus (Pinheiro e Corber, 1997; OMS, 2000). A OMS (2000) estimou que cerca de 50-100 milhões de pessoas se infectam anualmente.

A doença é endêmica em mais de 100 países na África, Mediterrâneo Oriental, Américas, sudeste Asiático, e oeste do Pacífico sendo estas três últimas regiões as mais afetadas. Antes de 1960 apenas nove países apresentaram experiência com epidemias de FHD, esse número aumentou quatro vezes desde 1995.

- **Dengue no Brasil**

Os casos de dengue notificados no Brasil representam cerca de 80% dos casos reportados nas Américas, este dado demonstra a magnitude da problemática no país (Schatzmayr, 2000).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2007) registrou no período de janeiro a novembro de 2007, 536.519 casos suspeitos de dengue, 1.275 casos confirmados de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e a ocorrência de 136 óbitos por FHD.

Em função da circulação de três sorotipos do vírus da dengue, o número de casos de FHD e a sua taxa de letalidade vêm aumentando no país. Em 2002, quando foi registrado o maior pico epidêmico da doença no Brasil, a taxa de letalidade foi de 5,5%. Em 2007, a taxa de letalidade foi aproximadamente duas vezes maior do que a anteriormente registrada (SVS/MS, 2007).

Em relação aos casos de FHD, na epidemia de 2007, os 82% dos casos concentraram-se nos Estados do Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão,

Pernambuco, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás e Piauí e 72% dos óbitos por FHD, também, ocorreram nesses estados.

O monitoramento da circulação viral demonstra que o sorotipo DENV3 é o predominante (79% das amostras isoladas) no país. Entretanto, observa-se, também, um percentual importante do sorotipo DENV2 (18%), sendo este predominante nos Estados de Alagoas, Ceará, Maranhão, Piauí, Amapá e Roraima.

De acordo com o número de casos de dengue notificados por região, o Centro-Oeste, entre janeiro e novembro de 2007 notificou 109.640 casos e confirmou 190 casos de Febre Hemorrágica da Dengue com 34 óbitos. O Município de Goiânia, Goiás, notificou 42% dos casos (6.145) de dengue sendo 7 óbitos. Os sorotipos identificados na região foram DENV1, DENV2 e DENV3.

A Região Norte registrou 46.012 casos de dengue e confirmou 140 casos de FHD, com 14 óbitos. A Região Nordeste registrou 26% do total de casos notificados no país no mesmo período (140.075 casos). Os sorotipos identificados nestas duas regiões foram DENV2 e DENV3. Já a região Sul notificou 50.656 casos de dengue e o Estado do Paraná confirmou nove casos de FHD, com cinco óbitos sendo o sorotipo DENV3 o único identificado no monitoramento viral nessa região conforme demonstra a Figura 2.

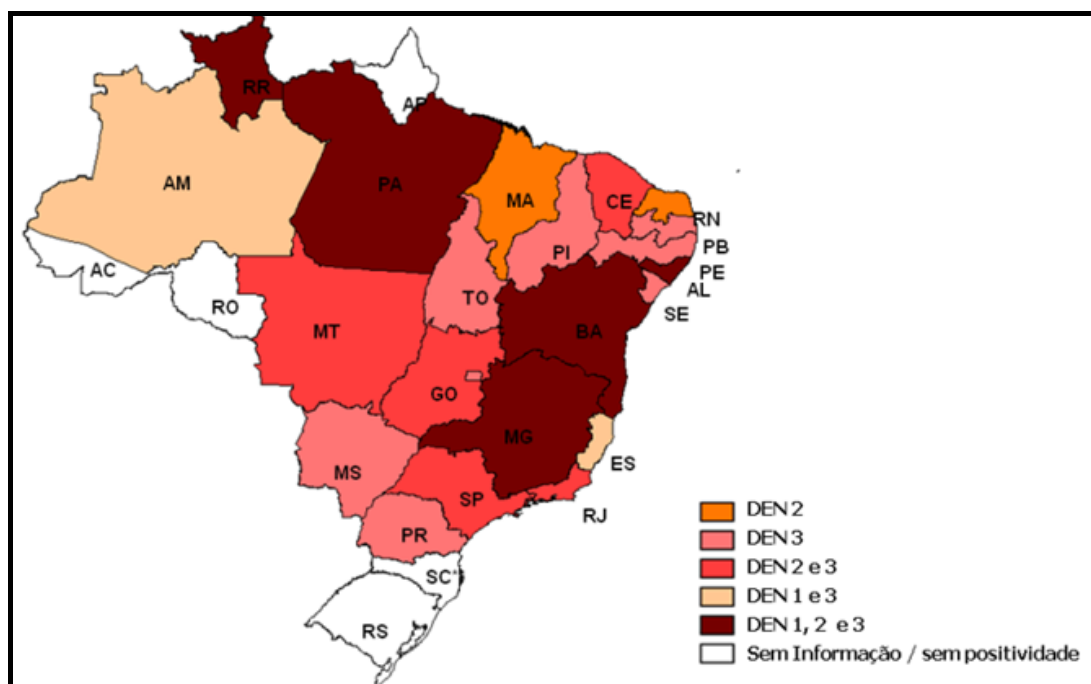


Figura 2. Sorotipos circulantes no Brasil por estado entre janeiro e novembro de 2007. FONTE: LRN/LRR/LRE

Em 2010 até, a semana 7 foram notificados 155.771 casos de dengue. A distribuição dos casos notificados de acordo com as regiões do país é a seguinte: Centro-Oeste com 77.805 (50%), Sudeste com 38.971 (25%), Norte com 29.207 casos (18,7%), Nordeste com 6.765 casos (4,3%) e Sul com 3.023 casos (2%). Neste ano, está havendo a recirculação do sorotipo 1 (SVS/MS, 2010) em paralelo a surtos localizados causados pelos sorotipos 2 e 3.

1.5 Importância da dengue

A dengue tem se tornado o maior problema de saúde pública, com significativo impacto econômico, político e social (Gubler e Meltzer, 1999). O aumento da população humana, urbanização descontrolada e viagens

internacionais podem explicar a distribuição e persistência do vírus da dengue nos séculos XX e início do século XXI.

O *Aedes aegypti* apresenta facilidade de emergir em centros urbanos, e é o principal vetor da dengue na atualidade. Muitos esforços de combate à dengue precisam estar focados no controle dessa espécie. O controle do mosquito é, particularmente, importante uma vez que, vacinas ou tratamentos específicos para a doença ainda não estão disponíveis.

Diversas políticas públicas têm tentado diminuir ou até mesmo erradicar os casos de dengue em todo o mundo. Um dos exemplos de programas de controles eficazes foi os adotados em Singapura e Cuba. A FHD foi inicialmente reportada em Singapura nos anos de 1960, e iniciou-se em 1968 o programa controle vetorial, o qual conseguiu reduzir de 50% para 2% o número de casos da doença desde 1978 até a atualidade. Em Cuba a doença foi erradicada por 16 anos re-emergindo no país no ano de 1981, quando aconteceu a grande epidemia de FHD (Tauil, 2001; Reiter, 1998).

No Brasil, O Ministério da Saúde lançou a Campanha Nacional de Combate à Dengue 2009/2010. Com o mote “Brasil Unido contra a Dengue”. O principal enfoque da campanha é o estoque estratégico de medicamentos tais como o paracetamol (gotas e comprimidos), soro fisiológico injetável, sais de reidratação e uso de inseticidas para combater a doença (Teixeira e Medronho, 2008).

A cada campanha gastam-se milhões de reais na tentativa de erradicar a doença através do controle do mosquito e treinamento e

capacitação dos profissionais da saúde. Entretanto, faz-se necessário, também, ações que sensibilizem a comunidade a aderir o combate ao vetor através da redução do número de criadouros. É fundamental que a comunidade reconheça a sua responsabilidade no controle da dengue (Teixeira e Medronho, 2008).

2. DIAGNÓSTICO

Uma das dificuldades no diagnóstico é que a dengue pode ser confundida com outras doenças febris, uma vez que esses sintomas descritos pela OMS nem sempre aparecem em todos os indivíduos consultados, principalmente nas crianças.

Para reduzir possibilidades de erros durante o manejo dos pacientes, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar características clínicas que definam bem a dengue em adultos e crianças.

Chadwick et al. (2006) descreveram 36 características clínicas e laboratoriais da dengue e de outras doenças febris em adultos de Singapura e associaram o exantema e petéquias bem como a leucopenia à dengue. Nunes et al. (2003) obtiveram os mesmos achados.

Sendo a dengue de difícil diferenciação é necessário que haja uma inter-relação entre a clínica e o diagnóstico laboratorial. Muitos estudos têm vinculado os aspectos clínicos aos achados laboratoriais para assim, classificar a dengue (Kalayanarooj et al., 1997).

Entretanto, é preciso que os laboratórios disponham de técnicas de rápida resolução dos casos suspeitos de dengue, facilitando assim, o manejo e tratamento precoce dos pacientes.

A detecção da infecção pode ser feita pelo isolamento viral, por detecção de anticorpos específicos da fase pós-virêmica ou ainda por detecção de antígenos ou RNA virais em soro ou tecidos (necropsias), uma

abordagem molecular mais recente. Cada teste possui suas limitações e alguns se encontram mais adaptados à rotina laboratorial de diagnóstico (De Paula e Lopes da Fonseca, 2002).

2.1 Isolamento viral

O isolamento do vírus é amplamente utilizado como padrão para o diagnóstico de infecção de dengue. A técnica utiliza cultura de células de linhagem derivada do *Aedes albopictus* (células C6/36) e, a detecção viral é feita através da imunofluorescência indireta (FUNASA, 2002). Entretanto, o efeito citopático leva aproximadamente de 15 a 30 dias para ser visualizado (Guzmán e Kouri, 2001).

Sendo assim, essa técnica apresenta um período de detecção viral limitado uma vez que, quando os níveis de anticorpos aumentam, interferem no isolamento viral diminuindo então a sensibilidade, além de ser bastante trabalhoso e requerer tempo para o crescimento da cultura (Yong et al., 2007).

2.2 Métodos Sorológicos

O diagnóstico sorológico depende da presença do anticorpo M (IgM) ou, menos freqüentemente, do aumento dos títulos do anticorpo G (IgG) em amostras consecutivas coletadas durante a fase aguda e convalescente da doença.

Na dengue primária os anticorpos IgM são detectáveis durante a fase aguda da doença, e 90% dos pacientes são IgM positivos cerca de cinco

dias após o aparecimento dos sintomas. Estes anticorpos mantêm-se detectáveis por aproximadamente 2 a 3 meses depois do início dos sintomas.

Na infecção secundária, o anticorpo IgG já está geralmente presente nas amostras e o título cresce rapidamente em poucos dias. Este tipo de anticorpo pode ser detectado pela inibição de hemaglutinação ou por **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)** (Rigau-Pérez, 1997).

O diagnóstico rotineiro de dengue no setor público, no Brasil, é atualmente realizado através de teste de captura de IgM (FUNASA, 2002) específicos no soro, plasma (Endy et al., 2002; Ahmed et al., 2008) ou outros fluidos corporais como a saliva (Cuzzubbo et al., 1998).

Entretanto, trata-se de um diagnóstico *a posteriori*, uma vez que se recomenda a coleta da amostra para realização do exame em 7 dias após o início dos sintomas, apresentando então uma alta sensibilidade somente após esse período de tempo. Embora de alta especificidade, este teste, obviamente não permite um manejo clínico direcionado, e também acaba sendo desinteressante ao paciente, já que é necessário seu retorno ao sistema de saúde, após a fase de morbidade, para a confirmação do diagnóstico.

Desta forma, um teste que seja realizado na fase sintomática, com rapidez que permita uma intervenção adequada, e sobreaviso quanto ao prognóstico de dengue, é altamente desejável.

Atualmente, uma alternativa de testes sorológicos é o de detecção do antígeno NS1 do vírus da dengue. Este teste oferece um diagnóstico mais recente da infecção se comparado ao método sorológico convencional.

A proteína não-estrutural NS1 é a mais recentemente estudada e é uma das ferramentas alvo de testes sorológicos, pois, sabe-se que ela é expressa na superfície das células infectadas e têm sido também associada com a severidade da doença (Young et al., 2000).

Estudos sugerem que essa proteína está relacionada com a replicação viral. Os níveis plasmáticos de NS1 secretado estão correlacionados com os títulos virais, sendo altos em paciente com Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) comparado com àqueles com dengue clássica (DC). Além disso, elevados níveis de NS1 com até 72 horas do início dos sintomas identificam pacientes sob risco de desenvolver a FHD (Young et al., 2000).

Recentemente, dois kits comerciais ELISA kits PLATELIA™ Dengue NS1 AG (BIO-RAD Marnes-la-Coquette, France) e Dengue Early ELISA (Panbio, Brisbane, Austrália) e um teste rápido de imunocromatografia (Dengue NS1 AG Strip, BIO-RAD), estão disponíveis como nova metodologia de diagnóstico para detecção do antígeno NS1 da dengue.

Ramirez et al. (2009), compararam a performance desses dois kits de ELISA como também do teste imunocromatográfico para detecção do antígeno NS1 da dengue utilizando um painel de 87 soros de pacientes virêmicos para dengue e 36 soros de pacientes com outra doença febril aguda. O Kit PLATELIA™ foi mais sensível e um pouco menos específico do que o kit Dengue Early ELISA (sensibilidade de 71.3% contra 60.9% de

especificidade, 86.1% versus 94.3%, respectivamente). O teste rápido apresentou uma sensibilidade de 67.8% e especificidade de 94.4%.

2.3 Técnicas Moleculares

As técnicas moleculares baseiam-se na detecção do RNA viral, durante a fase virêmica. Essas técnicas são capazes de detectar até mesmo, poucas cópias virais, seja por viremia baixa ou por má qualidade da amostra, por inadequação de estocagem ou transporte (De Paula e Lopes da Fonseca, 2002; Da Fonseca e Fonseca, 2002). Muitas pesquisas realizadas indicam que a combinação de ambos os testes IgM (ELISA) + PCR (reação de polimerase em cadeia) conduz ao diagnóstico correto em aproximadamente 100% dos casos (de Oliveira et al., 2005).

Já foram descritos diversos protocolos da reação de PCR para a detecção do vírus da dengue, que variam entre si quanto aos métodos de extração de RNA, localização genômica dos *primers*, especificidade, sensibilidade, forma de detectar produtos do PCR e determinação dos sorotipos.

Com a evolução dos testes moleculares e aparelhos de PCR para o formato de detecção em Tempo Real, naturalmente está havendo uma migração dos métodos diagnósticos para esta plataforma, o que vem ocorrendo também para a dengue.

Dentro da plataforma PCR em Tempo Real existem diferentes sistemas de detecção (SYBR Green, ensaios TaqMan, dentre outros), todos com o

objetivo de melhorar a sensibilidade, especificidade, rapidez, minimizar a possibilidade de contaminação, e menor manipulação.

Lai et al. (2007), utilizaram o PCR em Tempo Real (SYBR Green) e em seus resultados, obtiveram uma sensibilidade de aproximadamente 10 PFU/ml para os quatro sorotipos.

Yong et al. (2007) também utilizaram o PCR em Tempo Real (SYBR Green) e o PCR multiplex para comparar a sensibilidade dos dois testes, obtendo como resultado uma positividade de 178 amostras no PCR em Tempo Real versus 134 amostras no PCR multiplex, dentre as 306 amostras de soro agudo positivo para o RNA do vírus da dengue pela técnica de isolamento.

Como há uma suspeita que haja uma correlação direta entre a carga viral e a gravidade da doença (Sudiro et al., 2001), padronizamos uma técnica que fosse ao mesmo tempo qualitativa e quantitativa para o vírus da dengue.

Diferentes formas quantitativas têm sido citadas na literatura, as unidades formadoras de placas (PFU) são as mais utilizadas. Lai et al. (2007), quantificaram suas amostras por PFU conforme acima citado. Entretanto, a técnica de PFU é bastante trabalhosa e requer um longo período de tempo para obtenção dos resultados.

Uma alternativa existente é a quantificação por kits comerciais. Levi et al. (2007) utilizaram o kit comercial (RealArt; artus/QIAGEN, Germany) para quantificação de suas amostras e concluíram que o mesmo apresenta uma

alta sensibilidade analítica até mesmo para amostra com cargas virais baixas além, de ser reprodutível nas suas quantificações.

Outra maneira de quantificação é por curvas padrões obtidas através de um controle (provindo de isolamento viral ou de um plasmídeo) anteriormente quantificado. Diversos trabalhos estão disponíveis na literatura com esta opção de quantificação (De Araújo et al., 2009).

3. ALTERNATIVA DE COLETA PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SOROLÓGICO

Soro, tecidos de casos fatais, pool de mosquitos, cultura de células infectadas, larva de mosquito, têm sido utilizados como amostras para detecção do vírus da dengue (Guzmán e Kouri, 2002).

A coleta de sangue por punção intravenosa é um procedimento invasivo o qual nem sempre é prático para crianças e bebês, requer pessoal especializado, necessita de um local para armazenamento da amostra, bem como dificulta as pesquisas uma vez que muitos participantes se negam a fazer a coleta por essa via.

Hansen et al. (2007) compararam quantas amostras de cada espécime biológica conseguiu ser coletada durante um estudo de coorte. As amostras requisitadas foram de sangue, saliva e células da mucosa oral. Os dados mostraram que apenas 31% dos participantes requisitados aceitaram fazer a coleta de sangue por punção intravenosa, enquanto que 72% entregaram amostras de saliva, 80% entregaram amostras de células bucais via swab, e 76% via FTA card.

Sendo assim, coletas menos invasivas e mais baratas são necessárias. Diversos estudos têm mostrado que a coleta de células bucais é uma alternativa promissora para obtenção de DNA para estudos genéticos.

A tecnologia Whatman FTA Card consiste de papéis de filtro quimicamente tratados destinada à coleta, transporte, armazenagem e extração de ácidos nucleicos e são utilizados para diminuir o desconforto da coleta por punção venosa e nele podem ser aplicadas diferentes amostras biológicas como saliva, e sangue total. A tecnologia FTA previne a degradação do DNA genômico à temperatura ambiente, podendo ser utilizada principalmente em lugares onde não há uma infra-estrutura laboratorial a exemplo de freezers -70°C , centrífugas e geladeiras.

O uso do sangue total coletado diretamente no papel de filtro tem o potencial de facilitar estudos de campo, e todos os aspectos no processo de coleta (punção digital, pequeno volume de sangue) e armazenamento (temperatura ambiente) de amostras.

A tecnologia do papel tem sido usada para detecção de anticorpos virais de hepatite C, citomegalovirus (CMV), HIV-1 (Cassol et al., 1992) e outros como Chagas e teste do pezinho. Esse tipo de coleta também tem sido usado para detecção de anticorpos anti-dengue de classe IgM e IgG (Vázquez et al., 1998; Matheus et al., 2007).

4. JUSTIFICATIVA

Sabendo que os testes sorológicos, disponíveis pelo Sistema Público de Saúde para o diagnóstico da dengue apresentam desvantagens intrínsecas como anteriormente discutido, é necessário o desenvolvimento de um teste molecular que detecte o vírus da dengue nas fases iniciais da doença promovendo um diagnóstico ainda na fase virêmica.

A coleta de sangue por punção venosa é um procedimento que dificulta a realização de exames em muitas áreas do país, onde não há uma infra-estrutura laboratorial adequada. Deste modo, a coleta de sangue por punção digital é uma alternativa atraente para estas condições.

Sendo assim, o presente estudo utilizou amostras coletadas por punção digital em papel de filtro cujo diagnóstico foi realizado por técnica molecular.

O estudo busca comparar a detecção do vírus da dengue por método de PCR em Tempo Real em amostras pareadas coletadas por punção venosa e digital em papel FTA card.

5.OBJETIVOS

Primário

O presente estudo tem como objetivo principal padronizar uma técnica molecular (PCR em Tempo Real) capaz de detectar o vírus da dengue nas fases iniciais da doença, que permita a avaliação da coleta de sangue por punção digital utilizando papel de filtro.

Secundários

- Validar a técnica padronizada com as amostras obtidas durante surto epidêmico de dengue em Goiânia-GO nos anos de 2007 e 2008.
- Comparar as coletas de sangue por punção digital e por punção venosa quanto à positividade e quanto à carga viral.
- Determinar os sorotipos, pela técnica de PCR multiplex, nas amostras coletadas por punção venosa.

6. CASUÍSTICA e MÉTODOS

6.1 Definição de caso

Definiu-se como caso suspeito de dengue todo indivíduo que apresentasse febre alta (39° a 40°C) e um dos sintomas clínicos tais como: cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retroorbital, náuseas, vômitos, exantema e prurido cutâneo, a critério médico.

6.2 Amostragem

Foram convidados a participar do estudo 89 indivíduos que preencheram os critérios para casos suspeitos de dengue, residentes na cidade de Goiânia-GO e que receberam atendimento no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad ou no Centro de Atenção Integrada a Saúde Nova Era pela equipe liderada pela Profa. Dra. Celina Martelli (Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Medicina Tropical, Saúde Coletiva e Dermatologia) nossa colaboradora neste e em outros estudos de dengue, no período de Maio a Junho de 2008. A idade média dos participantes foi de 36 anos \pm 33, a mediana de 32, o mais novo tinha 14 anos e o mais idoso 72 anos. Quarenta e oito homens (56%) e 41 mulheres (44%) compuseram o grupo de participantes.

6.3 Coleta de sangue das amostras de campo

6.3.1 Coleta por punção digital

Os dois postos de coleta foram o Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad e o Centro de Atenção Integrada a Saúde Nova Era onde os técnicos realizaram a coleta de sangue em 89 indivíduos, por punção digital em papel Whatman FTA Card (Bioamerica Inc., EUA) e por punção venosa.

Para a coleta por punção digital os mesmos foram inicialmente identificados com o nome do indivíduo. Posteriormente, fez-se assepsia com álcool 70% no dedo médio de uma das mãos, em seguida, a polpa digital foi puncionada firmemente com lanceta estéril com ponta perfurante. Aplicou-se a gota de sangue em uma das faces do papel até preencher completamente o círculo impresso no papel.

O material foi seco à temperatura ambiente por 3 horas e, mantidos em geladeira (2°C a 5°C) até o posterior envio ao laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical- IMT para ser processado.

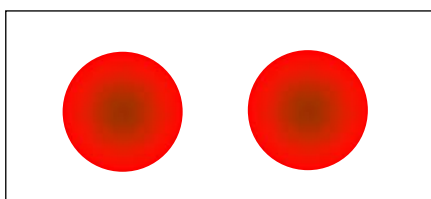


Figura 3. Representação da coleta digital em papel FTA card classic

6.3.2 Coleta por punção venosa

Para a coleta por punção venosa foram utilizados tubos PPT (BD, Brasil) com gel separador e anticoagulante EDTA, que foram enviados ao

Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad e ao Centro de Atenção Integrada a Saúde Nova Era onde os técnicos realizaram a coleta.

Inicialmente, os tubos foram identificados e, em seguida, foi realizada a assepsia do braço de cada indivíduo com álcool 70% para a coleta por punção venosa a vácuo. Para cada indivíduo foram coletados 10ml de sangue.

Após a coleta o material foi centrifugado a 2100 X g por 15 minutos para a separação do plasma e mantidos a -70°C e posterior envio ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical- IMT para ser processado.

6.4 Padronização da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo

6.4.1 Preparo dos controles do vírus da dengue

Para iniciar a padronização da técnica de Q-PCR em Tempo Real utilizamos cepas dos quatro sorotipos, cedidas pelo Instituto Evandro Chagas – PA.

As cepas foram isoladas em células C6/36 (linhagem contínua proveniente do mosquito *Aedes albopictus*) e cultivadas em garrafas (Corning Incorporated Corning, NY, USA) contendo o meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) (Cultilab, Campinas, Brasil) que foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, Brasil) e com antibióticos como: penicilina 100U/ml, estreptomicina 100 µg/ml e anfotericina B 2µg/ml e aminoácidos essenciais.

O crescimento celular foi observado, diariamente, pela formação de monocamadas. Após as monocamadas estarem contínuas (confluência maior que 90%), desprezou-se o meio de cultura.

A inoculação das cepas virais às células foi feita adicionando-se 200µl de cada um dos quatro sorotipos do vírus da dengue, separadamente, e em seguida as células foram mantidas em estufa a 20°C por uma hora (período de adsorção). Após este período, adicionou-se um novo meio L15 suplementado com soro bovino fetal a 2%. O material voltou para a estufa a 28°C e depois de 24 horas observou-se, diariamente, o efeito citopático em microscópio de fase invertida.

O efeito citopático ocorreu, em média, a partir do sétimo dia pós-inoculação, e caracterizou-se pela formação típica de sincícios e destruição do “tapete” celular (figura 4).

A suspensão (vírus e célula) foi aliquoteada e armazenada à – 70°C. Desse modo, o material passou a ser utilizado como controle positivo durante a padronização da técnica.

Todo o procedimento foi realizado em condições adequadas de assepsia em capela de fluxo laminar.

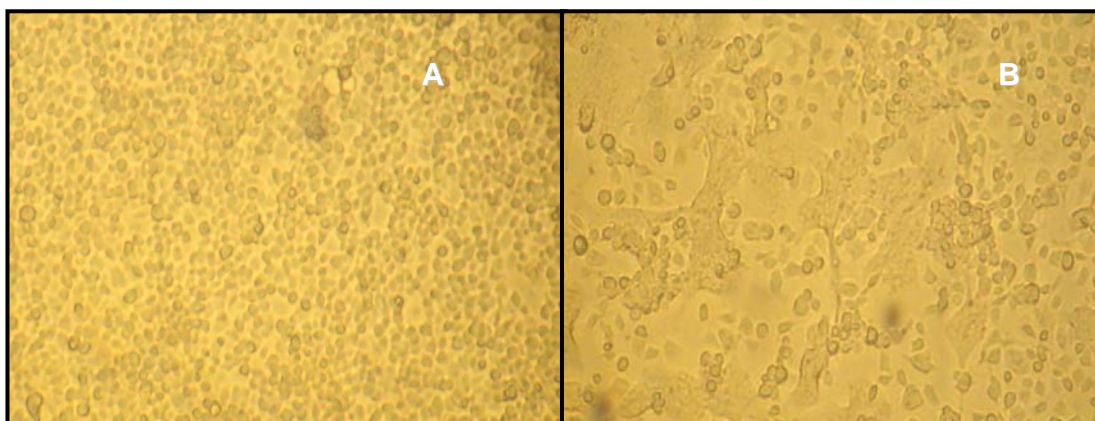


Figura 4. Efeito citopático do vírus da dengue 2 cultivados em cultura de células C6/36 do *Aedes albopictus*. A) Células não-infectadas. B) células infectadas com o vírus da dengue 2. Foto obtida no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical

6.4.1.1 Extração do material genético dos controles do vírus da dengue

Para padronizarmos a técnica de Q-PCR em Tempo Real foi preciso inicialmente extrair o RNA do sobrenadante das culturas dos quatro controles positivos (DENV 1-4), para quantificação.

Assim, para a extração dos controles, o material estocado à -70°C foi descongelado e extraído os RNAs utilizando-se o kit QIAamp Viral RNA Qiagen (QIAGEN Inc.,Valencia, CA, USA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, abaixo reproduzido:

1- Pipetar 560 µl do buffer AVL contendo o “Carrier RNA” em tubos de microcentrífuga, adicionar 140 µl da amostra ao tubo contendo o AVL.

2- Agitar por 15 segundos e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

3- Após o período de incubação, centrifugar rapidamente (spin) os tubos, adicionar 560 µl de etanol (100%) e agitar por 15 segundos.

4- Aplicar 630 µl da solução na coluna “QIAamp spin” e centrifugar a 6000 x g por 1 minuto.

5- Colocar a coluna em tubos limpos e descartar o tubo contendo o filtrado.

6- Repetir o passo anterior, e após, adicionar à coluna 500 µl do buffer AW1, centrifugar a 6000 x g (8000rpm) por 1 minuto.

7- Colocar a coluna em um novo tubo e descartar o filtrado. Adicionar 500 µl do buffer AW2 e centrifugar a 20.000 x g (14.000 rpm) por 3 minutos.

8- Colocar a coluna em outro tubo, descartar o antigo contendo o filtrado e adicionar 60 µl do buffer AVE em temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.

9- Descartar a coluna e armazenar o filtrado à -70°C para posterior manuseio.

6.4.1.2 Tipagem dos controles do vírus da dengue

Para confirmação dos sorotipos do vírus da dengue, crescidos em culturas, foi realizada uma reação de formato RT-PCR multiplex. Precedeu-se à reação de PCR, a etapa de transcrição reversa (RT-PCR) conforme descrito por Levi et al., 2007.

6.4.1.3 Transcrição reversa por técnica “in-house” dos controles do vírus da dengue

A técnica “in-house” de transcrição reversa (RT-PCR), utilizou *random primers* (hexâmeros N₆) (Invitrogen, Inc., EUA) e a enzima transcriptase

reversa de M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Na primeira fase da reação de RT-PCR, procede-se a linearização do RNA, ajustando-se, no termociclador, a temperatura para 65° C durante 5 minutos, e utilizando-se o tampão, os desoxinucleotídeos fosfatados (dNTPs), o cloreto de magnésio (MgCl₂), “RNAsin” (inibidor de RNAses), DTT , e o RNA extraído nas concentrações e volumes mostrados na tabela 1(mix I).

Posteriormente, e em uma segunda etapa da reação, o termociclador foi ajustado para 22° C durante 10 minutos, e foi acrescentado ao mix I o mix II que continha a enzima M-MLV, água DEPC e os *random primers*, nas concentrações indicadas na Tabela 2.

Finalmente, para a síntese do DNA complementar (cDNA), o termociclador seguiu um programa de 30 minutos a 37° C e por último, para inativação da enzima, 95° C durante 5 minutos.

Tabela 1- Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na primeira fase da reação de RT-PCR

Reagente	Volume/tubo (μ l)	Concentração final
Tampão 10X	4	1,0 X
dNTP's (2,5Mm)	3,2	0,2 Mm
MgCl ₂ 50mM	4	5,0 mM
DTT 0,1M	0,4	10 μ M
“RNAsin” (40U/ μ L)	1	40 U
Volume Final	12,6	
RNA	22	

Tabela 2- Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na segunda fase da reação de RT-PCR

Reagente	Volume/tubo (μ l)	Concentração final
Água DEPC	3	
PDN (6) 50 μ M	2	2,5 μ M
M-MLV 200U/ μ L	0,5	2,5 U/ μ L
Volume final	5,5	

6.4.1.4 Reação de RT-PCR em formato multiplex dos controles do vírus da dengue

A reação de RT-PCR multiplex consiste em: 50mM KCl; 10mM Tris (pH=8,5); 0,1% Triton X-100; 0,2mM dNTP'S; 1,5mM MgCl₂; 0,5 μ M *primers* D1 e TS1, 0,25 μ M *primers* TS2, TS3 e DEN4; 0,15U/ μ l *Taq* DNA Polymerase (GIBCO BRL[®]) e 5,0 μ l de cDNA, para uma reação de 25 μ l, com incubação inicial à 94°C por 2 min., seguido de 40 ciclos de 94°C - 45 seg.; 65°C - 1min.; 72°C - 1min. e extensão final à 72°C por 7 min.

Para revelação dos produtos de amplificação os controles positivos dos quatro sorotipos da dengue foram aplicados em gel de agarose 2% diluído em TAE (Tris-acetato EDTA) contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídio que em seguida foi submetido a corrente de 65 amperes para eletroforese. Após a eletroforese, os produtos de amplificação resultantes, foram visualizados e tipados de acordo com o peso molecular específico para cada sorotipo (Figura 5).

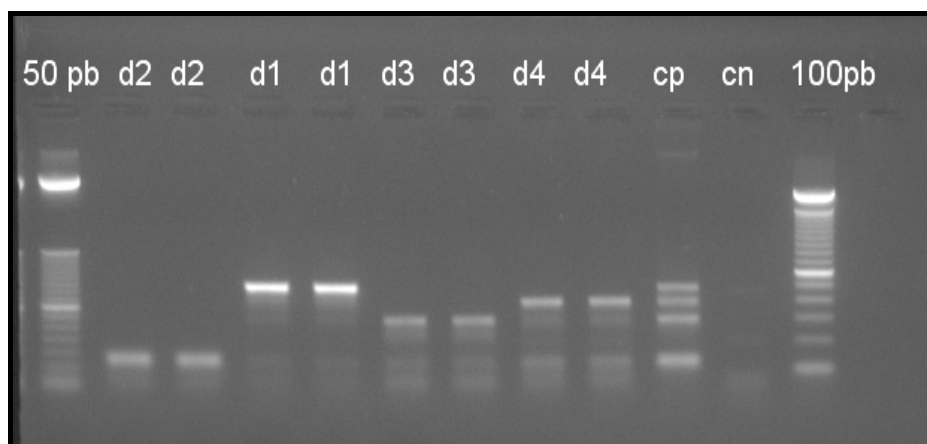


Figura 5. Gel de agarose com as culturas de dengue. DENV 2 = dengue 2, 119pb; DENV 1= 482pb; DENV 3=290pb; DENV 4= 389pb,cp= controle positivo, cn= controle negativo (água)

6.4.1.5 Quantificação dos controles do vírus da dengue

Para padronizarmos a técnica de Q-PCR em Tempo Real era preciso quantificar inicialmente os controles uma vez que, posteriormente utilizaríamos o controle quantificado para realização de curva padrão a cada reação.

Com o RNA dos controles dos quatro sorotipos foi feita a quantificação dos sobrenadantes de cultura utilizando o Real ArtTM Dengue TM RT-PCR Kit (QIAGEN Inc.,Valencia, CA, USA) que é constituído de um sistema pronto para detecção e quantificação do RNA viral do dengue usando uma reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real.

Este método consiste de uma reação de PCR de um passo e é capaz de detectar e quantificar os quatro sorotipos do vírus da dengue num único ensaio TaqMan, utilizando a 6-carboxifluoresceína como o fluoróforo

“reporter”. Um controle interno é adicionado à amostra antes da extração. Esta molécula serve como alvo para amplificação em um ensaio paralelo com um fluoróforo diferente (VIC) que permite a identificação de falhas na extração e identificação de possíveis inibidores de PCR.

A carga viral do vírus da dengue é obtida inserindo o valor do ciclo de amplificação (CT) numa curva padrão (figura 6) gerada com um RNA padrão externo do vírus da dengue também existente no kit. Esta curva é gerada em cada reação e, a quantificação padrão é definida por cópias/ μl e a equação a seguir precisa ser aplicada para converter os valores determinados em cópias/ml.

Resultado (cópias/ml) = resultado do CT (cópias/ μl) x volume de eluição (μl) / volume da amostra (ml).

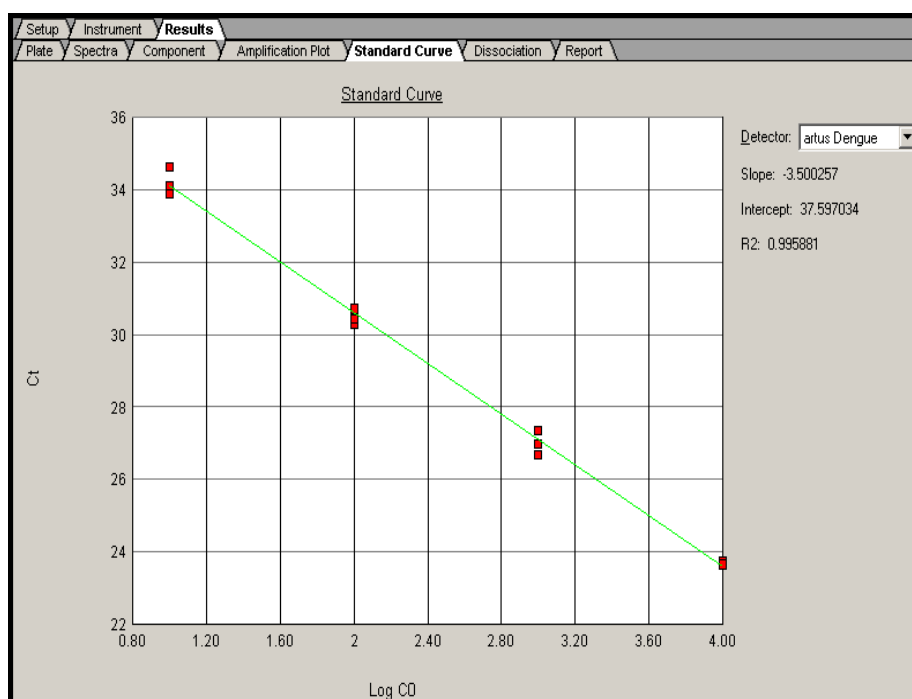


Figura 6. Curva de quantificação, com diluições seriadas, do sobrenadante de cultura do vírus da dengue 3

Baseados nestes cálculos a quantificação dos quatro controles da dengue submetidos a esta reação está demonstrada na tabela 3.

Tabela 3- Quantificação dos controles de dengue com o Real Art™ Dengue TM RT-PCR Kit (QIAGEN Inc.,Valencia, CA, USA)

Nome da amostra	CT	Quantidade média	Cópias/ml
DENV1	25.37	2662.94	1.141.286
DENV 1	25.59	2662.94	
DENV 1	25.91	2662.94	
DENV 2	22.34	18084.42	7.750.286
DENV 2	22.92	18084.42	
DENV 2	22.91	18084.42	
DENV 3	21.98	38183.58	16.364.143
DENV 3	21.69	38183.58	
DENV 3	21.13	38183.58	
DENV 4	28.99	263.93	113.143
DENV 4	28.95	263.93	
DENV 4	29.48	263.93	

Verificando-se que o controle do vírus da dengue 3 apresentava a maior carga viral passamos então a utilizá-lo, pelo maior rendimento, como o controle para a padronização da técnica de Q-PCR em Tempo Real.

6.4.2 Preparo do Controle Interno

É uma boa prática laboratorial incluir um controle interno em toda reação de diagnóstico molecular. Para tal finalidade foi utilizando também um *Flavivirus*, o vírus da diarreia bovina viral (BVDV) (Rice, 1996). Este vírus guarda características físico-químicas semelhantes ao da dengue, configurando-se, portanto, um controle quase ideal dos processos de extração, retro-transcrição e amplificação (Yoo et al., 2006).

Estoques de sobrenadante de células infectadas com o BVDV que apresentava o efeito citopático característico foram gentilmente cedidas pela Dra. Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito (Laboratório de Virologia Animal, no Setor de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia (DMIPP) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás UFG).

6.4.2.1 Cultura e isolamento do Controle Interno

A célula hospedeira recomendada Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz.

A inoculação do vírus às células foi feita adicionando-se, 1ml do sobrenadante da cultura contendo BVDV e manteve-as em estufa a 20°C por uma hora (período de adsorção). Após o tempo de estufa adicionou-se um novo meio L15 suplementado com soro bovino fetal a 2%. O material voltou para a estufa e depois de 24 horas fizeram-se observações diárias em microscópio de fase invertida para visualizar o efeito citopático.

O efeito citopático caracterizou-se pela formação típica de sincícios e destruição do “tapete” de células (Figura 7). A suspensão (vírus e célula) foi aliquotada e armazenada à -70°C .

Todo o procedimento foi realizado em condições adequadas de assepsia em capela de fluxo laminar.

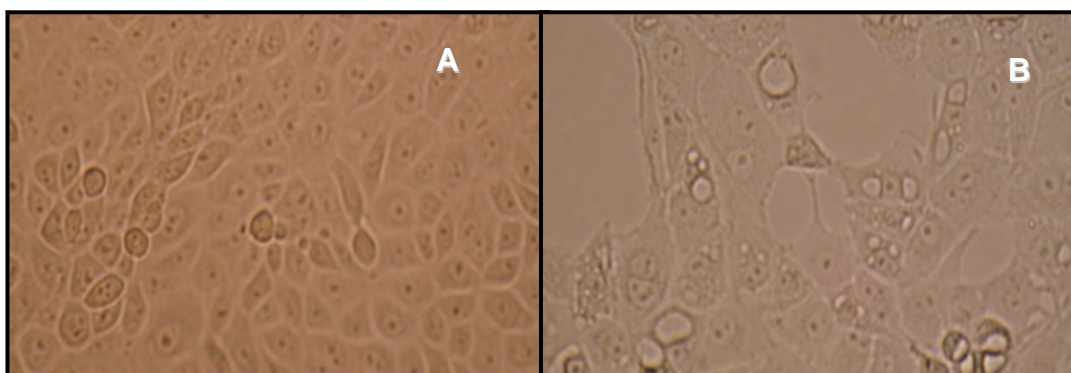


Figura 7. Efeito citopático do vírus da diarreia bovina em cultura de células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK). A) Células não-infectadas. B) células infectadas com o vírus BVDV. Foto obtida de cultura do BVDV no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical

6.4.2.2 Extração do material genético do Controle Interno

Para a extração do controle interno, o material estocado à -70°C foi descongelado e extraído os RNAs utilizando-se o kit QIAamp Viral RNA Qiagen (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, conforme descrito no item 6.4.1.1.

6.4.2.3 Transcrição reversa por técnica “*in-house*” do controle interno

Todos os controles internos depois da extração do RNA foram também submetidos à etapa de transcrição reversa seguindo o mesmo protocolo conforme citado no item 6.4.1.3.

6.4.2.4 Reação RT- PCR convencional para o controle interno

6.4.2.4.1 Escolha dos *primers*

Para amplificação do material genético do controle interno crescido em cultura celular realizamos uma reação de RT-PCR convencional.

Os *primers* utilizados nesta reação foram escolhidos através de publicações científicas selecionando-se àqueles que mais se adequavam as nossas propostas, de obtermos uma reação específica para o BVDV sem reação cruzada com outro *Flavivirus*.

Os *primers* selecionados para o controle interno BVDV apresentam as seqüências conforme tabela abaixo:

Tabela 4- Seqüência de *primers* usados na reação de RT-PCR para o BVDV

<i>PRIMER</i>	
SEQUÊNCIA 5'→3'	
BVDV-F	GTGGAGGAACCTGTTTATGATC
Z5393	TTACCCGACCTGCAGTCACCTC

6.4.2.4.2 Protocolo da reação

O protocolo para a RT-PCR convencional para o controle interno é: KCl; 10mM Tris (pH=8,5); 0,1% Triton X-100; 0,12mM dNTP'S; 2,0mM MgCl₂; 0,12μM de cada *primer*, 2,5U/μl *Taq* DNA Polymerase (GIBCO BRL® Grand Island, N.Y.), 2,2μl de glicerol a 57%, 1,0 μl de cresol a 0,1 μg/μL, 5,8μl de água e 10,0μl de cDNA, para uma reação de 25μl, com incubação inicial à 95°C por 5 min., seguido de 40 ciclos de 95°C - 30 seg.; 55°C - 30 seg.; 65°C - 1minuto e extensão final à 65°C por 7 min.

Tabela 5- Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de RT- PCR para o BVDV

Reagentes	Mix/tubo (μL)	Concentração Final
Reaction Buffer 10X minus Mg	2,7	1X
dNTP's (2,5mM)	1,2	0,12mM
MgCl ₂ (50mM)	1,0	2,0 mM
Primer-F BVDV (10μM)	0,3	0,12 μM
PrimerZ5393 (10μM)	0,3	0,12 μM
Glicerol 57%	2,2	
Cresol red (2,5μg/μL)	1,0	0,1 μg/μL
Taq platinum(5U/μL)	0,5	2,5U/μl
Água	5,8	
TOTAL	15,0	+10,0
	cDNA	

Para revelação dos produtos de amplificação as culturas foram aplicadas em gel de agarose 2% diluído em TAE (Tris-acetato EDTA)

contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídio que em seguida foi submetido a corrente de 65 amperes para eletroforese. Após a eletroforese, os produtos de amplificação resultantes, foram visualizados de acordo com o número de pares de bases (Figura 8).

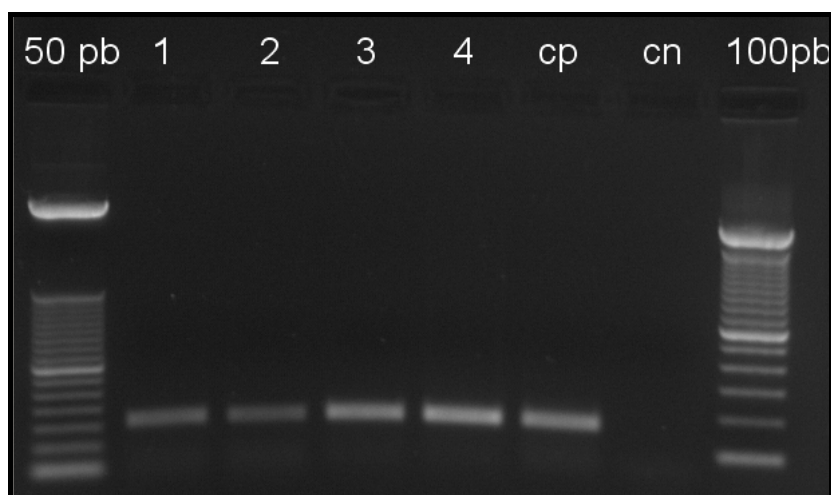


Figura 8. Gel de agarose com a cultura de BVDV. cp = controle positivo; cn = controle negativo (água)

6.4.3 Parâmetros para a padronização da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo

De modo a garantir que a técnica de Q-PCR em Tempo Real de um passo alcançasse elevados níveis de sensibilidade e especificidade, foi necessário padronizar um protocolo a fim de evitar problemas de execução tais como: amplificação de produtos inespecíficos, contaminações e impureza das amostras.

Foram avaliados diversos parâmetros necessários à padronização de uma técnica de Q-PCR em Tempo Real, conforme Bustin, 2006 tais como:

6.4.3.1 Seleção dos *primers*

Os *primers* selecionados foram os mencionados por Lai et al. (2007) que utilizaram os *primers* degenerados “Pan dengue”. Um *primer* é considerado degenerado se em algumas de suas posições há possibilidade de ter diversas bases (Kwok et al., 1994).

Os *primers* degenerados são fáceis e baratos de produzir e são muito utilizados para amplificar seqüências genômicas relacionadas. No nosso estudo, utilizamo-nos para amplificar os quatro sorotipos do dengue com apenas um par de *primers*. As seqüências estão demonstradas abaixo na tabela 6 e as letras Y e R que aparecem nas seqüências representam a degeneração dos mesmos.

Tabela 6- Seqüência dos *primers* usados na reação de Q-PCR em Tempo Real para os vírus da dengue

<i>PRIMER</i>	
SEQUÊNCIA 5'→3'	
Dengue pan F	TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC
Dengue pan R	GAGACAGCAGGATCTCTGGTCTYTC

Y= C ou T; R= A ou G

6.4.3.2 Sistema de detecção SYBR Green

Lai et al. (2007), utilizaram o PCR em Tempo Real (SYBR Green) e em seus resultados, obtiveram uma sensibilidade de 10 PFU/ml para os quatro sorotipos da dengue. Yong et al. (2007) também utilizaram o PCR em Tempo Real (SYBR Green) e o PCR multiplex para comparar a sensibilidade dos dois testes, obtendo como resultado uma positividade de 178 amostras no PCR em Tempo Real versus 134 amostras no PCR multiplex, entre as 210 amostras de soro positivas analisadas para o vírus da dengue.

O SYBR Green foi o sistema de detecção escolhido, pois é um dos formatos mais simples e econômico para detectar e quantificar produtos de PCR em reações de Tempo Real. O SYBR Green pode apresentar uma sensibilidade tão alta quanto o sistema TaqMan (Gomes-Ruiz et al., 2006).

- **Temperatura de Melting (T_m)**

É definida como a temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fita simples e a outra metade na forma de dupla hélice. A T_m depende da composição do DNA, de modo que aumento do conteúdo de G+C no DNA gera um incremento na T_m ocasionado pelo maior número de ligações de Hidrogênio (Bustin, 2006).

O sistema SYBR Green apresenta a vantagem de ao adicionarmos uma curva de dissociação obter o dado da Temperatura de melting (T_m) específica para cada amplicon. Esta é uma importante ferramenta para determinação de dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos formados durante a reação de PCR em Tempo Real (Bustin, 2006).

Muitos estudos sugerem que a T_m desenha o perfil do amplicon gerado pela 3'NC e pode ser usado com o propósito de sorotipar (Chutinimitkul et al., 2005, Ririe et al., 1997).

6.4.3.3 Adequação das características dos *primers* ao sistema de detecção SYBR Green

Esta análise procurou restringir as características dos *primers* “Pan dengue” de acordo com as recomendações determinadas pelo sistema de detecção SYBR Green ABI Prism®7300 HT SDS (Applied Biosystems, Inc., EUA), escolhido para a execução deste trabalho. O uso do SYBR Green em protocolos de PCR em Tempo real deve-se levar em consideração o *primer* escolhido, composição de bases guanina/citosina, a temperatura de anelamento e tamanho do amplicon, conforme descrito abaixo.

Percentagem GC: entre 50 e 80%

Temperatura de anelamento: entre 55°C e 65°C

Tamanho do amplicon: 50 a 150 pb

6.4.3.4 Reagentes e protocolo para a reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo

Para padronizarmos a reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo escolhemos o kit QuantiFast SYBR Green RT-PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

O protocolo de amplificação empregado, utilizou *primers* complementares a região 3' não-codificante do vírus da dengue conforme

descrito (Lai et al, 2007). As amplificações foram realizadas no equipamento ABI Prism®7300 HT SDS (Applied Biosystems, Inc., EUA), disponível no laboratório de Virologia-IMT. Durante toda a padronização utilizamos o controle positivo do vírus da dengue 3.

Para iniciarmos a padronização da reação Q-PCR em Tempo Real de um passo seguiu o protocolo descrito pelo fabricante conforme as informações descritas na tabela 7.

Tabela 7- Concentrações e volumes dos reagentes descritas pelo fabricante Qiagen (QIAGEN Inc.,Valencia, CA, USA)

Reagentes	Mix/tubo(μL)	[Final]
Quantifast RT Mix	0,25	
2X Master Mix	12,5	1X
Dengue pan R 10μM	Variável	1μM
Dengue pan F 10μM	Variável	1 μM
RNA	Variável	<100ng/reação
Volume Final:	25	

Este protocolo recomendava seguir as seguintes condições: 10 minutos a 50° C para síntese de cDNA; 5 minutos a 95° C, 10 segundos a 95° C , 60° C por 30 segundos mais uma curva de dissociação, numa ciclagem variável de 35 a 40 ciclos.

Como os componentes variáveis da reação propostos pelo fabricante são os outros parâmetros de padronizações descritos por Bustin, 2006 testamos separadamente cada um deles adequando as propostas de ambos, conforme descrito nos próximos 4 itens abaixo.

6.4.3.5 Temperatura de anelamento dos *primers*

Durante a padronização, alteramos a temperatura de anelamento em intervalos regulares de 5°C partindo de 60,0° C a 50,0° C.

6.4.3.6 Concentração final dos *primers*

Como a concentração final dos *primers* indicada pelo fabricante era de 1µM testamos o par de *primers* “Pan dengue” nas concentrações finais de 1µM, 4µM, 10µM para analisarmos qual destas não havia potenciais perdas de sensibilidade e/ou especificidade da reação.

6.4.3.7 Quantidade de *template*

Como a quantidade de *template* informada pelo fabricante era também variável e sabendo-se que o excesso de *template* a ser amplificado e a proporção volume total (volume de cDNA/RNA) podem ser fatores que levam ao aparecimento de ampliações inespecíficas testamos o volume do cDNA/ RNA em 7,5 µl; 5,0 µl e 2,5 µl.

6.4.3.8 Número de ciclos

Como a ciclagem recomendada pelo fabricante variava de 35 a 40 ciclos testamos o número de ciclos de 35 a 50 durante a padronização.

6.4.4 Construção da curva padrão para a reação Q-PCR em Tempo Real de um passo

Para a padronização de uma técnica quantitativa, faz-se necessário a construção de uma curva padrão que serve de parâmetro para as quantificações das amostras a serem testadas.

No presente estudo, todas as reações de Q-PCR em Tempo Real de um passo foi feito uma curva padrão com diluições seriadas do controle do vírus da dengue 3. Sabendo que o controle de dengue 3 apresentava uma carga viral na ordem de 10^7 , o mesmo foi diluído em tampão de PCR 1X até a concentração de 10^2 .

A curva padrão no sistema SYBR Green expressa os valores de inclinação, interseção e correlação da reta, calculados pelo Software GeneAmp 7300 (Applied Biosystems Inc., EUA).

A análise do perfil da curva de amplificação é baseada no CT (ciclo do limiar – início da detecção de fluorescência), em que é possível visualizar uma relação entre a quantidade de DNA/RNA e CT, pois quanto menor o CT, maior é a quantidade de DNA/RNA. A partir dos valores de CT de cada uma das diluições, o termociclador desenha uma reta, formada a partir dos valores do CT e da concentração da amostra em cada uma das diluições. As reações que apresentaram inclinação da reta “slope” entre - 3,1 a - 3,9 foram consideradas dentro do padrão de eficiência aceitável.

6.5 Aplicação da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo utilizando as amostras de campo

6.5.1 Extração das amostras

- **Adição do controle interno às amostras**

Com a adição do controle interno em cada amostra conseguiríamos detectar possíveis falhas no processo de extração ou síntese de cDNA.

Para utilizar o controle interno nas amostras era preciso colocá-lo no momento da extração. Para tal finalidade, foram feitos experimentos de adição de diferentes concentrações deste sobrenadante em plasma/soro normal para verificar a concentração ideal do mesmo que fosse passível de detecção regular na reação de PCR em Tempo Real.

Para a extração em plasma a melhor diluição foi de 1:200 (1µL do sobrenadante de BVDV para 199µL de plasma humano) para que não houvesse inibição do vírus da dengue. A alíquota de BVDV foi adicionada depois do processo de lise de acordo com o protocolo de cada kit.

Para a extração em papel FTA card a melhor diluição foi de 1:200 e a alíquota de BVDV foi adicionada depois do processo de eluição (item 6.5.1.2).

6.5.1.1 Punção venosa

Para a extração dos RNAs das amostras coletadas por punção venosa, utilizamos o kit QIAamp Viral RNA Qiagen (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, anteriormente citado no

item 6.4.1.1. Após a etapa de lise do material genético foi adicionado o BVDV como controle interno, na proporção de 1:200.

6.5.1.2 Punção digital

Para a extração dos RNAs das amostras coletadas por punção digital utilizado o papel Whatman FTA Card (Bioamerica Inc., EUA) seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

O protocolo consiste em obter inicialmente um pequeno disco de 1mm (cortador fornecido no kit) de cada amostra e colocá-lo em tubo tipo “ependorff”. Adiciona-se 400 μ L do buffer de RNA (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 800U/ml RNase Out™, 200 μ g/ml de glicogênio e 2 mM DTT) e incuba-se por 15 minutos em gelo. Precipita-se o RNA com a solução de lavagem (0,5 volume de 7,5M de acetato de amônio e 1,0 volume de isopropanol gelado). Incuba-se a -20°C por 1 hora centrifuga-se 12.000 x g e remove-se o sobrenadante. Lava-se o pellet com 500 μ L de etanol a 75% e centrifuga-se 12.000 x g por 5 minutos. Remove-se o sobrenadante e seca-se o pellet no fluxo laminar por aproximadamente 20 minutos. Ressuspende-se o pellet em 50 μ L de buffer TE (etapa de eluição). Nesta etapa adicionou-se ao eluato 2,5 μ L do sobrenadante de BVDV já diluído 1:10 em tampão de PCR 1X.

6.5.2 Reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo utilizando as amostras de campo

Todas as 89 amostras coletadas foram submetidas à reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo padronizada durante o estudo. Os resultados destas amostras estão expostos no item 7.0 e as cargas virais das mesmas por ambos os métodos de coleta estão apresentadas no Anexo C.

6.6 Considerações éticas

Foi preservado, rigorosamente, o anonimato dos indivíduos originalmente envolvidos no projeto, que consentiram a obtenção do material a ser utilizado na presente pesquisa assinando o Termo de Consentimento Informado (ANEXO A). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq - da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 0036/08– ANEXO B).

6.7 Dados estatísticos

Os dados foram inseridos e analisados no banco de dados dos programas estatísticos SPSS – versão 15 e STATA 9.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). Em seguida, realizaram-se as checagens de consistência, com as correções pertinentes.

Inicialmente efetuou-se a análise descritiva das variáveis do estudo. Os resultados foram apresentados em tabelas de frequências para as variáveis

qualitativas. No que tange às variáveis quantitativas, foram feitas estimativas das medidas de tendência central e de dispersão.

Para análise de concordância entre os valores obtidos para os logaritmos das cargas virais para punção venosa e para punção digital, calculou-se o coeficiente de correlação intraclassa e seu respectivo intervalo com 95% de confiança.

Para esses mesmos resultados na forma categórica (positiva ou negativa), a concordância foi avaliada calculando-se a estatística kappa e seu respectivo intervalo com 95% de confiança.

Neste estudo adotou-se nível de significância de 5%.

7.0 RESULTADOS

7.1 Resultados da padronização da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo

7.1.1 Seleção dos *primers*

A seleção dos *primers* foi o primeiro parâmetro a ser seguido, sua seqüência e a região de amplificação viral foram descritas no item 6.4.3.1. A escolha dos *primers* Pan dengue foi devida à suas características adequarem-se ao sistema de detecção SYBR Green conforme citadas no item 6.4.3.3 e expostas abaixo:

- **Tamanho do Amplicon**

O tamanho do amplicon utilizando os *primers* “Pan dengue” escolhidos foi de 260 pb (Figura 9).

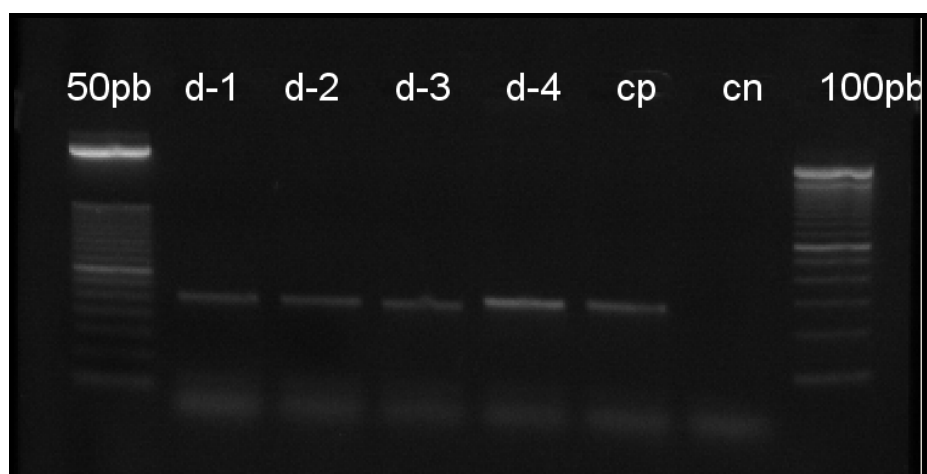


Figura 9. Teste dos *primers* Pan dengue com as quatro culturas do vírus da dengue (DENV 1 = Dengue 1, DENV 2 = dengue 2; DENV 3 = dengue 3; DENV 4 = dengue 4) para o tamanho do amplicon. cp= controle positivo, cn= controle negativo (água)

- **Percentagem GC**

A percentagem de guanina e citosina para o *primers* “Pan dengue” *forward* foi de 52,1% e para o *reverse* foi de 48,1%.

- **Temperatura de anelamento**

A temperatura de anelamento dos *primers* “Pan dengue” *forward* foi de 56,9°C e para o *reverse* foi de 60,7°C.

Para testarmos a especificidade dos *primers* “Pan dengue” utilizamos amostras já sabidamente positivas disponíveis no Laboratório de Virologia para HGV (ou GBV-C), Hepatite C, febre amarela. Foi demonstrado então que o par de *primers* “Pan dengue” apresenta uma especificidade de 100% só havendo amplificação dos produtos específicos dos vírus da dengue.

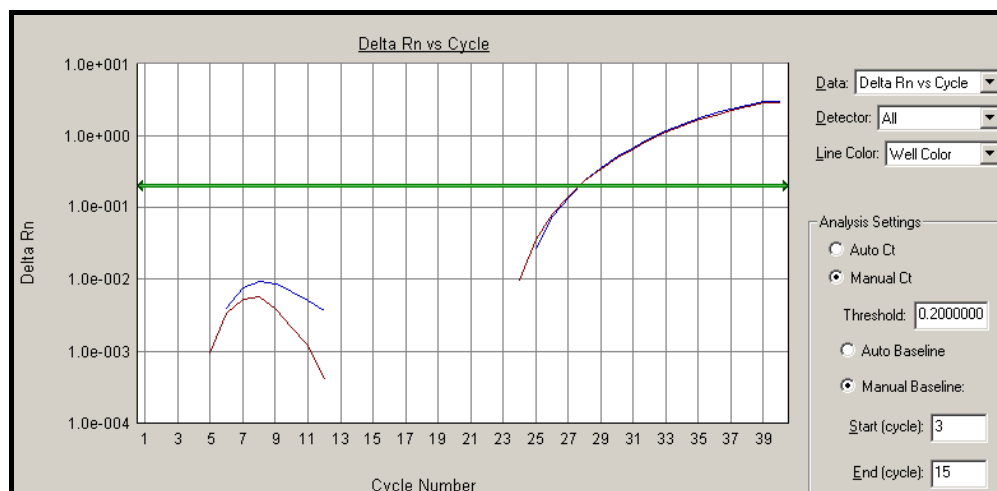


Figura 10. Reação de Q-PCR em tempo real para teste de especificidade do par de *primers* “Pan dengue”

7.1.2 Reagentes e protocolo para a reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo

A detecção do RNA extraído das amostras dos casos suspeitos de dengue foi realizada através de reação de Q-PCR em Tempo Real que foi alvo de padronização ao longo do estudo. O protocolo da reação padronizada para o vírus da dengue e segue abaixo na tabela 8.

Para confirmação de todas as amostras negativas foi realizada a reação de PCR convencional para o controle interno citada no item 6.4.2.4.2

Tabela 8- Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de Q-PCR em Tempo Real padronizada para o vírus da dengue

Reagentes	Mix/tubo(μL)	[Final]
Quantifast RT Mix	0,25	
2 x MasterMix	12,5	1X
Primer pan F (10 μ M)	2,5	1 μ M
Primer pan R(10 μ M)	2,5	1 μ M
RNA	7,5	
Volume Final:	25,25	

Para uma reação de 25,25 μ l, há uma incubação inicial à 50°C por 10 minutos, 95°C – 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C - 10 segundos; 60°C - 30 segundos mais uma curva de dissociação.

Ao adicionarmos a curva de dissociação a cada reação, observou-se que a Tm dos quatro sorotipos da dengue variava entre 80°C-86°C (figura 11 e 12).

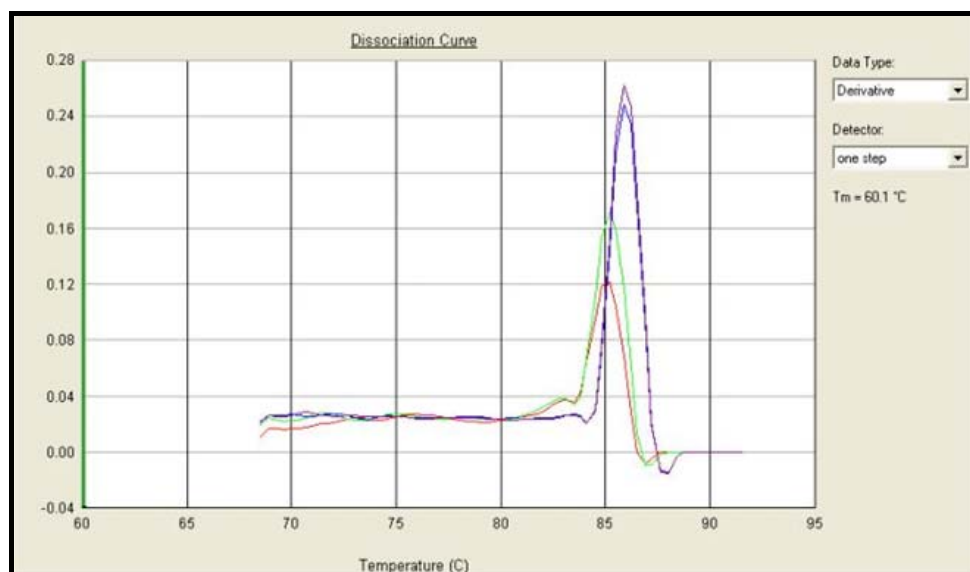


Figura 11. Curva de dissociação de controle do dengue 3 e 4 com uma $T_m = 86^\circ\text{C}$ e 85°C respectivamente

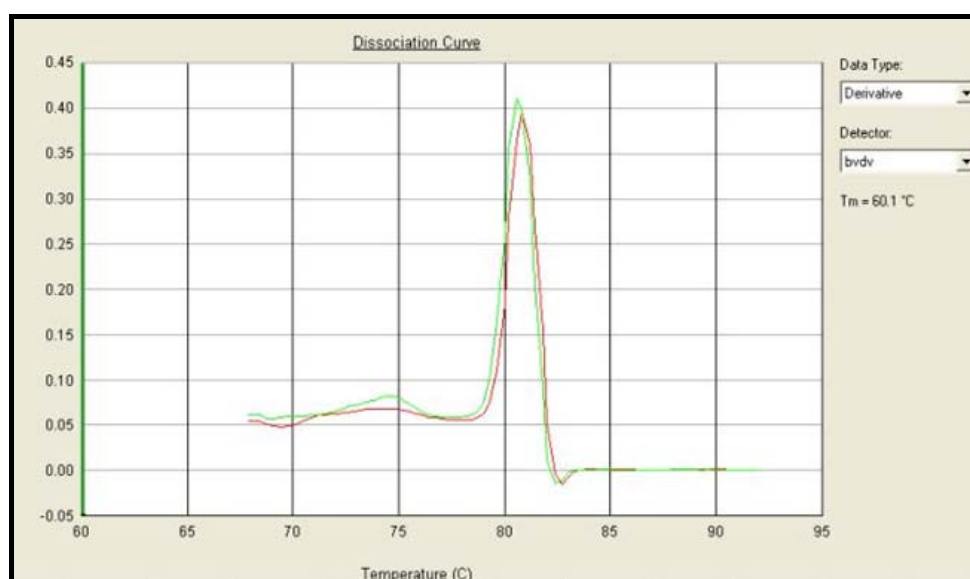


Figura 12. Curva de dissociação de controle do dengue 1 e 2 com uma $T_m = 81^\circ\text{C}$ e 82°C respectivamente.

7.1.3 Curva da reação de Q-PCR em Tempo Real padronizada

Para todas as reações foi colocada em paralelo às amostras coletadas, uma curva padrão feita com diluições seriadas do sobrenadante de cultura do vírus da dengue 3 e validamos apenas aquelas reações que

apresentaram o valor de *slope* de - 3,3 a - 3,9 (inclinação da curva) aceitos conforme Bustin, 2006 (Figura 13). A curva padronizada apresentou um limite de detecção de 100 cópias/ml. Este foi o ponto da curva em que houve amplificação em 95% das reações.

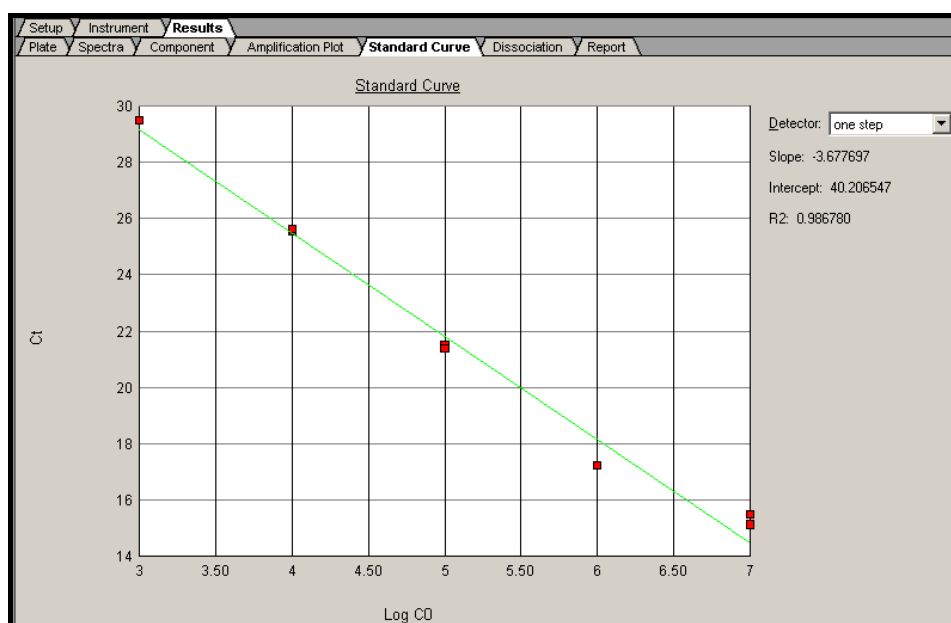


Figura 13. Curva padrão da reação Q-PCR em Tempo Real de um passo padronizada, com diluições seriadas do sobrenadante de cultura do vírus da dengue 3

7.2 Resultado da reação de Q-PCR em Tempo Real de um passo nas amostras de campo

7.2.1 Critérios de positividade para as amostras de campo

Foram consideradas positivas amostras que apresentaram $T_m \geq 80^\circ\text{C}$ e carga viral ≥ 100 cópias/ml.

Das 89 amostras 18 foram indetectáveis pela coleta por punção venosa e 71 pela coleta por punção digital pelo critério $T_m < 80^\circ\text{C}$. Destas

amostras com T_m diferente do preconizado foi feito um gel de agarose para a comprovação da negatividade das mesmas (Figura 14).

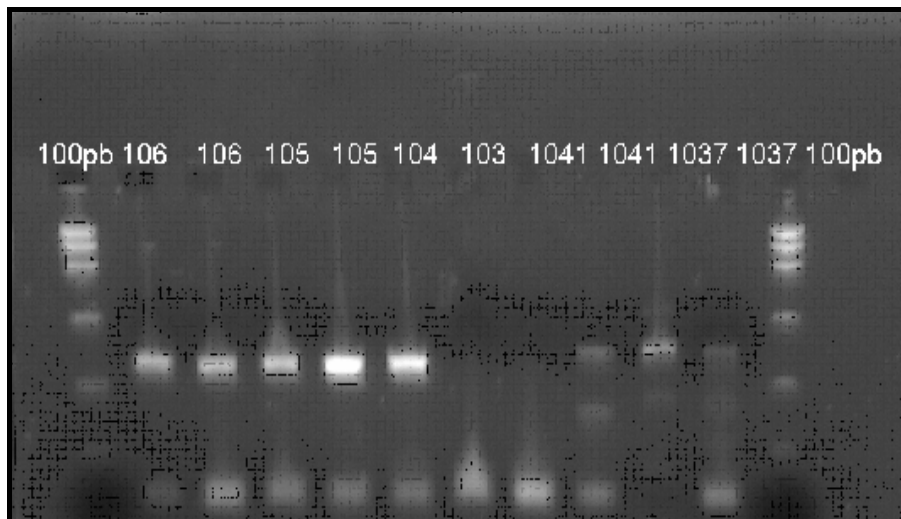


Figura 14. Gel de agarose com amostras que apresentaram uma Temperatura de melting (T_m) discrepante. A amostra de dengue 3 na concentração de 103 tem uma T_m de 77,4°C já a amostra 1041 apresenta uma T_m de 72°C na primeira banda e 83,8°C na segunda. A amostra 1037 apresenta uma T_m de 86,1°C na primeira banda e 83,4°C na segunda

Pelo critério de carga viral <100 cópias/ml 11 foram negativas pela coleta por punção venosa e 3 pela punção digital. Apenas 1 amostra foi indetectável com $T_m = 83,6$ °C pela punção digital.

7.2.2 Adequação das amostras ao controle interno

Todas as 89 amostras foram positivas para a detecção do controle interno BVDV, independente do tipo de coleta conforme demonstra a figura 15.

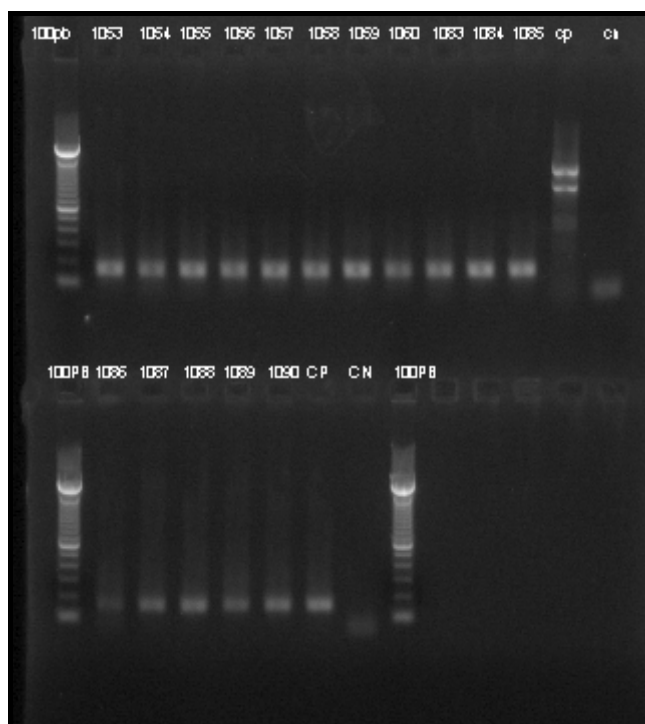
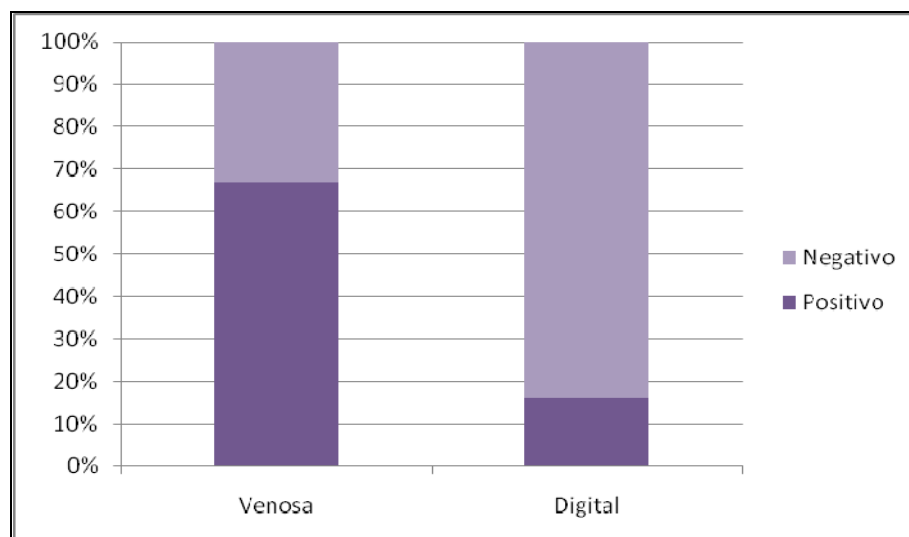


Figura 15. Foto de gel de agarose utilizando produtos de amplificação da reação de RT-PCR convencional para o vírus BVDV. cp=controle positivo e cn= controle negativo (água)

7.2.3 Comparação das coletas de sangue por punção digital e por punção venosa quanto à positividade

Das 89 amostras coletadas por punção venosa, 60 (67%) foram positivas e 29 (33%) negativas para o PCR em tempo real, e dentre as 89 amostras coletadas por punção digital 14 (16%) foram positivas e 75 (84%) negativas conforme demonstrado no gráfico 1.

Gráfico 1. Representação gráfica das amostras positivas e negativas para a coleta por punção venosa (plasma) e para a coleta por punção digital (FTA card)



7.2.4 Sorotipos da dengue nas amostras de campo

Dentre as 89 amostras coletadas por punção venosa, apenas 29 (32%), foram tipadas pelo método de PCR multiplex (gráfico 2), sendo 3 casos identificados como dengue 1 (10%), 16 casos do vírus da dengue 2 (55%), e 10 casos do vírus da dengue 3 (35%) conforme demonstra o gráfico 3.

Gráfico 2. Representação gráfica das amostras positivas para a técnica de Q-PCR em Tempo Real e para a técnica de PCR multiplex

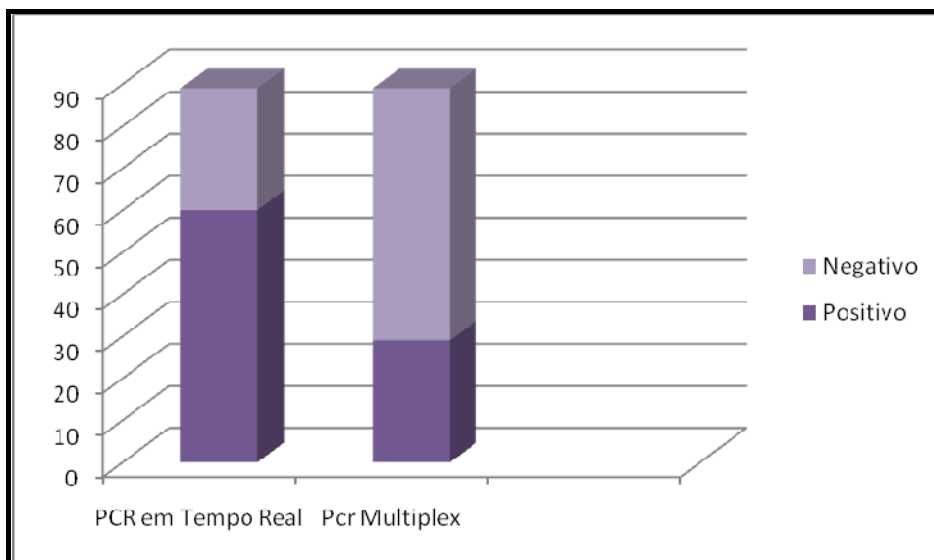
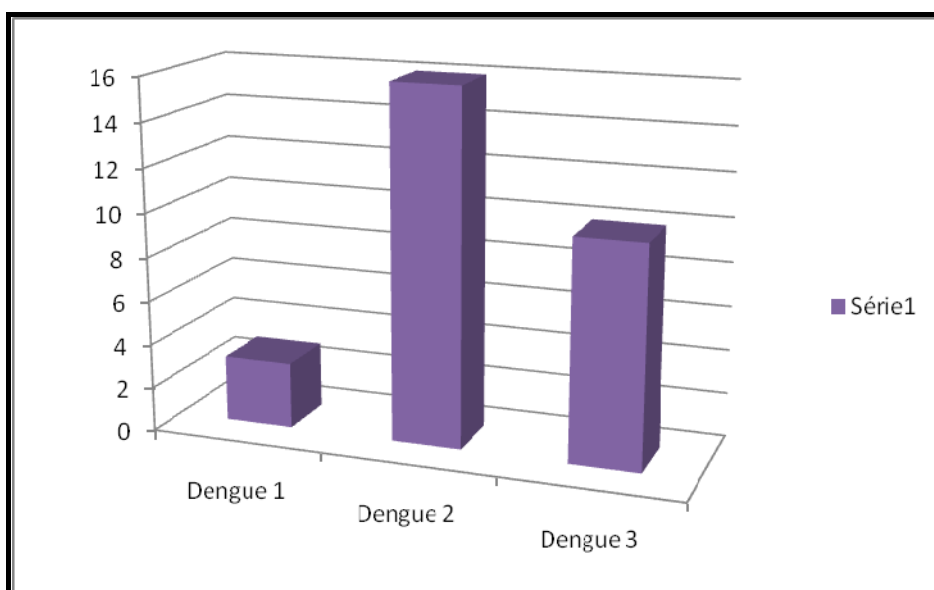


Gráfico 3. Representação gráfica da tipagem dos vírus da dengue pela técnica de PCR multiplex para as amostras positivas pela técnica de Q-PCR em Tempo Real



7.2.5 Comparação das coletas de sangue por punção digital e por punção venosa quanto às cargas virais

Inicialmente procurou-se comparar os dois métodos transformando a variável carga viral em dicotômica. Amostras que preencheram os critérios de positividade para ambas as formas de coleta foram incluídas nos cálculos estatísticos. 60 amostras foram consideradas positivas para a punção venosa e 14 para a punção digital, sendo 10 positivas e 25 negativas para ambas formas de coleta

Não foi observada concordância entre ambos os métodos ($\kappa = 0,0204$; IC95%:-0,0941-0,1349) (Tabela 9).

Tabela 9- Distribuição dos resultados obtidos para carga viral de indivíduos com suspeita de dengue segundo tipo de coleta. Goiânia (GO), 2007-2008

Punção venosa	Punção digital		total
	positiva	negativa	
Positiva	10	50	60
Negativa	4	25	29
Total	14	75	89

Para maior linearização dos resultados obtidos para as cargas virais das amostras, passamos a trabalhar com o log desses valores. Sendo assim, dentre as amostras com carga viral detectável, observou-se uma variação de 2,17 a 12,13 nos logs das cargas virais na coleta por punção venosa e de 2,03 a 11,78 na coleta por punção digital (Tabela 10).

Tabela 10- Análise descritiva dos valores de \log_{10} das cargas virais de indivíduos com suspeita de dengue segundo tipo de coleta. Goiânia (GO), 2007-2008

Coleta	n	média (DP)	mediana (mín – máx)
punção venosa	60	5,14 (2,24)	4,63 (2,17 – 12,13)
punção digital	14	3,89 (2,46)	3,19 (2,03 – 11,78)

Ainda com o intuito de verificar se houve concordância entre os valores obtidos para a carga viral nos dois tipos de coleta, calculou-se o coeficiente de correlação intraclassa do valor da carga viral em ambos os métodos e verificou-se que houve divergência entre eles (coeficiente de correlação intraclassa=0,000) (IC95%:0,000-0,102).

Tabela 11 - Estatística descritiva do \log_{10} das cargas virais de indivíduos com suspeita de dengue segundo tipo de punção e dias de sintomas. Goiânia(GO), 2007-2008.

Dias de sintomas	n	n_{detectável}	média (DP)	mediana (mín – máx)
coleta por punção venosa	89	60		
<24 h	1	-	-	-
1	9	4	5,12 (1,84)	5,03 (3,49 – 6,93)
2	14	8	4,78 (1,95)	5,27 (2,32 – 6,90)
3	22	14	5,41 (1,81)	5,88 (2,29 – 7,49)
4	18	16	5,36 (2,20)	5,24 (2,66 – 11,78)
5	17	12	4,58 (2,59)	4,13 (2,17 – 11,98)
6	7	5	5,72 (3,91)	3,28 (3,10 – 12,13)
13	1	1	4,58	
coleta por punção digital	89	14		
<24 h	1	-	-	-
1	9	2	4,07 (1,29)	4,07 (3,16 – 4,98)
2	14	2	2,88 (0,63)	2,88 (2,43 – 3,33)
3	22	2	3,43 (0,64)	3,43 (2,97 – 3,89)
4	18	2	8,53 (4,60)	8,53 (5,28– 11,78)
5	17	3	2,98 (0,80)	2,91 (2,20 – 3,81)
6	7	3	4,08 (2,10)	3,22 (2,53 – 6,47)
13	1	-	-	-

Na tabela 11 encontram-se os valores de \log_{10} das cargas virais segundo o tempo de sintomatologia em relação ao dia da coleta da amostra.

8. DISCUSSÃO

Uma vez que as infecções pelos vírus da dengue podem se apresentar como uma doença grave, caracterizada por hemorragia e choque, é importante que um diagnóstico rápido esteja disponível e, se possível, passível de identificação do sorotipo envolvido nas infecções.

O diagnóstico correto e identificação do sorotipo assumem maior importância para as formas graves da doença, pois não há marcador que preveja a progressão de dengue clássica para estas formas. A OMS reconhece este fato e incentiva a investigação sobre o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico de dengue. A biologia molecular foi um grande passo dado no universo da pesquisa científica no que diz respeito ao diagnóstico de diversos patógenos humanos.

Recentemente, o desenvolvimento de novas técnicas de fluorescência levou a novas análises de PCR, como a PCR em Tempo Real permitindo a detecção do produto de PCR na fase linear da reação, que é considerado o melhor parâmetro para analisar a eficiência da amplificação (Niesters, 2002). Assim, um método de diagnóstico rápido, como PCR em Tempo Real, poderá contribuir para o diagnóstico apropriado e para um melhor manejo do paciente suspeito, de dengue.

Shu et al. (2003) adaptaram a abordagem molecular e desenvolveram um teste tipo-específico empregando SYBR Green para sorotipar o vírus da dengue. No presente estudo, um conceito similar foi aplicado, o teste

padronizado é simples e similar a outros já descritos na literatura (Chutinimitkul et al., 2005; Yong et al., 2007).

A maior preocupação ao desenvolver um diagnóstico de RT-PCR para vírus de RNA é a variação genética nas seqüências de nucleotídeos do vírus estudado, sendo uma solução comum à síntese de *primers* degenerados que abranjam todas as possíveis mutações. No entanto, essa abordagem funciona propriamente quando há 16 mutações no total ou menos em um *primer* único (G.-J. Chang, dados não publicados).

Tanaka (1993) foram os primeiros a utilizar tais *primers* degenerados para detecção de *Flavivirus*. Maher-Sturgess et al, 2008 também fizeram o uso destes *primers* para detecção de vírus da família *Flaviviridae* tais como dengue, encefalite japonesa e febre amarela. Neste estudo, foi utilizado um único par de *primers* num formato de uma reação de Q-PCR em Tempo Real de apenas um passo (Lai et al,2007).

As regiões de *primers* mais utilizadas são a da proteína NS5 e da região 3'NC (Shu et al., 2003; Lai et al., 2007). Dos Santos et al. (2008) foi o primeiro a utilizar um par de *primer* baseado na região 5' NC. No nosso trabalho amplificamos a região 3' NC.

Com o uso destes *primers* degenerados enfrentamos a problemática da formação de dímeros, o que dificultou o diagnóstico para o vírus da dengue uma vez que não conseguíamos diferenciar quais amostras eram verdadeiramente positivas daquelas inespecíficas. Entretanto, como este foi o único par de *primers* encontrados na literatura que detectava os 4

sorotipos por PCR em Tempo Real com a mesma eficiência, então continuamos a utilizá-lo mesmo com o problema descrito.

Como a T_m foi aplicada no presente estudo como critério de positividade, utilizamos desta ferramenta também para sanar a dúvida dos produtos inespecíficos. Conforme citado no item 7.2.1 os valores das T_m em torno de 70°C eram dímeros de *primers* e, $T_m \geq 80^\circ\text{C}$ (figura 14) eram amplificações dos produtos específicos de PCR de dengue, baseados nos T_m das amplificações do controle de dengue 3.

Os nossos dados corroboram os de Shu et al. (2003) que também enfrentaram esta mesma problemática e, em seus achados, os valores de T_m para os dímeros de *primers* foram encontrados em torno de 75°C , enquanto os valores para os sorotipos específicos estavam na faixa de 79° a 83°C . Shu et al (2003) conseguiu resolver este impasse utilizando *primers* degenerados para a região do core viral.

Saber o sorotipo do vírus da dengue é uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos da doença. Vaughn et al. (1997) reportaram que a severidade da doença está correlacionada com os títulos virais e com o sorotipo (Vaughn et al, 1997).

Além disso, certos sorotipos estão associados a epidemias, uma mudança de um sorotipo circulante, pode ser um indicador de um surto iminente naquela população que ainda não teve contato (*naive*) com o mesmo.

Thu et al. (2004) fez algumas observações em Myanmar durante um surto em 2001 onde houveram 361 casos de febre hemorrágica da dengue /

síndrome do choque da dengue (FHD / SCD), incluindo 192 mortes. Naquele ano, 95% dos vírus isolados dos pacientes foi o sorotipo 1 pertencente a duas linhagens já extintas desde 1998. A mesma situação também foi evidenciada em Singapura quando houve uma troca do sorotipo circulante DENV 2 para o DENV 1 que levou a um surto no ano de 2005 (Koh et al., 2008).

Neste estudo, dentre as amostras sorotipadas, o DENV 2 e 3 foram os sorotipos predominantes, nossos dados corroboram os do MS/SVS que notificou os sorotipos 2 e 3 como os predominantes em todo o país naquele mesmo ano (Figura 2, introdução) onde houveram 140 casos de FHD, com 14 óbitos na região norte, por exemplo.

Dentre as amostras positivas pelo PCR multiplex conclui-se que só conseguimos tipar aquelas que apresentaram carga viral mais elevada, conforme Anexo C, sendo então esta técnica menos sensível que o Q-PCR em tempo real. Esta é uma limitação importante do PCR-multiplex descrito, pois ao ser usado como ferramenta de tipagem sempre haverá um viés de tipar aquelas de carga viral mais elevada. Se houver uma associação de um outro sorotipo com viremias mais baixas, certamente incorreremos em conclusões epidemiológicas erradas, subdetectando-se a circulação deste sorotipo.

Análise de correlação entre a carga viral e dados clínicos é também uma importante ferramenta para fornecer informações a respeito da patogênese de cada síndrome associada ao vírus da dengue. Sendo assim, muitos estudos têm demonstrado a associação da carga viral à severidade

da doença (Murgue et al., 2000; Vaughn et al., 2000; Libraty et al., 2002; Wang et al., 2003).

No presente estudo, a carga viral foi determinada através de curvas de quantificação (figura 13) em um ensaio cujo limiar de detecção é 100 cópias/ml. Os nossos resultados se assemelham aos de Lai et al. (2007) que obtiveram um limite de detecção de 100 cópias/ml. Esta sensibilidade analítica é compatível com o uso clínico da técnica. No entanto, a verdadeira sensibilidade clínica só poderia ser obtida através da informação dos resultados de IgM para dengue em amostra posterior, dados que infelizmente não foram possíveis de se obter para a maioria dos pacientes.

Estudos que relacionam a cinética de viremia, o estado de imunidade do hospedeiro e as formas clínicas da dengue são importantes para uma melhor compreensão da patogênese da doença. A quantificação da magnitude da replicação viral é fundamental no entendimento da progressão da doença para formas clínicas mais graves.

Wang et al (2003) examinaram os níveis da carga viral plasmática em ambos os períodos de febre e defervescência em doentes em um surto de DENV-3 no sul de Taiwan em 1998. Níveis mais elevados do RNA viral do dengue no plasma foram encontrados em pacientes com FHD do que em pacientes DF.

Guilarde et al. (2008) também reportaram que a viremia plasmática permaneceu detectável durante o período pós-defervescência entre os pacientes com doença grave. Sendo assim, o dia em que se detecta a doença é um dado relevante para o manejo clínico dos pacientes

acometidos com dengue, e especialmente, a viremia no momento da defervescência. No nosso estudo, não tínhamos dados suficientes para fazer esta correlação.

Em nosso estudo, além da padronização de uma técnica de Q-PCR em Tempo Real avaliou-se uma nova alternativa de coleta por sangue capilar coletado em papel de filtro. Neste estudo demonstrou-se que o sangue coletado do dedo não é uma alternativa satisfatória para o diagnóstico da dengue. Este tipo de espécime teve uma positividade de 16% enquanto que as mesmas amostras coletadas por punção venosa tiveram 67% de positividade (gráfico 1). Esta baixa positividade também foi observada por Vilceck et al. (2001) quando tentaram isolar o RNA viral do vírus da diarreia bovina em sangue coletado também em papel de filtro Whatman.

Além disso, as médias de cargas virais das amostras coletadas por punção digital foram mais baixas quando comparadas àquelas obtidas por punção venosa, conforme demonstra a tabela 10. A tabela 11 também confirma os dados quando comparado o tempo de sintomatologia em relação ao dia da coleta da amostra.

Entretanto, outros estudos vêm demonstrando que o sangue capilar é uma boa alternativa de coleta. Matheus et al. (2007) também compararam sangue capilar versus sangue venoso analisados por RT-PCR e obtiveram uma sensibilidade melhor ou igual a 90.7% (95% IC, 85.7% to 95.7%), mas com uma especificidade de 82.9% (95% IC, 76.4% to 89.4%) para o sangue capilar.

Nossos dados corroboram os de Prado et al. (2005) que revelam que houve uma redução de títulos em PFU de 100 a 10 vezes para o dengue 2 e 3 respectivamente. Abe e Konomi (1998) reportaram resultados similares para o vírus da hepatite C encontrando uma redução de 10 vezes o título em sangue seco em papel de filtro do que os soros armazenados em freezers.

Um provável fator para a redução na detecção das amostras é o volume das amostras. Na extração por coluna utiliza-se 140 μ L de plasma enquanto que na punção digital parte-se de um disco de aproximadamente 1mm de sangue seco, que deve equivaler a um volume muito menor de soro/plasma. Esta baixa quantidade de *template* pode ter levado a um aumento na formação de dímeros de *primers* os quais, por seu próprio desenho, já apresentavam uma tendência maior para a formação dos mesmos.

Não acreditamos que a formação de dímeros e artefatos em maior escala nas amostras eluídas de FTA card se deveu a algum tipo de molécula presente no papel, ou na amostra e não removida pela extração em papel como o grupo heme da hemoglobina, pois todas as amostras de punção digital apresentaram amplificação satisfatória com o controle interno BVDV.

Em suma, os resultados descritos no presente estudo demonstram que o método baseado em fluorescência por SYBR Green foi sensível e específico para detectar os vírus da dengue. A PCR em Tempo Real qualitativa e quantitativa para o vírus da dengue pode ter um impacto enorme sobre a investigação epidemiológica das doenças dengue, oferecendo a oportunidade para diagnóstico e identificação dos responsáveis pelos casos de FHD / SCD

uma vez que, esta forma da doença geralmente surge 5-7 dias após o início dos sintomas. Em resumo, a PCR em Tempo Real é uma importante ferramenta para o estudo de infecções por dengue.

Entretanto a alternativa de coleta avaliada no presente estudo não apresentou ser tão sensível quanto à coleta por punção venosa. Não se sabe se por o papel de filtro apresentar uma perda do RNA viral ou se pelo baixo volume de extração deste material. Provavelmente este problema se deveu a conjugação de uma extração a partir de um pequeno volume de amostra e de menor eficiência, com um par de *primers* com tendência a dimerização.

A escolha do par de *primers* “Pan dengue” também pode ter comprometido em parte a avaliação do FTA card. Entretanto, é importante salientar que durante a validação da técnica nunca detectamos produtos de PCR com Tms aberrantes, derivados de dímeros e inespecificidades, uma vez que a mesma foi realizada com amostras de plasma e sobrenadantes de cultura, extraídas com o kit QIAamp Viral RNA Qiagen (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) e com controles positivos do vírus da dengue.

Sendo assim, estudos futuros para detecção do RNA viral, dos anticorpos ou pesquisa de vacinas precisam ser estimulados uma vez que a incidência da doença só aumenta o número de países com presença de casos autóctones também e o manejo clínico do paciente com dengue continua sendo uma problemática em todo o mundo já que a diferenciação desta doença das outras doenças como a leptospirose, rubéola e outras infecções por *flavivirus*, ainda é difícil clinicamente.

9. CONCLUSÃO

Do presente estudo, conclui-se que:

O uso da PCR em Tempo Real baseado no sistema de detecção SYBR Green é simples de padronizar, embora seja menos específico que os ensaios tipo TaqMan.

O uso destes *primers* degenerados gera problemas com a temperatura de anelamento como a formação de dímeros de *primers* tornando mais difícil o uso da técnica.

A técnica padronizada durante o estudo apresentou um limite de detecção de 100 cópias/ml, similar aos métodos de PCR em tempo real para dengue publicados na literatura.

A coleta pelo FTA card apresenta a vantagem de reduzir o desconforto inerente ao processo de coleta, entretanto, a sensibilidade obtida foi muito inferior àquela verificada pela extração por colunas de sílica das mesmas amostras.

A punção digital apresentou valores mais baixos de cargas virais em relação à punção venosa para as amostras coletadas para o mesmo indivíduo.

Anexo A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**1. NOME DO PACIENTE:**

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :

SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE.....

CEP:.....

TELEFONE: DDD (...)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:

SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

TELEFONE:

DDD(.....)....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Desenvolvimento de um método rápido e de baixo custo para o diagnóstico de dengue baseado em PCR em Tempo Real.

PESQUISADOR: Dr. José Eduardo Levi**CARGO/FUNÇÃO:** Biologista Molecular**INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº:** 23.407/01-D

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52)

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo sobre o diagnóstico de dengue. Cada ano mais pessoas procuram os pronto-socorros e postos de saúde com sintomas como febre e dor no corpo, que podem ser causados pela dengue. Hoje em dia não há um teste que possa comprovar rapidamente se de fato a pessoa está ou não com dengue. Estamos desenvolvendo um método rápido e de baixo custo para o diagnóstico de dengue usando técnicas moleculares que buscam identificar a presença do vírus no sangue.

Para poder efetuar este estudo precisamos de amostras de sangue da veia e do dedo obtidos de pessoas com suspeita de dengue, que apresentem alguns dos sinais como febre alta (39° a 40°) de inícios abruptos, seguidos de dor de cabeça, dor muscular, dor nas articulações, cansaço, falta de apetite, dor atrás do olho, náuseas, vômitos.

Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Além da coleta de sangue da veia do braço também será feita uma coleta de sangue da ponta do dedo, colhido através de uma picada superficial. Uma ou duas gotas desta picada serão colhidas em um papel semelhante a um papel de filtro. Queremos comparar os dois tipos de coleta,

principalmente para poder utilizar esta última com crianças. Para a análise das amostras usaremos um método de biologia molecular chamado PCR em Tempo Real, que é bem rápido. Ele permitirá saber se o Sr.(a) está tendo dengue ou não.

Desconfortos e riscos esperados: Poderá ocorrer um pequeno hematoma no braço, no local da picada da agulha para a coleta do sangue e no dedo uma dor mínima no momento da picada.

2. **Benefícios que poderão ser obtidos:** O Sr.(a) será informado do resultado do teste. Se ficar comprovado que teve dengue poderá intensificar o controle do mosquito em sua casa e na vizinhança, precavendo-se de uma futura 2ª dengue, que costuma ser bem mais severa que a primeira, e também poderá evitar que seus familiares adquiram a infecção.

3. **Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** não há

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Sua recusa em fornecer as amostras acima citadas não implicará em qualquer diferença no atendimento que lhe será prestado.

Consinto que seja utilizado o material de meu sangue colhido na data atual no estudo científico acima descrito. Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. José Eduardo Levi
Célia Luiza de Lima Rodrigues

Lab. De Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470 Fone- 3061-7020, 3061-701

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 200 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 02/04/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0036/08**, intitulado: **"DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO RÁPIDO E DE BAIXO CUSTO PARA O DIAGNÓSTICO DE DENGUE BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL"** apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. José Eduardo Levi**

Pesquisador (a) Executante: **Célia Luiza De Lima Rodrigues**

CAPPesq, 04 de Abril de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

ANEXO C

Amostra	Dia de sintoma	Carga viral (punção venosa)	TM - V	Tipagem	Carga viral (punção digital)	TM - D
1001	5	26.202,83	85		Indetectável	76,5
1002	1	Indetectável	75,6		Indetectável	76,4
1003	6	6.740.000,00	86,1	tipo 3	Indetectável	76,5
1004	6	1.254,84	85,4		1668,37	85,2
1005	6	1.893,54	82,9		Indetectável	76,1
1006	3	Indetectável	76		942,34	83,2
1007	6	1.809,97	85,4		Indetectável	76,8
1008	6	Indetectável	76,3		341,28	83,5
1009	5	Indetectável	76,3		160,24	82,8
1010	2	Indetectável	78,7		Indetectável	75,8
1011	2	Indetectável	75,6		Indetectável	78,8
1012	2	303,30	85,4		Indetectável	73,9
1013	4	3.400.000,00	86,1	tipo 3	Indetectável	72,9
1014	5	486.950,89	85,7	tipo 3	Indetectável	76,8
1015	5	2.638,76	85,7		Indetectável	77,6
1016	1	3.106,22	85,4	tipo 2	48,23(<100)	80,2
1017	1	8.490.000,00	86,1	tipo 3	1.440,71	85,6
1018	5	Indetectável	76		Indetectável	71,2
1019	5	88.875,23	85,7	tipo 3	Indetectável	76,3
1020	3	13.600.000,00	85,7	tipo 3	Indetectável	83,6
1021	4	24.413,73	82,2		Indetectável	71,2
1022	3	Indetectável	76,3		Indetectável	76,9
1023	5	15.335,71	85,7	tipo 2	815,54	82,9
1024	2	128.089,82	84,3	tipo 2	270,73	85,3
1025	4	7.410,18	83,9	tipo 2	Indetectável	75,9
1026	1	3.731,88	82,5		Indetectável	76,9
1027	5	Indetectável	71		Indetectável	79,6
1028	5	Indetectável	70,1		Indetectável	76,6
1029	2	27,23 (<100)	84,9		Indetectável	76,9
1030	5	38,97(<100)	82,4		Indetectável	79,6
1031	2	682,81	85,6		106,92	80,2
1032	3	192,84	83,5		17,29 (<100)	83,6
1033	6	98,51 (<100)	83,5		Indetectável	77,6
1034	1	3.080.000,00	86		Indetectável	73,4
1035	3	33,42(<100)	84,6		Indetectável	71,8
1036	2	43,16 (<100)	82,8		Indetectável	71,2
1037	2	208,60	85,3		2.131,77	83,4
1038	2	7.920.000,00	86		Indetectável	77,1
1039	3	28,86(<100)	83,1		Indetectável	76,2
1040	1	53,04(<100)	83,1		Indetectável	77,6
1041	3	44.564,94	83,8		7.680,04	85,9
1042	2	53,75(<100)	85,6		Indetectável	77,1
1043	2	267.617,80	84,2		Indetectável	76,5
1044	3	6.879,40	84,2		Indetectável	77,1
1045	4	16,14(<100)	83,1		Indetectável	76,5
1046	3	8.480.000,00	86,3		Indetectável	76,2
1047	4	1.030.000,00	85,3		Indetectável	77,9
1048	5	4.544,01	84,2		Indetectável	77,6
1049	2	65,73(<100)	82,8		Indetectável	77,4
1050	3	3.700.000,00	86		Indetectável	77,4

1051	3	440.116,14	84,6	tipo 2	Indetectável	77,1
1052	5	147,66	85,3		Indetectável	76,8
1053	4	2.330.000,00	84,2	tipo 2	Indetectável	77,6
1054	2	6.880.000,00	83,5	tipo 2	Indetectável	75,9
1055	3	Indetectável	73,2		Indetectável	75,6
1057	3	31.100.000,00	83,9	tipo 2	Indetectável	77,4
1058	2	1.990.000,00	83,9	tipo 2	Indetectável	75,9
1059	4	2.345,61	85,4		Indetectável	76,8
1060	3	6.085,74	84,3	tipo 2	Indetectável	77,4
1061	3	1.641,29	85,7	tipo 2	Indetectável	76,8
1062	13	37.945,73	84,3		Indetectável	77,1
1063	1	Indetectável	76,4		95.301,67	85,2
1064	4	2.279,83	83,9		Indetectável	76,8
1065	4	458,65	84,7		Indetectável	77,1
1066	4	41.271,45	84,3		Indetectável	77,4
1067	3	1.330.000,00	86,1		Indetectável	77,4
1068	4	1.667,12	86,5		189.221,73	85,5
1069	0	Indetectável	75,7		Indetectável	77,1
1070	3	Indetectável	76		Indetectável	76,2
1071	3	Indetectável	77,1		Indetectável	78,2
1072	1	87,26 (<100)	83,2		Indetectável	77,4
1073	5	274.239,94	86,1		Indetectável	77,4
1074	5	418,71	84,7		6.463,19	84,6
1075	4	741.889,44	84,3	tipo 2	Indetectável	77,4
1076	5	11.858,27	84,7		Indetectável	77,4
1077	3	11.800.000,00	85	tipo 1	Indetectável	77,4
1078	5	251,71	85,4	tipo 1	16,42 (<100)	83,7
1079	1	Indetectável	76,7		Indetectável	77,7
1080	4	781.888,75	86,1	tipo 3	Indetectável	77,7
1081	4	25.727,34	86,1	tipo 3	Indetectável	76,8
1082	4	2.060.000,00	86,1	tipo 3	Indetectável	76,8
1083	3	3.283,80	85,7		Indetectável	77,7
1084	3	Indetectável	73,1		Indetectável	77,7
1085	4	12.800.000,00	84,3	tipo 2	Indetectável	77,4
1086	3	29.800.000,00	84,7	tipo 1	Indetectável	76,8
1087	4	Indetectável	76,7	tipo 2	Indetectável	74,1
1088	4	597.000.000.000,00	82,1	tipo 2	597.000.000.000,00	81,9
1089	5	962.000.000.000,00	80,3	tipo 2	Indetectável	77,4
1090	6	1.360.000.000.000,00	85,5	tipo 3	Indetectável	72,7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K e Konomi N. Hepatitis C virus RNA in dried serum spotted onto filter paper is stable at room temperature. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3070-2.

Ahmed S, Ali N, Ashraf S, Ilyas M, Tariq WU, Chotani RA. Dengue fever outbreak - A clinical management experience. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2008;8:8-12.

Barth OM. Dengue virus (flavivirus) morphogenesis: Ultrastructural Aspects of the dengue particle. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1999; 31:407-12.

Barth, OM. *Atlas of Dengue Viruses Morphology and Morphogenesis.* Instituto Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro; 2000.

Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR, Mackenzie JS. Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res.* 2001;73:81-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Departamento de Operações. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. *Manual de dengue: Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente.* 2nd edição: Brasília (DF); 1996.

Bustin SA editor. *A-Z of Quantitative PCR.* California: IUL Biotechnology Series; 2006.1v.

Cassol S, Salas T, Gill MJ, Montpetit M, Rudnik J, Sy CT, O'Shaughnessy MV. Stability of dried blood spot specimens for detection of human immunodeficiency virus DNA by polymerase chain reaction, *J. Clin Microbiol.* 1992;30:3039-42.

Cao-Lormeau VM. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology.* 2009; 6:35.

Chadwick D, Arch B, Wilder-Smith A, Paton N. Distinguishing dengue fever from other infections on the basis of simple clinical and laboratory features: application of logistic regression analysis. *J Clin Virol.* 2006; 35:147-53.

Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue haemorrhagic fever.* New York: CAB International;1997:175-98.

Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Dengue typing assay based on Real-Time PCR using SYBR Green I. *J Virol Methods.* 2005;129: 8-15.

Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3737-9.

Da Fonseca BAL, Fonseca SN. et al. Dengue virus infections. *Curr Opin Pediatr.* 2002;14:67-71.

de Araújo JM, de Filippis AM, Schatzmayr HG, de Araújo ES, Britto C, Cardoso MA, Camacho LA, Nogueira RM. Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:952-4.

de Oliveira Poersch C, Pavoni DP, Queiroz MH, de Borba L, Goldenberg S, dos Santos CN, Krieger MA. Dengue virus infection: comparison of methods for diagnosis the acute disease. *J Clin Virol.* 2005;32:272-7.

de Paula SO, Lopes da Fonseca BA. Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM- positive samples: comparison of whole blood, buff-coat and serum as clinical samples. *J Virol Methods.* 2002;102:113-7.

Deubel V, Nogueira RM, Drouet MT, Zeller H, Reynes JM, Ha DQ. Direct sequencing of genomic cDNA fragment amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue 2 virus. *Arch Virol.* 1993;129:197-210.

Dos Santos HW, Poloni TR, Souza KP, Muller VD, Tremeschin F, Nali LC, Fantinatti LR, Amarilla AA, Castro HL, Nunes MR, Casseb SM, Vasconcelos PF, Badra SJ, Figueiredo LT, Aquino VH. A Simple One-Step Real-Time RT-PCR for Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Med Virol.* 2008; 80:1426-33.

Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol.* 2002;156:40-51.

Figueiredo LTM, Fonseca BAL. Dengue In: *Tratado de infectologia.* São Paulo: Ateneu; 1997. p.201-4.

Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MP, Costa CA, Farias IP. Dengue virus Type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infec Dis.* 2008; 14:667-9.

Fundação Nacional de Saúde. *Manual do dengue: vigilância epidemiológica e atenção ao doente.* Brasília. FUNASA; 1996.82 p.

Fundação Nacional de Saúde. *Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento.* Brasília. FUNASA; 2002. 20 p. (Série A: Normas e Manuais Técnicos 176).

- Gomes-Ruiz AC, Nascimento RT, de Paula SO, Lopes da Fonseca BA. SYBR Green and TaqMan Real-Time PCR assays are equivalent for the diagnosis of dengue virus type 3 infections. *J Med Virol.* 2006; 78(6):760–763.
- Gubler DJ e Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv. Virus Res.* 1999; 53:35-70.
- Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Feres VC, Rocha B, Levi JE, Souza VA, Boas LS, Pannuti CS, Martelli CM. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. *J Infect Dis.* 2008;197(6): 817-824.
- Guzmán MG, Kourí G, Pelegrino JL. Enfermedades virales emergentes. *Rev Cubana Med Trop.* 2001;53(1):5–15.
- Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:33-42.
- Halstead SB. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* Gubler DJ, Kuno G., editors. Wallingford: CAB;1997:23-44.
- Hansen TV, Simonsen MK, Nielsen FC, Hundrup YA. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:2072-6.
- Holmes LEC , Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 2003;3:19-28.
- Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, Viramitrachai W, Ratanachu-ek S, Kiatpolpoj S, Innis BL, Rothman AL, Nisalak A, Ennis FA. . Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* 1997; 176:313-21.
- Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. *Field's Virology.* 5nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2007.1v.
- Koh BK, Ng LC, Kita Y, Tang CS, Ang LW, Wong KY, James L, Goh KT. The 2005 dengue epidemic in Singapore: epidemiology, prevention and control. *Ann Acad Med Singapore.* 2008; 37:538-45.
- Kwok S, Chang SY, Sninsky JJ, Wang A. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods Appl.* 1994;3:39-47.

Lacen (Rio Grande do Norte). Epidemiologia da dengue. Disponível em : http://www.dengue.lcc.ufmg.br/dengue_cd/files/epidemiologia/imagens/mapas/novos/slide07.npg). Acesso em: 05 maio 2010.

Lai YL, Chung YK, Tan HC, Yap HF, Yap G, Ooi EE, Ng LC. Cost effective Real time RT-PCR to screen for dengue followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus 2. *J Clin Microbiol.* 2007;45:935-41.

Levi JE, Tateno AF, Machado AF, Ramalho DC, de Souza VA, Guilarde AO, de Rezende Feres VC, Martelli CM, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Pannuti CS. Evaluation of a commercial real- time and multiplex-PCR kit for dengue diagnosis in samples collected during an outbreak in Goiânia, Central Brazil in 2005. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1893-7.

Libraty DH, Endy TP, Hough HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infection. *J Infect Dis.* 2002;185:1213-21.

Loroño-Pino MA, Cropp CB, Farfán JA, Vorndam AV, Rodríguez-Angulo EM, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Beaty BJ, Gubler DJ. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:725-30.

Maher-Sturgess SL, Forrester NL, Wayper PJ, Gould EA, Hall RA, Barnard RT, Gibbs MJ. Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. *Virology.* 2008;5:16.

Matheus S, Meynard JB, Lacoste V, Morvan J, Deparis X. Use of capillary blood samples as a new approach for diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol.* 2007;45:887-90.

Murgue B, Roche C, Chungue E, Deparis X. Prospective study of the duration of magnitude of viremia in children hospitalised during the 1996–1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J Med Virol.* 2000;60:432-8.

Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol.* 2002;25 (3 Suppl): 3-12.

Nunes-Araújo FR, Ferreira MS, Nishioka SD. Dengue fever in Brazilian adults and children: assessment of clinical findings and their validity for diagnosis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97:415-9.

Organização Mundial da Saúde. *Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle*. Genebra: OMS; 1997. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/index.html>. Acesso em: 10 dez. 2006.

Organização Mundial da Saúde. *Number of reported dengue cases of DF/DHF in SEAR countries*. Genebra: OMS; 2000. Disponível em: http://www.searo.who.int/linkfile/dengue_Tb/1_SEARO_Countrywise_dengue_cases. Acesso em: 10 dez. 2006.

Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*. 1997;50:161-9.

Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodríguez R, Vázquez S, Guzmán MG. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *J Virol Methods*. 2005;125:75-81.

Ramirez AH, Moros Z, Comach G, Zambrano J, Bravo L, Pinto B, Vielma S, Cardier J, Liprandi F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 65:247-53.

Reiter P. Dengue in Singapore. In: Goh KT (editor). *Singapore: Institute of Environmental Epidemiology*. Ministry of the Environment; Technical Monograph Series, nº 2, 1998. p.262.

Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM., editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers;1996.p.931-60.

Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG., editors. *Clinical Virology*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1997.

Rigau-Pérez JG. Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990–1991. Puerto Rico Association of Epidemiologists. *Rev Panam Salud Publica*. 1997;1:381-8.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997; 245:154-60.

Romanos MTV. Febre amarela e dengue. In: Santos NOS, Wigg, MD editores. *Introdução à virologia humana*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p.177-82.

Schatzmayr HG. Dengue Situation in Brazil by Year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95(1 Suppl). Disponível em: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/95sup1/28c.html>. Acesso em: 14 nov. 2006.

Seema e Jain, SK. Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus: entry and fusion with target cell. *Indian J Clin Biochem.* 2005;20:92-103.

Secretaria de Vigilância e Saúde. In *Dengue: Brasil.* SVS; 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue1203.pdf>. Acesso em 10 out. 2007.

Secretaria de Vigilância e Saúde. In *Dengue.* Brasil. SVS; 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_1a23de2009.pdf. Acesso em: 09 maio 2010.

Secretaria de Vigilância e Saúde. In *Dengue.* Brasil. SVS; 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se7_05_0.pdf. Acesso em: 09 maio 2010.

Secretaria de Vigilância e Saúde. In *Dengue.* Brasil. SVS; 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se7_05_0.pdf. Acesso em 25 maio 2010.

Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, Lin TH, Huang JH. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR Green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:2408-16.

Sudiro TM, Zivny J, Ishiko H, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nisalak A, Norman JE, Ennis FA, Rothman AL. Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2001; 63:29-34.

Tanaka M. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 1993; 41:311-2.

Tauil PL. Urbanization and dengue ecology. *Cad Saude Publica.* 2001;17: 99-102.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde.* 1999;8:5-33.

Teixeira TR, Medronho Rde A. Indicadores sócio-demográficos e a epidemia de dengue em 2002 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2008;24:2160-70.

Thu HM, Lowry K, Myint TT, Shwe TN, Han AM, Khin KK, Thant KZ, Thein S, Aaskov J. Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3, and 4 by Dengue. *Emerging Infect Dis.* 2004;10:593-7.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J Infect Dis.* 1997;176:322-30.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000;181:2-9.

Vázquez S, Sáenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzmán, M. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev. Pan Am J Public Health.* 1998;3:174-8.

Vilcek S, Strojny L, Durkovic B, Rossmanith W, Paton D. Storage of bovine viral diarrhoea virus samples on filter paper and detection of viral RNA by a RT-PCR method. *J Virol Methods.* 2001;92:19-22.

Yong YK, Thayan R, Chong HT, Tan CT, Sekaran SD. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore Med.J.* 2007;48:662-8.

Yoo SH, Hong SH, Jung SR, Park SJ, Lee NK, Kim SN, Kang SM, Min HK, Park SN, Hong SH. Application of bovine viral diarrhoea virus as an internal control in nucleic acid amplification tests for hepatitis C virus RNA in plasma-derived products. *J Microbiol.* 2006;44:72-6.

Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1053-7.

Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, Lin SC, Ho ST, Huang JH, King CC. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology.* 2003; 305:330-8.